



**HAL**  
open science

**Mise en évidence des mécanismes d'échappement à la réponse immune dans la maladie de Waldenström au travers de l'étude du microenvironnement immunitaire dans un modèle pré-clinique Myd88 muté et perspectives thérapeutiques.**

Quentin Lemasson

► **To cite this version:**

Quentin Lemasson. Mise en évidence des mécanismes d'échappement à la réponse immune dans la maladie de Waldenström au travers de l'étude du microenvironnement immunitaire dans un modèle pré-clinique Myd88 muté et perspectives thérapeutiques.. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2023. Français. NNT : 2023LIMO0054 . tel-04729960

**HAL Id: tel-04729960**

**<https://theses.hal.science/tel-04729960v1>**

Submitted on 10 Oct 2024

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

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

Thèse de doctorat



Université  
de Limoges

Université de Limoges

ED 652 - OMEGALIM-Biologie-Chimie-Santé

UMR CNRS 7276 / INSERM 1262

CRIBL – Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations

Thèse pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Limoges**

Immunologie, Oncologie, Inflammation et Infectiologie

Présentée et soutenue par

**Quentin Lemasson**

Le 27 novembre 2023

**Mise en évidence des mécanismes d'échappement à la réponse immune dans la maladie de Waldenström au travers de l'étude du microenvironnement immun dans un modèle pré-clinique *Myd88* muté et perspectives thérapeutiques.**

Thèse dirigée par le Docteur Christelle VINCENT-FABERT et le Professeur Jean FEUILLARD

Composition du Jury de thèse :

**Président**

Mr. Damien ROOS WEIL, PU-PH, AP-HP Pitié Salpêtrière, Université de la Sorbonne

**Rapporteurs**

Mme. Stéphanie POULAIN, PU-PH, UMR CNRS 9020 - INSERM 1277, Université de Lille  
Mr. Thierry FEST, PU-PH, UMR INSERM 1236, Université de Rennes

**Examineurs**

Mme. Marion ESPELI, CRCN, UMR INSERM 1160, Université Paris Cité





## Remerciements

---

En première intention, je tiens à remercier les quatre membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à Mme Stéphanie POULAIN et à Mr Thierry FEST pour leur expertise apportée en temps que rapporteurs ; et Merci également à Mme Marion ESPELLI et Mr Damien ROOS WEIL pour l'examen attentionné qu'ils sauront porter à ce manuscrit.

Je tiens à remercier le Dr Eric PINAUD qui étant responsable du laboratoire m'a permis d'occuper ses locaux durant ces trois années. Je tiens également à te remercier pour ta bienveillance, ta simplicité et tes conseils avisés.

Je remercie beaucoup le Dr Christelle VINCENT-FABERT, qui a été mon encadrante lors de cette thèse. Je te remercie pour ton encadrement de qualité qui m'a permis d'acquérir de solides compétences techniques ; mais je tiens tout particulièrement à mettre en lumière la confiance et les conseils que tu as su me prodiguer au fil de ces trois années et grâce auxquels j'ai vraiment le sentiment de sortir grandi et performant de cette expérience. Tu as su me guider sur la voie complexe du titre de docteur tout en me laissant l'opportunité de m'épanouir par moi-même. J'espère en retour avoir pu mener ce projet aussi loin que tu pouvais l'espérer et que tu en seras satisfaite.

Je remercie le Pr Jean FEUILLARD, d'abord pour avoir accepté de m'intégrer à son équipe, mais surtout pour sa présence et sa disponibilité au quotidien. Merci pour votre implication tout au long du déroulé de cette thèse que vous avez su regarder d'un œil expérimenté en y apportant toujours un enrichissement.

J'adresse également un grand merci à l'ensemble de l'équipe 2M2BC et au laboratoire dans son ensemble. Une pensée particulière va vers Cathy OUK, Claire CARRION, Tiffany MARCHIOL ou encore Christelle OBLET qui ont toujours répondu présentes et qui ont permis de résoudre bien de soucis techniques !

Je tiens également à surligner l'implication de Magali SAGE qui a rendu possible la réalisation des imageries *in vivo* par scanner, et à remercier l'ensemble du personnel de l'animalerie BISCEm pour le soin apporté quotidiennement aux animaux.

Un grand merci à Mina et Laurie, qui de part leur travail de stage assidu ont pleinement participé à ce projet. Mina je te souhaite un avenir scientifique qui te comblera, car tu as les capacités de le saisir !

Je remercie l'ensemble des doctorants du bureau 138 passés et présents sans qui la vie au laboratoire aurait été un peu plus triste :

Léa avec qui nous nous sommes suivi jusqu'au dénouement de nos thèses respectives, merci pour ta bonne humeur, pour ces moments de rire et de complicité, merci pour tous tes conseils et également pour toutes nos discussions plus ou moins philosophiques ! Je ne doute pas que tu arrives toi aussi au bout de cette aventure, mais quel qu'en soit le dénouement gardes à l'esprit que tu es une personne à la fois sérieuse, travailleuse et profondément gentille !

Stecy qui nous a devancé d'une année, je te remercie pour tous ces bons moments, ton dynamisme et ta franchise. Sans toi la thèse aurait été très différente ! Nous avons encore aujourd'hui l'occasion de te voir évoluer et je suis persuadé que c'est loin d'être fini ! En attendant je te souhaite plein de bonheur et de réussite outre Atlantique que ce soit professionnellement ou personnellement.

Jennifer et Israa qui sont elles aussi plongées dans leurs projets d'après-thèse, vous avez activement participé à la bulle de bonne humeur et de complicité du bureau et je vous remercie beaucoup pour ça !

Kenza enfin, merci pour ta présence et ton soutien, j'espère que tous les efforts que tu fournies seront payants et que tu parviendras à réaliser les objectifs que tu t'es fixée.

Je tiens également à remercier Ophélie pour sa gentillesse et sa présence très agréable tout au long de cette dernière année. Tu as je pense beaucoup de compétences scientifiques et de très grandes qualités humaines, bien que ce ne soit pas toujours évident essayes de toujours rester aussi sourillante et positive ! Je te souhaite de poursuivre le plus loin possible sur cette voie, tu le mérites amplement.

A Catherine, que nous avons vu bourgeonner puis éclore ! Je te souhaite beaucoup de bonheur à la maison tout d'abord, mais je te souhaite également de t'épanouir dans un milieu pro qui te plait. Merci pour ta bonne humeur tout au long de ces trois ans.

A Roussine, tu es une personne extrêmement agréable et ta présence a grandement participé à la bonne ambiance générale. Merci pour ta gentillesse et surtout courage pour la suite !

Au cours de cette thèse j'ai eu l'occasion d'enseigner à la faculté de sciences et techniques de Limoges dont je suis par ailleurs issu, aussi je tiens chaleureusement à remercier l'ensemble de l'équipe pédagogique. Merci à Stéphanie DURAND, Chantal VIGNOLES, Sebastien LEGARDINIER et Patrick PELISSIER pour votre bienveillance lors des différents TP.

Mes pensées vont également vers l'ensemble de l'équipe du Scientibus. Après avoir eu l'occasion de voir l'envers du décor et l'implication que cet atelier demande, je félicite et remercie l'ensemble des acteurs qui permettent de le faire vivre et rayonner partout dans notre région et même au-delà !

De manière plus personnelle, je vais à présent remercier Audrey, qui partage ma vie et qui m'a porté (parfois supporté !) pendant ces années de thèse. Ton soutien sans faille même dans les moments les plus difficiles m'a permis de garder le cap et de toujours entrevoir la lumière même dans les heures les plus sombres. Je te remercie énormément de m'avoir accompagné tout au long de ce processus à la fois long, précaire et parfois décourageant pour nous deux. Nous allons à présent pouvoir envisager un avenir serein et plein de bonheur ensemble !

Pour mes parents et mes quatre grands parents, je pense que l'obtention de cette thèse vous rend très fiers et vous remplit de joie. Malgré tout sachez que sans vous, sans l'éducation, les valeurs les principes et l'amour que vous m'avez prodigué tout au long de ma vie rien de tout cela ne serait possible. Cette thèse consacre la connaissance scientifique, vous vous m'avez apporté la force et l'ambition de l'acquérir ainsi que tout le reste ; et pour cela je ne vous remercierai jamais assez.

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



## Table des matières

---

<b>Introduction</b> .....	19
<b>Chapitre I. Développement normal des lymphocytes B</b> .....	20
A. Définition d'une immunoglobuline .....	20
B. Génétique des immunoglobulines .....	21
1. Les chaînes lourdes d'Ig .....	21
2. Les chaînes légères d'Ig .....	21
C. Les voies de signalisation régulatrices du lymphocyte B .....	22
1. La signalisation du BCR .....	22
2. La signalisation des récepteurs Toll-like (TLRs) et la voie NFκB .....	23
a. Signalisation des TLRs .....	24
b. La voie NFκB .....	25
i. La voie canonique de NFκB .....	27
ii. La voie non-canonique de NFκB .....	27
D. Ontogénèse B .....	30
1. Ontogénèse précoce .....	30
a. La moelle osseuse .....	30
b. Développement B dans la moelle osseuse .....	31
i. Engagement dans la voie lymphocytaire B .....	31
2. Ontogénèse B tardive .....	36
a. Les lymphocytes B folliculaires .....	37
i. Activation des LB (zone interfolliculaire) .....	37
ii. La zone sombre du CG et le processus d'hypermutation somatique (SHM pour « Somatic Hypermutation ») .....	39
iii. La zone claire du CG et la CSR .....	39
iv. Différenciation en plasmocytes / LB mémoire .....	41
b. Les lymphocytes B de la zone marginale .....	43
i. Différenciation et rétention des LB MZ .....	43
ii. Activation T Indépendante des MZ LB .....	44
iii. Activation T dépendante des LB MZ .....	46
3. Cas particulier des lymphocytes B1 .....	46
<b>Chapitre II. Lymphomagenèse B</b> .....	49
A. Classifications des lymphomes B .....	49
B. Les principaux sous-types de lymphomes non-Hodgkiniens B .....	49
1. Les lymphomes B agressifs .....	49
a. Le lymphome Diffus à Grandes Cellules B .....	49
b. Le lymphome du manteau .....	51
c. Le lymphome de Burkitt .....	52
d. Le myélome multiple .....	53
2. Les lymphomes B indolents .....	53
a. Le lymphome folliculaire .....	53
b. La leucémie lymphoïde chronique .....	54
c. Le lymphome de la zone marginale .....	54
d. La maladie de Waldenström .....	55
<b>Chapitre III. La maladie de Waldenström</b> .....	56
A. Historique et épidémiologie .....	56



1.	Historique de la maladie de Waldenström .....	56
2.	Epidémiologie de la maladie de Waldenström .....	56
B.	Critères diagnostiques de la maladie de Waldenström.....	56
C.	Manifestations cliniques de la maladie .....	57
1.	Phase indolente Stade MGUS.....	57
2.	Phase MW asymptomatique.....	58
3.	Phase MW symptomatique.....	58
D.	Evènements génétiques associés à la maladie de Waldenström.....	61
1.	Mutations de <i>MYD88</i> .....	61
2.	Autres mutations associées à la maladie.....	63
a.	Délétion du chromosome 6q ( <i>Del 6q</i> ).....	63
b.	Mutation S338X de CXCR4 .....	65
c.	La trisomie 4 (Tri 4).....	65
d.	Altérations de <i>p53</i> .....	65
E.	Hypothèses concernant la cellule d'origine .....	66
1.	Précurseur lymphocytaire B .....	66
2.	Lymphocyte B mémoire.....	66
3.	Lymphocyte B de la zone marginale.....	66
4.	Lymphocyte B1 .....	67
F.	Thérapies et maladie de Waldenström.....	67
1.	Décomposition de l'arsenal thérapeutique.....	67
a.	Les chimiothérapies.....	67
b.	Les immunothérapies (Rituximab) .....	67
c.	Les inhibiteurs thérapeutiques .....	68
i.	Ibrutinib .....	68
ii.	Bortezomib.....	69
2.	Traitements de première ligne.....	69
3.	Traitements de seconde ligne .....	70
G.	Transformation de la MW en lymphome agressif.....	71
<b>Chapitre IV. Le micro-environnement immun tumoral des lymphomes B.....</b>		<b>73</b>
A.	Les acteurs principaux du micro-environnement tumoral immun.....	73
1.	Les lymphocytes T .....	73
a.	La structure du TCR .....	73
b.	Le développement des lymphocytes T.....	75
i.	Développement précoce et production du TCR.....	75
ii.	La sélection des thymocytes DP.....	75
iii.	La restriction CD4/CD8 .....	76
c.	L'activation des LT.....	76
i.	Le signal primaire TCR $\alpha\beta$ /CD3 $\xi\xi$ .....	76
ii.	Le signal secondaire CD28 .....	78
iii.	La signalisation du récepteur à l'IL-2 (IL2R) .....	79
iv.	La signalisation du récepteur à l'interferon gamma (IFN $\gamma$ R) .....	81
d.	Lymphocytes T CD4 .....	82
i.	Les Th1 .....	82
ii.	Les Th2.....	83
iii.	Les Th9.....	83
iv.	Les Th17 .....	83
v.	Les Th22.....	84

vi. Les TFh.....	84
vii. Les T régulateurs (Tregs) .....	84
e. Lymphocytes T CD8 .....	85
f. Les LT mémoires .....	86
2. Les autres acteurs du micro-environnement tumoral immun .....	86
a. Les Monocytes .....	86
b. Les Macrophages .....	86
c. Les cellules NK.....	87
B. Les mécanismes d'échappement tumoral .....	87
1. L'épuisement des lymphocytes T .....	88
a. Axe PD-1/PD-L1 .....	88
i. La signalisation de PD-1 .....	88
ii. Expression de PD-L1 .....	89
b. Axe CTLA-4.....	90
c. Axe TIM-3.....	91
d. Axe LAG-3.....	92
e. La perte d'immunogénéicité.....	92
2. Les lymphocytes T régulateurs.....	92
3. La transition des Macrophages.....	93
4. La dérégulation des cellules NK .....	93
5. Les cytokines immunosuppressives .....	93
6. Apport des modèles murins transgéniques à l'étude du microenvironnement immun dans les lymphomes B .....	94
7. Modification du microenvironnement immun dans la MW .....	95
<b>Matériel et Méthodes</b> .....	96
<b>Chapitre I. Le modèle d'étude</b> .....	97
A. Construction du modèle murin et génération des animaux.....	97
B. Suivi des animaux et euthanasie.....	97
C. Préparation des organes .....	97
<b>Chapitre II. Cytométrie en flux</b> .....	99
A. Protocole de marquage membranaire.....	99
B. Protocole de marquage des Tregs .....	100
C. Protocole de marquage des cytokines intra-cellulaires .....	100
<b>Chapitre III. Tests de traitements</b> .....	101
A. Traitements <i>ex vivo</i> Ibrutinib®, Ibrutinib®+anti-PD-1, anti-IL-6R et anti-IL-10R.....	101
1. Conditions de culture.....	101
2. Incorporation de l'EdU .....	101
B. Traitement <i>in vivo</i> Ibrutinib® .....	101
1. Préparation de la solution d'Ibrutinib®.....	101
2. Suivi de la taille des rates.....	101
C. Traitements anti-PD-L1 <i>in vivo</i> .....	102
<b>Chapitre IV. Etude de l'expression de PD-L1 par les exosomes circulants</b> .....	103
A. Isolation des microvésicules circulantes.....	103
B. Western blot sur vésicules isolées .....	103
<b>Chapitre V. Techniques d'imagerie</b> .....	104
A. Immunohistochimie .....	104

B. Immunofluorescence.....	104
<b>Résultats</b> .....	105
<b>Chapitre I. Echappement immunitaire et maladie de Waldenström</b> .....	106
A. Dérégulation des populations lymphocytaires .....	106
B. Les LB tumoraux ont un phénotype immunomodulateur .....	107
C. Une réponse T anti-tumorale a bien été initiée .....	107
D. Les lymphocytes T possèdent un phénotype épuisé .....	109
E. Dérégulations de la population des lymphocytes T régulateurs.....	112
<b>Chapitre II. Perspectives thérapeutiques liées à l'échappement immunitaire dans la maladie de Waldenström</b> .....	114
A. Traitement à l'Ibrutinib® <i>in vivo</i> .....	114
1. Protocole expérimental.....	114
2. Impact du traitement sur les lymphocytes B .....	114
3. Impact du traitement sur l'épuisement des lymphocytes T.....	115
B. Test d'une combinaison thérapeutique Ibrutinib® + anti-PD-1 <i>ex vivo</i> .....	117
1. Effet de la combinaison thérapeutique sur les lymphocytes B .....	118
2. Effet de la combinaison thérapeutique sur les lymphocytes T .....	118
C. Traitement anti-PD-L1 <i>in vivo</i> .....	120
D. Traitements anti-IL-6R et anti-IL-10R <i>ex vivo</i> .....	125
<b>Chapitre III. Rôle du microenvironnement immunitaire dans la transformation de la maladie de Waldenström</b> .....	129
A. Caractéristiques des lymphocytes B comparées entre phénotypes LPL et DLBCL ..	131
B. Caractéristiques des lymphocytes T dans les DLBCL .....	131
<b>Chapitre IV. Atteintes secondaires d'organes, comparaison entre phénotype LPL et DLBCL</b> .....	135
A. Altération de l'activité rénale .....	135
B. Altération de l'activité hépatique .....	138
<b>Discussion et Perspectives</b> .....	141
A. Discussion concernant le micro-environnement tumoral de la MW .....	141
1. Immunosuppression des LT CD4 et CD8 .....	141
2. Caractérisation des LT régulateurs.....	142
B. Discussion concernant les perspectives thérapeutiques de l'échappement tumoral dans la MW.....	143
1. Ibrutinib® et combinaisons thérapeutiques.....	143
2. Inefficacité du traitement anti-PD-L1 .....	144
3. Traitements anti-IL-6R et anti-IL-10R .....	145
C. Discussion concernant la transformation de la MW et le microenvironnement immunitaire .....	145
D. Discussion concernant les atteintes secondaires rénales et hépatiques.....	147
<b>Conclusion</b> .....	148
<b>Références bibliographiques</b> .....	149
<b>Annexes</b> .....	171

## Table des illustrations

---

<b>Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline.....</b>	<b>20</b>
<b>Figure 2 : Structure du locus de chaînes lourdes d'Ig (locus IgH).....</b>	<b>21</b>
<b>Figure 3 : Structure des locus de chaînes légères d'Ig (locus Igk et Igλ) .....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 4 : La signalisation de la voie du BCR .....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 5 : Les TLRs et leur protéines adaptatrices .....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 6 : La formation du Myddosome.....</b>	<b>25</b>
<b>Figure 7 : Les sous-unités NFκB et leurs inhibiteurs .....</b>	<b>26</b>
<b>Figure 8 : Signalisation de la voie NFκB canonique .....</b>	<b>28</b>
<b>Figure 9 : Signalisation de la voie NFκB non-canonique.....</b>	<b>29</b>
<b>Figure 10 : Structure schématique de la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse B .</b>	<b>30</b>
<b>Figure 11 : Processus schématisé de l'ontogenèse B précoce dans la moelle osseuse .....</b>	<b>32</b>
<b>Figure 12 : Les séquences conservées 23-RSS et 12-RSS.....</b>	<b>32</b>
<b>Figure 13 : Mécanismes moléculaires de la recombinaison V(D)J .....</b>	<b>33</b>
<b>Figure 14 : Structure schématique du pré-BCR .....</b>	<b>34</b>
<b>Figure 15 : Résumé schématique des étapes de sélections positives et négatives du développement B médullaire .....</b>	<b>36</b>
<b>Figure 16 : Structure typique d'un organe lymphoïde secondaire (exemple de la rate)</b>	<b>37</b>
<b>Figure 17 : La formation du centre germinatif .....</b>	<b>38</b>
<b>Figure 18 : Principe moléculaire de l'hypermutation somatique (SHM) .....</b>	<b>40</b>
<b>Figure 19 : Principe moléculaire de la recombinaison isotypique (CSR).....</b>	<b>42</b>
<b>Figure 20 : Récapitulatif du passage du lymphocyte B dans le centre germinatif .....</b>	<b>43</b>
<b>Figure 21 : Activation T indépendante des LB de la zone marginale.....</b>	<b>45</b>
<b>Figure 22 : Activation T dépendante des LB dans la zone marginale.....</b>	<b>47</b>
<b>Figure 23 : Origine de différents lymphomes B non-Hodgkiniens resituée .....</b>	<b>50</b>
<b>Figure 24 : Evolution de la classification des DLBCL.....</b>	<b>51</b>
<b>Figure 25 : Histologie médullaire de la maladie de Waldenström.....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 26 : Exemples de profils en électrophorèse des protéines sériques .....</b>	<b>58</b>
<b>Figure 27 : Récapitulatif des symptômes de la maladie de Waldenström.....</b>	<b>60</b>
<b>Figure 28 : Fréquence de survenue de la mutation MYD88L265P en fonction des différents lymphomes B et de leur origine cellulaire .....</b>	<b>61</b>
<b>Figure 29 : Signalisation NFκB oncogénique dépendante de la mutation MYD88L265P .....</b>	<b>62</b>
<b>Figure 30 : Evènements génétiques impliqués dans la maladie de Waldenström.....</b>	<b>63</b>

<b>Figure 31 : Structure de la protéine A20 .....</b>	<b>64</b>
<b>Figure 32 : Rôle de A20 et conséquence de sa perte dans la MW .....</b>	<b>64</b>
<b>Figure 33 : Mode d'action des agents alkylants, exemple du cyclophosphamide.....</b>	<b>68</b>
<b>Figure 34 : Arbre décisionnel des traitements de 1ère ligne de la MW .....</b>	<b>70</b>
<b>Figure 35 : Arbre décisionnel des traitements de 2nd ligne de la MW .....</b>	<b>71</b>
<b>Figure 36 : Structure du TCR et représentation des locus codant les chaînes <math>\alpha</math> et <math>\beta</math> ...</b>	<b>74</b>
<b>Figure 37 : Les étapes principales du développement T .....</b>	<b>77</b>
<b>Figure 38 : Résumé de la signalisation du TCR .....</b>	<b>78</b>
<b>Figure 39 : Signalisation du signal de co-activation CD28.....</b>	<b>79</b>
<b>Figure 40 : Signalisation du récepteur à l'IL-2.....</b>	<b>80</b>
<b>Figure 41 : Signalisation du récepteur à l'IFN<math>\gamma</math> .....</b>	<b>81</b>
<b>Figure 42 : La polarisation des lymphocytes T CD4+ .....</b>	<b>82</b>
<b>Figure 43 : L'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+ .....</b>	<b>85</b>
<b>Figure 44 : La signalisation de PD-1 .....</b>	<b>89</b>
<b>Figure 45 : La signalisation de CTLA-4.....</b>	<b>90</b>
<b>Figure 46 : La signalisation de TIM-3.....</b>	<b>91</b>
<b>Figure 47 : Dérégulation des populations lymphocytaires spléniques .....</b>	<b>106</b>
<b>Figure 48 : Phénotype immunosuppresseur des lymphocytes B tumoraux .....</b>	<b>108</b>
<b>Figure 49 : Distribution spatiale des lymphocytes B et T dans la tumeur.....</b>	<b>109</b>
<b>Figure 50 : Caractérisation de la réponse T anti-tumorale au niveau cellulaire.....</b>	<b>110</b>
<b>Figure 51 : Caractérisation du phénotype épuisé des lymphocytes T .....</b>	<b>111</b>
<b>Figure 52 : Caractérisation des lymphocytes T régulateurs .....</b>	<b>113</b>
<b>Figure 53 : Techniques d'évaluation des critères de réponse/non-réponse à l'Ibrutinib®.....</b>	<b>115</b>
<b>Figure 54 : Effet de l'Ibrutinib® sur les lymphocytes B .....</b>	<b>116</b>
<b>Figure 55 : Effet de l'Ibrutinib® sur l'épuisement des lymphocytes T.....</b>	<b>117</b>
<b>Figure 56 : Effet de la combinaison Ibrutinib®+anti-PD-1 sur les lymphocytes B ex vivo .....</b>	<b>119</b>
<b>Figure 57 : Effet de la combinaison Ibrutinib®+anti-PD-1 sur les lymphocytes T CD4 ex vivo.....</b>	<b>121</b>
<b>Figure 58 : Effet de la combinaison Ibrutinib®+anti-PD-1 sur les lymphocytes T CD8 ex vivo.....</b>	<b>122</b>
<b>Figure 59 : Suivi de la croissance tumoral par imagerie CT lors du traitement anti-PD-L1.....</b>	<b>123</b>
<b>Figure 60 : caractérisation des microvésicules extraites du sérum de souris .....</b>	<b>124</b>

<b>Figure 61 : Effet des thérapies anti-IL-6R et anti-IL-10R sur les lymphocytes B <i>ex vivo</i></b> .....	126
<b>Figure 62 : Effet des thérapies anti-IL-6R et anti-IL-10R sur les lymphocytes T CD4 <i>ex vivo</i></b> .....	127
<b>Figure 63 : Effet des thérapies anti-IL-6R et anti-IL-10R sur les lymphocytes T CD8 <i>ex vivo</i></b> .....	128
<b>Figure 64 : Histologie de rate comparative entre les différents phénotypes Ctrl, LPL et DLBCL</b> .....	129
<b>Figure 65 : Comparaison phénotypique entre LB issus de LPL et de DLBCL</b> .....	130
<b>Figure 66 : Comparaison du nombre de lymphocytes T entre les différents phénotypes Ctrl, LPL et DLBCL</b> .....	131
<b>Figure 67 : Analyse des sous-populations T et de leur niveau d'activation dans les DLBCL</b> .....	132
<b>Figure 68 : Analyse des marqueurs d'épuisement T dans les DLBCL</b> .....	133
<b>Figure 69 : Taux d'infiltration des Tregs dans les tumeurs DLBCL-like versus LPL-like</b> .....	134
<b>Figure 70 : Histologie normale et pathologique du rein</b> .....	135
<b>Figure 71 : Histologie et biochimie comparative du rein entre souris LPL-like et DLBCL-like</b> .....	137
<b>Figure 72 : Structure histologique du foie chez la souris</b> .....	138
<b>Figure 73 : Caractérisation des atteintes hépatiques dans le modèle <i>Myd88<sup>L252P</sup>-Cd19<sup>cre</sup></i></b> .....	140

## Table des tableaux

---

<b>Tableau 1 : Récapitulatifs des principales caractéristiques des lymphomes B cités ...</b>	<b>55</b>
<b>Tableau 2 : Liste des panels d'anticorps utilisés pour les marquages de surface .....</b>	<b>99</b>
<b>Tableau 3 : Liste des panels d'anticorps utilisés pour l'analyse des cytokines .....</b>	<b>100</b>
<b>Tableau 4 : Liste des panels d'anticorps utilisés pour l'analyse des traitements ex vivo .....</b>	<b>102</b>
<b>Tableau 5 : Critères de réponse/non-réponse au traitement Ibrutinib® .....</b>	<b>114</b>

## Table des abréviations

---

### A

**Ac** : Anticorps  
**ADCC** : Toxicité cellulaire induite par anticorps  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**Ag** : Antigène  
**AID** : Cytidine déaminase induite par activation  
**AKT** : Protéine kinase B  
**APRIL** : Ligand inducteur de prolifération A  
**ARID1A** : Protéine à domaine riche en AT 1A

### B

**BAFFR** : Récepteur du facteur d'activation du lymphocyte B  
**BACH2** : Domaine BTB et homologue CNC 2  
**BCL6** : Protéine du lymphome B 6  
**BCR** : Récepteur du lymphocyte B  
**BER** : Réparation des excisions basiques  
**BLIMP1** : Protéine de maturation B 1  
**BLNK** : jonction du lymphocyte B  
**BMP4** : Protéine morphogénétique osseuse 4  
**BSA** : Albumine de sérum bovin  
**BTK** : Tyrosine kinase de Bruton

### C

**CCND1** : Cycline D1  
**CCND3** : Cycline D3  
**CDC** : Cytotoxicité dépendante du complément  
**CDK4** : Kinase dépendante des cyclines 4  
**CDK6** : Kinase dépendante des cyclines 6  
**CDKN2A** : inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines 2A

**CG** : Centre germinatif  
**CMH I** : Complexe majeur d'histocompatibilité I  
**CMH II** : Complexe majeur d'histocompatibilité II  
**CPA** : Cellule présentatrice d'antigène  
**CSH** : Cellule Souche Hématopoïétique  
**CSR** : Recombinaison de classe  
**CXCL-12** : C-X-C motif chemokine ligand 12  
**CXCL-13** : C-X-C motif chemokine ligand 13  
**CXCR4** : Récepteur de chimiokine C-X-C 4  
**CXCR5** : Récepteur de chimiokine C-X-C 5  
**C/EBP $\alpha$**  : Protéine de liaison à l'enhancer CCAAT  $\alpha$

### D

**DAB** : Diaminobenzidine  
**DAG** : Diacylglycérol  
**DC** : Cellule dendritique  
**DCIR2** : Récepteur inhibiteur CLR DC 2  
**DD** : Domaine de mort  
**DLBCL** : Lymphome diffus à grandes cellules B  
**DLBCL-ABC** : DLBCL de sous-type B activés  
**DLBCL-GCB** : DLBCL de sous-type B du CG  
**DLL1** : Protéine delta like 1  
**DN** : Double négatif  
**DP** : Double positif

### E

**EBV** : Virus d'Epstein Barr  
**EDTA** : Ethylènediaminetétraacétique  
**EdU** : 5-ethynyl-2'-déoxyuridine



**EPS** : Electrophorèse des protéines sériques

## F

**FDC** : Cellules dendritiques folliculaires

**FOXP1** : Protéine à tête de fourche 1

**FOXP3** : Protéine à tête de fourche 3

## H

**HES** : Hématoxyline, éosine, safran

**HRP** : Peroxydase du raifort

## I

**ICAM** : Molécule d'adhésion intercellulaire 1

**ID2** : Inhibiteur de liaison à l'ADN 2

**ID3** : Inhibiteur de liaison à l'ADN 3

**IFN $\gamma$**  : Interféron  $\gamma$

**Ig** : Immunoglobuline

**IGH** : Locus de chaînes lourdes d'immunoglobulines

**IGL** : Locus de chaînes légères d'immunoglobulines

**IHC** : Immunohistochimie

**IL-1 $\beta$**  : Interleukine 1 $\beta$

**IL-1R** : Récepteur de l'interleukine 1

**IL-2** : Interleukine 2

**IL-4** : Interleukine 4

**IL-6** : Interleukine 6

**IL-6R** : Récepteur de l'IL-6

**IL-7** : Interleukine 7

**IL-9** : Interleukine 9

**IL-10** : Interleukine 10

**IL-10R** : Récepteur de l'IL10

**IL-13** : Interleukine 13

**IL-15** : Interleukine 15

**IL-21** : Interleukine 21

**IL-23** : Interleukine 23

**IL-34** : Interleukine 34

**IP3** : Inositol-3-phosphate

**IRAK1** : Récepteur de l'interleukine 1 associé aux kinases 1

**IRAK2** : Récepteur de l'interleukine 1 associé aux kinases 2

**IRAK4** : Récepteur de l'interleukine 1 associé aux kinases 4

**IRF4** : Facteur de régulation de l'interferon 4

**ITAM** : Motif d'activation des immunorécepteurs à base de tyrosine

**ITPK1** : Inositol-tétrakinophosphate-1-kinase

## J

**JNK** : c-Jun N-terminal Kinases

## L

**LB** : Lymphocyte B

**LCK** : Lymphocyte spécifique protéine kinase

**LCM** : Lymphome à cellules du manteau

**LF** : Lymphome folliculaire

**LFA1** : Fonction lymphocytaire associée à l'antigène 1

**LLC** : Leucémie lymphoïde chronique

**LLP** : Lymphome lymphoplasmocytaire

**LT** : lymphocyte T

**LUBAC** : Complexe d'association des chaînes d'ubiquitine

**LZM** : Lymphome de la zone marginale

## M

**MALT** : Lymphome des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses

**MAPK** : Protéine kinase activée par mitose

**MGUS** : Gammopathie monoclonale de significativité inconnue

**MM** : Myélome multiple

**MW** : Maladie de Waldenström

**MYD88** : Facteur de différenciation myéloïde primaire 88

**MZ** : Zone marginale

**M-CSF** : Facteur de stimulation des colonies de macrophages

## N

**NEMO** : Modulateur essentiel de NFκB

**NFAT** : Facteur nucléaire d'activation des lymphocytes T

**NFκB** : Facteur nucléaire κB

**NHEJ** : Jonction des extrémités non-homologues

**NIK** : « Facteur nucléaire κB inducteur de kinase

**NK** : Cellule tueuse naturelle

**NOTCH2** : Récepteur NOTCH 2

## O

**ORF** : Cadre de lecture ouvert

## P

**PBS** : Tampon phosphate salin

**PDPK1** : Kinase dépendante du phosphoinositide 1

**PFA** : Paraformaldéhyde

**PGM** : Précurseur granuleux/monocytaire

**PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase

**PIP3** : Phosphatidyl-inositol-3-phosphate

**PI(4,5)P<sub>2</sub>** : Phosphatidyl-inositol -4,5-biphosphate

**PLC** : Progéniteur lymphoïde commun

**PLCγ2** : Phospholypase Cγ2

**PMA** : Phorbol 12-myristate 13-acétate

**PMC** : Précurseur myéloïde commun

**PRR** : Récepteur de reconnaissance des pathogènes

**PAX5** : Boîte 5 appariée

## R

**RAG1** : Gène d'activation de la recombinaison 1

**RAG2** : Gène d'activation de la recombinaison 2

**RHD** : Domaine d'homologie REL

**RSS** : Signal de recombinaison

## S

**S1P** : Sphingosine-1-phosphate

**S1PR1** : Récepteur 1 de la sphingosine-1-phosphate

**SCF** : Facteur de cellules souches

**SHM** : Hypermutation somatique

**SMARCA4** : Activateur de transcription BRG1

**SNC** : Système nerveux central

**SOX11** : Facteur de transcription boîte 11

**SP** : Simple positif

**SYK** : Kinase des tyrosines splénique

## T

**TA** : Température ambiante

**TAB1** : Protéine de liaison du TGFβ activé 1

**TAB2** : Protéine de liaison du TGFβ activé 2

**TACI** : Activateur transmembranaire interactif CAML

**TAK1** : Protéine kinase kinase kinase activée par mitose 7

**TAM** : Macrophages associés à la tumeur

**TCR** : Récepteur des lymphocytes T

**TEC** : Cellules corticales thymiques

**TFh** : Lymphocyte T folliculaire de soutien

**TGFβ** : Facteur de croissance tumorale β

**TIR** : Récepteur Toll/Interleukine-1 TAD : « Domaine de transactivation Domain

**TLR** : Récepteurs Toll-like Receptors

**TNFAIP3** : Protéine induite par le facteur de nécrose tumoral 3

**TP53** : Protéine tumorale 53

**TRAF6** : Facteur 6 associé au récepteur du TNF

**Treg** : Lymphocyte T régulateur

**UNG** : Uracile ADN glycosylase

**U**

**VCAM1** : Protéine d'adhésion vasculaire 1

**VIH** : Virus d'immunodéficience humaine

**V**



# Introduction

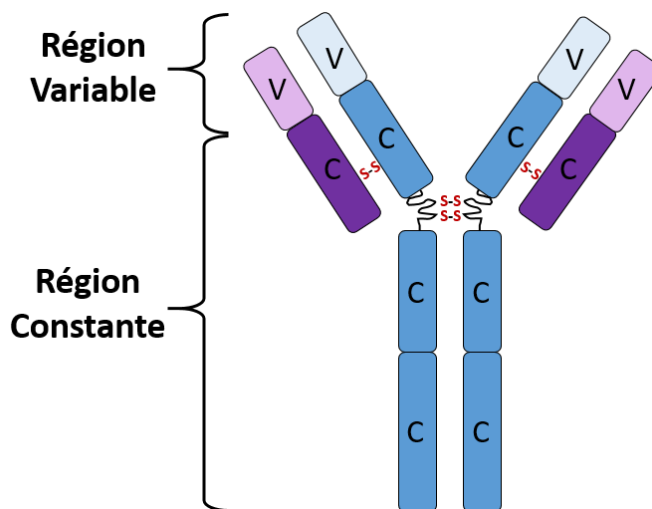
---

## Chapitre I. Développement normal des lymphocytes B

Le système immunitaire est un système de défense complexe que les organismes vivants déploient pour se protéger des agressions pathogènes. Chez les organismes plus évolués tels que les mammifères, on distingue un système immunitaire inné, dont la réponse est rapide et non-spécifique ; d'un système immunitaire adaptatif qui se met en place plus tardivement mais dont l'action est spécifique du pathogène impliqué. Le lymphocyte B est une cellule immunitaire se trouvant à l'interface entre les systèmes immunitaires innés et adaptatifs, et nous allons dans ce chapitre nous intéresser à son développement.

### A. Définition d'une immunoglobuline

Le rôle prépondérant des lymphocytes B (LB) dans le système immunitaire provient de leur capacité à produire des immunoglobulines (Ig). Ces immunoglobulines peuvent être exprimées à la membrane des LB, on parlera alors de Récepteur des Cellules B (BCR) ; ou bien être sécrétées sous forme libre, et on parlera plutôt d'anticorps (Ac). Communément, les Ig sont décrites comme des complexes protéiques composés de deux chaînes lourdes identiques et deux chaînes légères identiques toutes liées entre elles par des ponts disulfures (**Figure 1**).



**Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline**

Schéma détaillant la structure d'une Ig avec ses deux chaînes lourdes (bleues) et ses deux chaînes légères (violette). Les quatre chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures et contiennent une région constante (3 domaines C pour les chaînes lourdes, 1 pour les chaînes légères) ; surmontée d'une région variable.

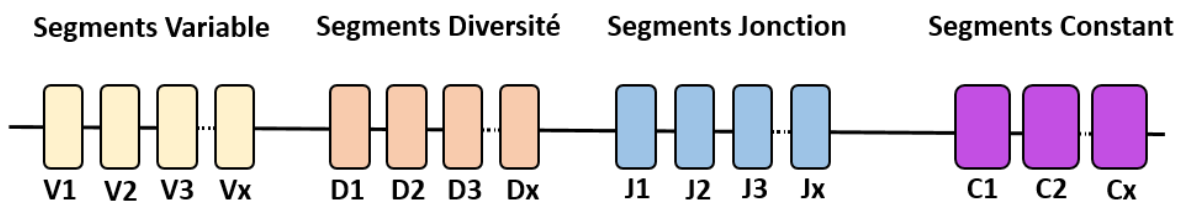
Au niveau moléculaire, il existe plusieurs gènes qui codent pour les chaînes lourdes d'Ig appelées  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  et qui correspondent respectivement aux isotopes IgA, IgD, IgE, IgG et IgM. Pour les chaînes légères, il existe deux isotopes  $\kappa$  (kappa) et  $\lambda$  (lambda). Comme présenté en Figure 1, chaque chaîne comporte un domaine constant (C) et un domaine variable (V) ; c'est ce domaine variable qui permettra la reconnaissance de l'antigène. Au niveau du BCR, le domaine constant va lui permettre la transduction de signaux intracellulaires.

Le BCR est un complexe multi-protéique composé d'une immunoglobuline de surface associée à deux chaînes protéiques intracytosoliques ancrée à la membrane : les chaînes Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  (aussi appelées CD79a et CD79b. Grâce à ces deux chaînes, le BCR une fois stimulé via son immunoglobuline va être capable d'induire des signaux favorisant la survie et la prolifération de la cellule.

## B. Génétique des immunoglobulines

### 1. Les chaînes lourdes d'Ig

Le locus IgH codant pour les chaînes lourdes d'Ig se situe sur le chromosome 14 chez l'homme, 12 chez la souris. Il comporte une multitude de segments géniques : 54 segments Variables (V), 27 segments Diversité (D), 6 segments Jonction (J) et 9 segments Constants (C) (**Figure 2**).



**Figure 2 : Structure du locus de chaînes lourdes d'Ig (locus IgH)**

Le locus IgH contient 54/107 segments Variables (V), 27/10 segments Diversité (D), 6/4 segments Jonction (J) et 9/8 segments Constants (C) ; respectivement chez l'homme et chez la souris.

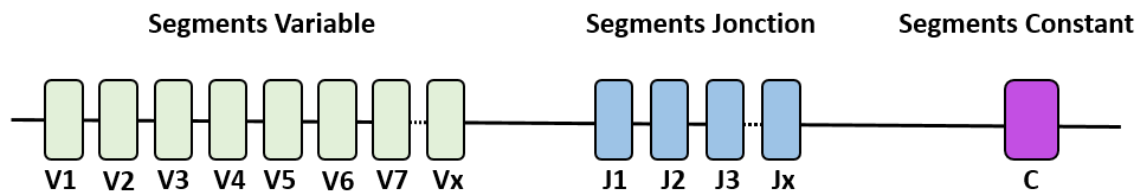
Ces segments ne sont pas exprimés en tant que tel. En effet une région variable correcte est constituée d'un segment V assemblé à un segment D et un segment J. Par conséquent, un processus de maturation génétique va d'abord avoir lieu pour pouvoir conduire à l'expression de la région variable ; ce mécanisme est appelé la recombinaison VDJ.

### 2. Les chaînes légères d'Ig

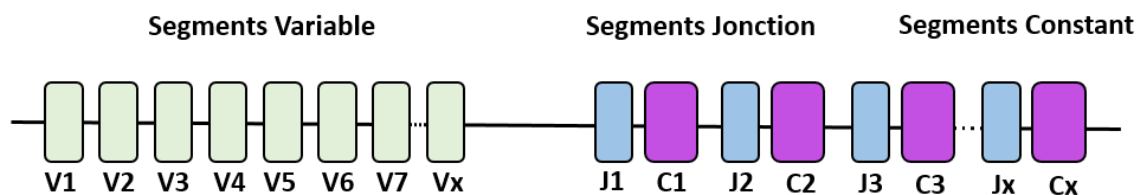
Comme déjà cité plus haut, il existe deux types de chaînes légères, les chaînes  $\kappa$  et  $\lambda$  codées respectivement par les loci IGK et IGL.

Le locus IGK est situé sur le chromosome 2 chez l'homme, 6 chez la souris ; le locus IGL est quant à lui situé sur le chromosome 22 chez l'homme, 16 chez la souris. Les chaînes légères d'Ig ne possèdent pas de segments D. En revanche, la partie variable sera caractérisée par des segments de variabilité et de jonction. Le locus IGK possède un segment constant, alors que le locus IGL en possède trois (**Figure 3**).

## Locus Ig $\kappa$



## Locus Ig $\lambda$



**Figure 3 : Structure des locus de chaînes légères d'Ig (locus Ig $\kappa$  et Ig $\lambda$ )**

Le locus Ig $\kappa$  contient 40/93\* segments Variables (V), 5/4\* segments Jonction (J) et 1 segment Constant (C). Le locus Ig $\lambda$  contient quant à lui 73-74/3\* segments V, 7-11/6\* segments J et autant de segments C car chaque segment C est précédé d'un segment J.

\*Respectivement chez l'homme et chez la souris.

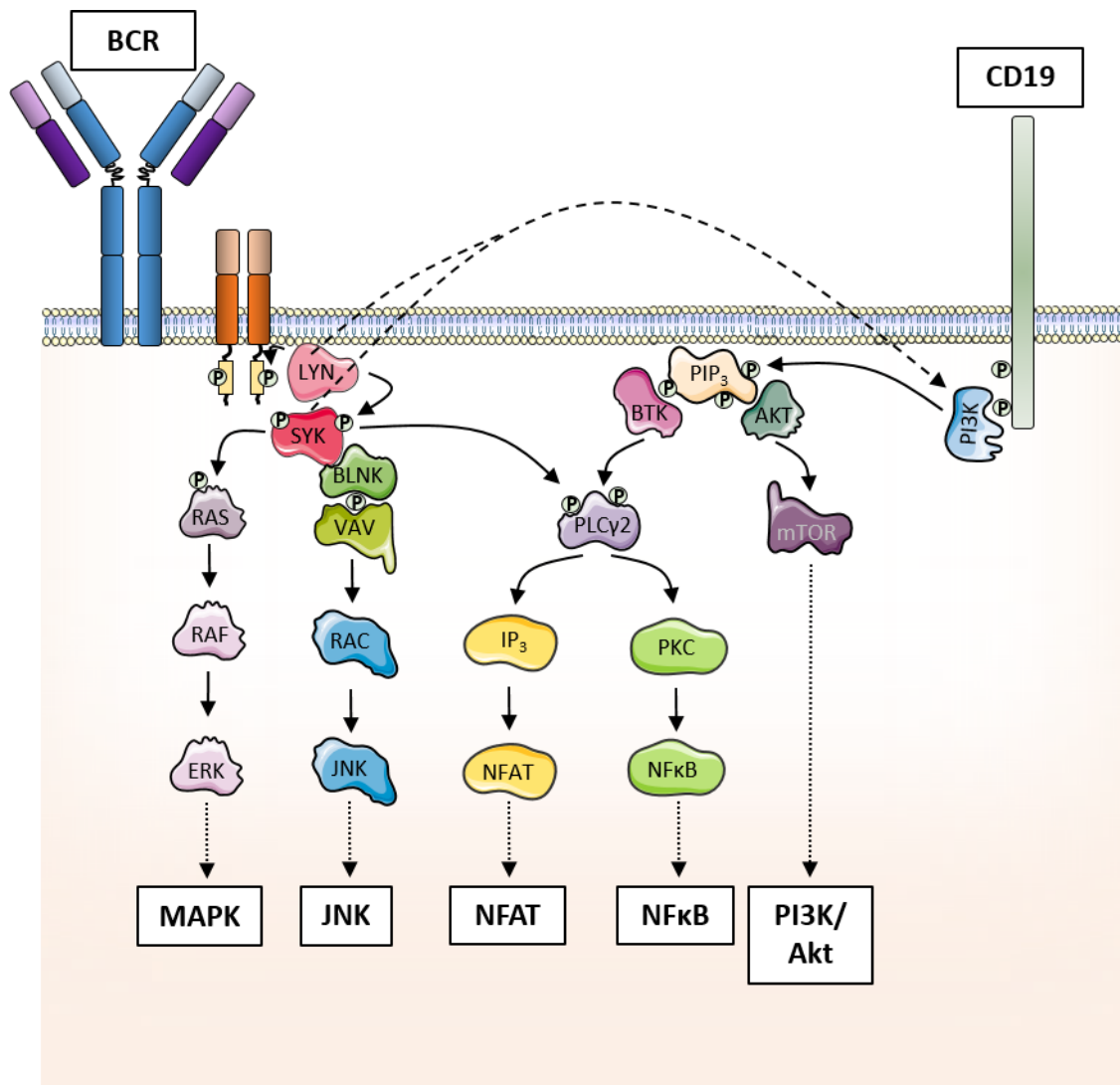
### **C. Les voies de signalisation régulatrices du lymphocyte B**

#### **1. La signalisation du BCR**

Lorsque le BCR reconnaît l'antigène, il forme à la membrane du LB un cluster composé de plusieurs complexes BCR. Ce regroupement de BCR concentre les parties C-terminales des chaînes Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  dans le cytoplasme contenant des motifs d'activation à tyrosines des récepteurs (ITAM) qui permettent le recrutement de kinases telles que LYN. LYN phosphoryle le domaine ITAM des chaînes Ig $\alpha$  et Ig $\beta$  et ainsi permet le recrutement de SYK. SYK une fois phosphorylée par LYN est capable de phosphoryler elle-même plusieurs effecteurs : RAS, qui une fois activée déclenche la voie des MAPK ; et BLNK/VAV qui activent la voie JNK.

LYN et SYK phosphorylent également la partie C-terminale du marqueur CD19. Ce changement au niveau de CD19 permet le recrutement de PI3K, qui produira du phosphatidylinositol-3-phosphate (PIP3) à partir du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) présent dans la membrane plasmique. PIP3 active d'une part la voie PI3K/AKT ; et d'autre part recrute la Tyrosine Kinase de Bruton (BTK). BTK en association avec SYK phosphoryle PLC $\gamma$ 2 et ainsi induit la production d'inositol-3-phosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG). IP3 et DAG permettront respectivement l'activation des facteurs de transcription *NFAT* et *NF $\kappa$ B* (Puri et al., 2013) (**Figure 4**).

La voie du BCR permet l'activation de nombreuses voies de survie et de prolifération, et constitue donc un signal essentiel à la survie des LB.



**Figure 4 : La signalisation de la voie du BCR**

Lorsque le BCR est stimulé, LYN est recrutée et va phosphoryler les chaînes Ig $\alpha$  et Ig $\beta$ . SYK est alors recrutée, une fois phosphorylée par LYN elle va activer la voie MAPK (RAS/RAF/ERK) et la voie JNK (RAC/JNK) via l'intermédiaire de BLNK et VAV. LYN et SYK phosphorylent le domaine C-ter de la protéine transmembranaire CD19, qui recrute P13K. P13K initie la voie PI3K/AKT et produit du PIP<sub>3</sub>. BTK se fixe à PIP<sub>3</sub> et en association avec SYK phosphoryle PLCy2, qui active la voie NFAT (via IP<sub>3</sub>) et NFkB (via PKC). Adapté d'après KD. Puri *et al.* 2013.

## 2. La signalisation des récepteurs Toll-like (TLRs) et la voie NFkB

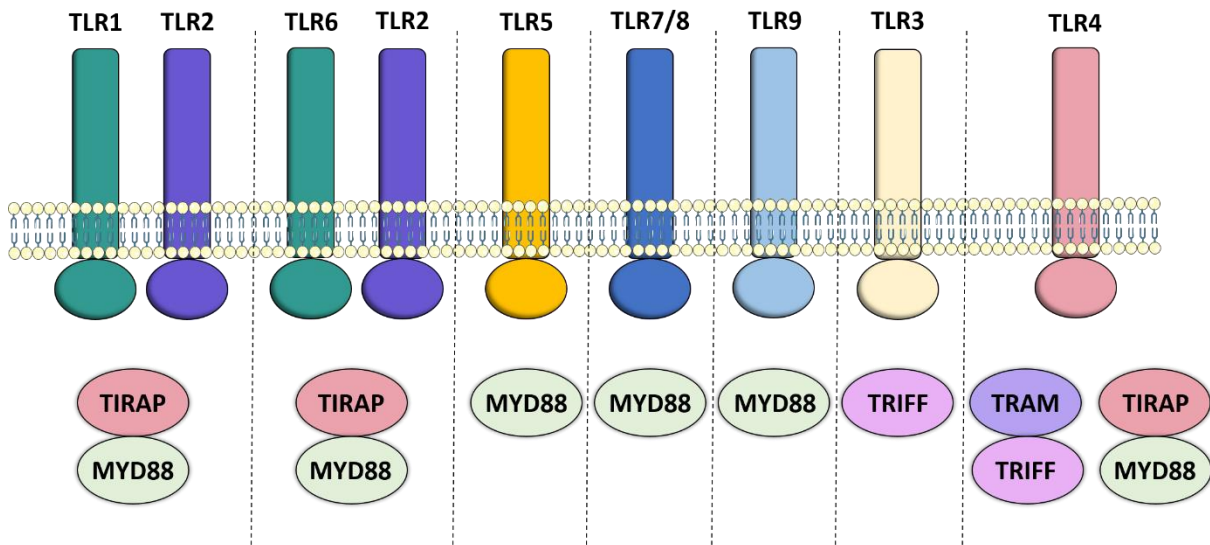
Les TLRs sont des récepteurs impliqués dans l'immunité innée puisqu'ils vont reconnaître différents composants pathogènes comme des protéines bactériennes par exemple. La famille des TLRs regroupe en réalité 9 récepteurs différents, chacun ayant un rôle bien précis.



### a. Signalisation des TLRs

Une fois que le TLR a fixé son ligand, il se dimérise ; il peut s'agir d'une homodimérisation ou bien d'une hétérodimérisation avec un autre TLR. Le TLR2 par exemple peut s'hétérodimériser avec le TLR1 ou le TLR6, les autres TLRs en revanche vont s'homodimériser (McInturff et al., 2005).

Lorsque deux TLRs se dimérisent, ils forment un site favorable au recrutement de protéines adaptatrices telles que MYD88 (MYD88 peut fixer tous les TLRs, excepté le TLR3). Avant de poursuivre, il faut noter que même si ce manuscrit s'étend largement sur le cas de MYD88, il existe en réalité 5 protéines adaptatrices impliquées dans la signalisation d'un ou plusieurs TLRs. On retrouve MYD88, MAL, TRAM, TRIF et SARM (**Figure 5**).



**Figure 5 : Les TLRs et leur protéines adaptatrices**

Les TLRs 1/2 et 6/2 s'hétérodimérisent et recrutent les protéines adaptatrices TIRAP et MYD88. Les TLRs 5, 7, 8 et 9 s'homodimérisent et recrutent MYD88. Le TLR3 est le seul à être MYD88 indépendant, il recrute l'adaptateur TRIFF. Enfin, le TLR4 peut recruter les couples TRAM/TRIFF ou TIRAP/MYD88. Adapté d'après *cusabio.com*.

MYD88 est composée de trois domaines distincts :

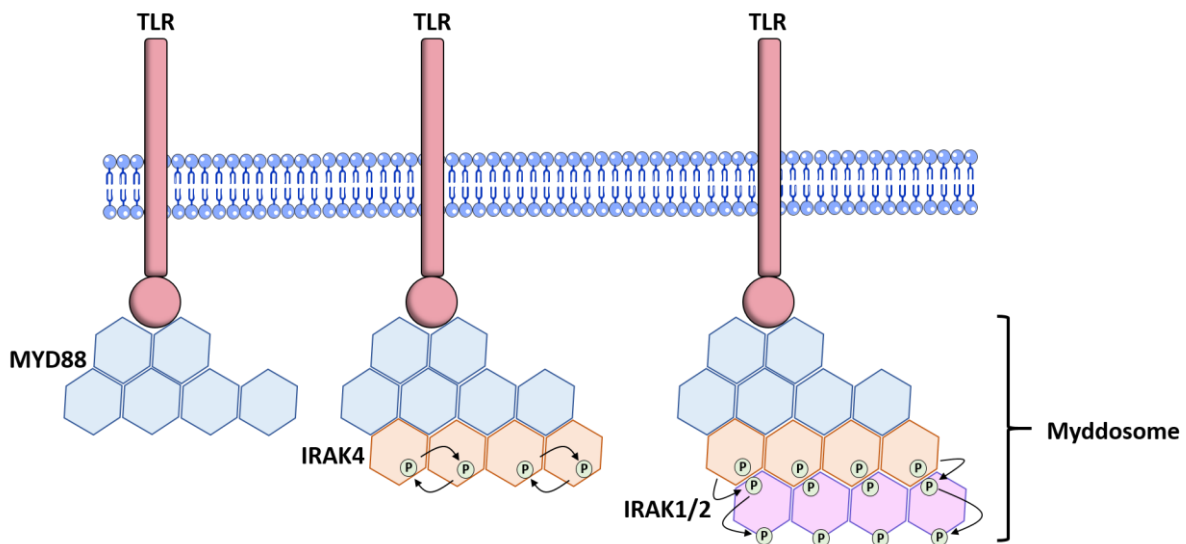
- Un domaine de mort « Death Domain » (DD) constitué des acides aminés 1 à 110. Le DD est un domaine avant tout connu comme étant impliqué dans les signalisations conduisant à l'apoptose cellulaire, d'où son nom. Dans le cas de MYD88, la signalisation n'est pas directement liée à la mort cellulaire mais plutôt à la réponse immunitaire innée. En effet, le domaine DD va permettre à MYD88 de fixer les effecteurs en aval de la signalisation des TLRs.
- Un domaine intermédiaire (ID), des acides aminés 110 à 155.
- Et enfin un domaine « Toll/Interleukine-1-Receptor » (TIR), des acides aminés 155 à 296. Ce domaine TIR est structurellement composé de 5 feuillets  $\beta$  surmontés de 4 hélices  $\alpha$ . C'est ce domaine qui va permettre la liaison de MYD88 aux TLRs.

MYD88 est ainsi recrutée au niveau de la région intracytosolique des TLRs via son domaine TIR. Dans les faits, ce n'est pas une unique protéine MYD88 qui est recrutée mais

plutôt un complexe, homo ou hétéroprotéique. Dans le cas le plus simple, 6 à 8 protéines MYD88 sont recrutées au niveau du récepteur pour initier la formation d'un complexe appelé le Myddosome.

Cet ensemble étant relativement stable, le second domaine de MYD88, le domaine DD, va avoir l'occasion de fixer une protéine appelée IRAK4 (« Interleukine 1 Receptor Associated Kinase 4 »). Encore une fois dans les faits ce sont 4 enzymes IRAK4 qui sont recrutées. IRAK4 va alors s'auto-phosphoryler, ce qui induit un changement de conformation permettant à présent le recrutement de 4 enzymes IRAK1 (Ferraro et al., 2014). IRAK4 phosphoryle alors IRAK1, initiant son activation et lui permettant de s'auto-hyperphosphoryler.

Il existe une enzyme IRAK2 dont le rôle est similaire voir redondant à celui de IRAK1. Il est établi que IRAK1 n'est pas nécessaire à la formation du myddosome, alors que IRAK2 est lui nécessaire non pas pour initier la réaction mais plutôt pour que cette dernière perdure à plus long terme. Manifestement, le choix entre IRAK1 ou IRAK2 en ce qui concerne la formation du complexe serait une question de cinétique enzymatique et de stabilité protéique, qui font que IRAK1 est disponible en premier lors de l'activation des TLRs et qu'il est ensuite remplacé par IRAK2 qui est plus stable (Kawagoe et al., 2008)(Figure 6).



**Figure 6 : La formation du Myddosome**

Lorsque les TLRs sont stimulés, ils recrutent jusqu'à 6 protéines adaptatrices MYD88. MYD88 recrute à son tour 4 sous-unités IRAK4 qui s'activent par auto-phosphorylation. 4 sous-unités IRAK1 ou 2 se fixent ensuite à IRAK4 qui vont les phosphoryler. Enfin, les sous-unités IRAK1/2 vont s'auto-phosphoryler pour achever leur activation. Cet ensemble constitue le complexe nommé Myddosome. D'après Peirera M. *et al.* 2023.

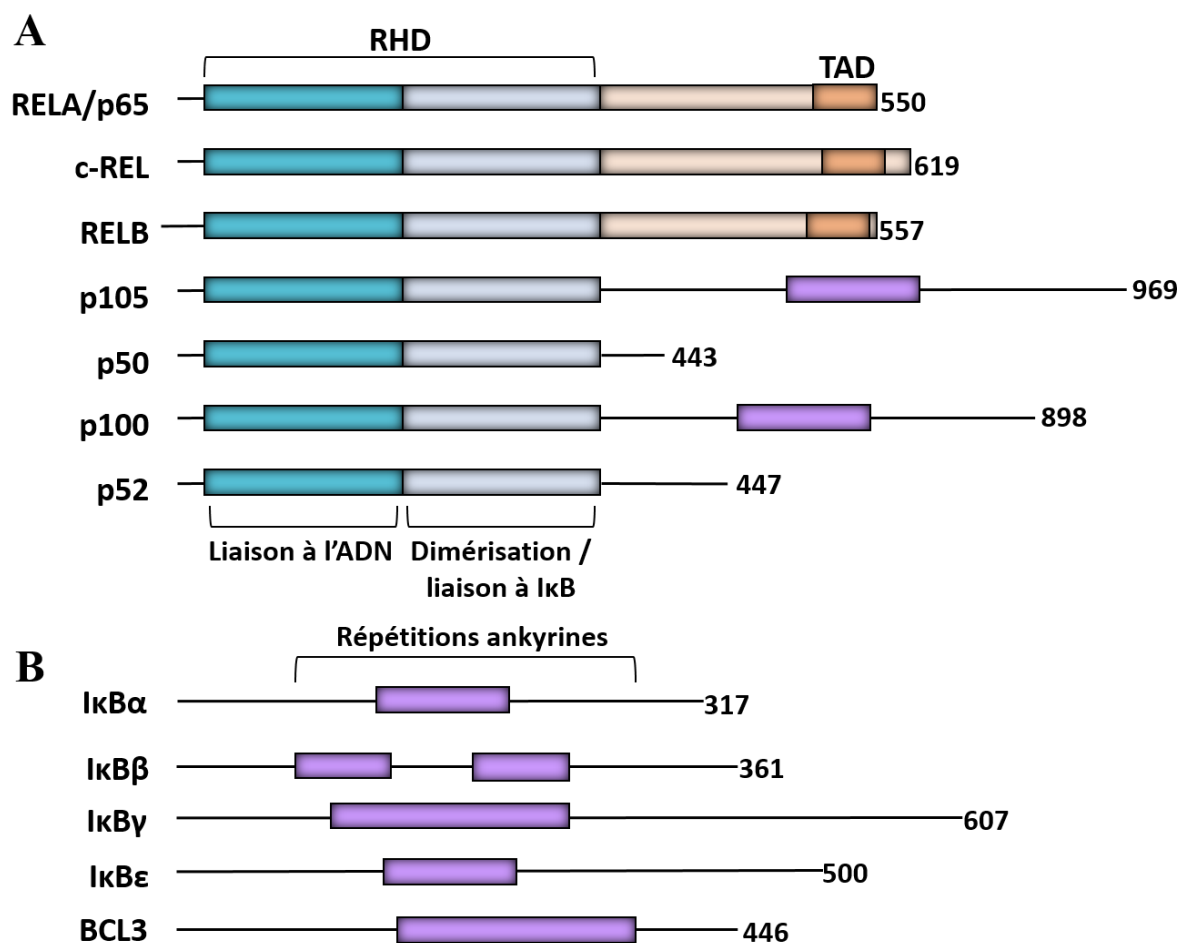
## **b. La voie NFκB**

Comme nous venons de le voir la voie NFκB est intimement liée à la signalisation des TLRs passant par MYD88. Cette voie porte le nom de son effecteur principal, le facteur NFκB. En réalité, il existe plusieurs sous-unités différentes qui vont se combiner entre elles pour former ce facteur NFκB. On va retrouver les sous unités RELA/p65 ; c-REL ; RELB ; p105 ; p50 ; p100 et p52 (Figure 7A).

Chacune de ces sous-unités comporte un domaine de liaison à l'ADN « REL Homology-Domain » (RHD) ; mais seules les sous-unités RelA, RelB et c-REL comportent le domaine de transactivation (TAD) permettant de fixer des co-facteurs de transcription (Chen & Greene, 2004).

Il existe deux voies de signalisation NFκB, une voie canonique faisant intervenir le couple RelA-p50 ; et une voie non-canonique passant par un facteur RelB-p52.

En absence de stimuli, quelle que soit la voie et donc le couple NFκB impliqué, ce dernier est retenu dans le cytoplasme afin d'inhiber son activité de facteur de transcription. Cette séquestration est rendue possible par l'inhibiteur IκB qui regroupe 5 isoformes : IκBα ; IκBβ ; IκBγ ; IκBε et BCL3 (**Figure 7B**).



**Figure 7 : Les sous-unités NFκB et leurs inhibiteurs**

**A** : Structure des sous-unités composants le facteur de transcription NFκB. Chaque sous-unité comporte un domaine RHD, qui permet la liaison à l'ADN et qui contient le site de fixation de l'inhibiteur IκB. Seuls RELA, RELB et c-REL possèdent le domaine TAD permettant de fixer les cofacteurs de transcription. **B** : Structure des différents inhibiteurs de NFκB. Chacun d'entre eux comporte plusieurs répétitions ankyrines, qui permettent la liaison aux sous-unités NFκB.

A noter que les formes précoces p105 et p100 de p50 et p52 respectivement vont également retenir RelA et RelB dans le cytoplasme, le complexe ne sera transloqué au noyau que lorsque ces formes précoces seront clivées en formes actives p50 et p52.

#### **i. La voie canonique de NFκB**

La voie canonique de NFκB est entre autre initiée par la signalisation des TLRs impliquant MYD88. En cas de stimulation, par exemple celle des TLRs ou de l'IL1R ; la cascade induite va comme cité ci-avant conduire à la formation du myddosome. Le myddosome permet au final une pleine activation de IRAK1/2 qui, grâce à des domaines protéiques dans sa partie C-terminale appelées TBM, recrute un effecteur appelé TRAF6 (« TNF Receptor Associated Factor 6 »). Ainsi stabilisé, TRAF6 va s'auto-ubiquitiner en position K63 afin de s'auto-activer. Une fois activé, TRAF6 quitte la proximité du myddosome pour rejoindre le cytosol pour être recruté par TAB1 et TAB2 qui favorisent l'interaction de TRAF6 avec l'enzyme TAK1. TRAF6 ubiquitine en position K63 TAK1, qui, comme la plupart des effecteurs de cette cascade, s'auto-phosphoryle pour s'activer puis ensuite phosphoryle les unités du complexe IKK (« IκB Kinase ») constitué de 3 sous-unités IKKα, IKKβ et NEMO.

Si la sous-unité NEMO ne comporte pas de domaine catalytique, elle est malgré tout nécessaire au fonctionnement du complexe IKK. Il semblerait que la poly-ubiquitination en chaîne de NEMO par le complexe LUBAC favorise fortement sa co-localisation avec TAK1 d'une part ; et modifie d'autre part sa conformation de manière à activer les sous-unités IKKα et IKKβ lors de la formation du complexe (Grubisha et al., 2010).

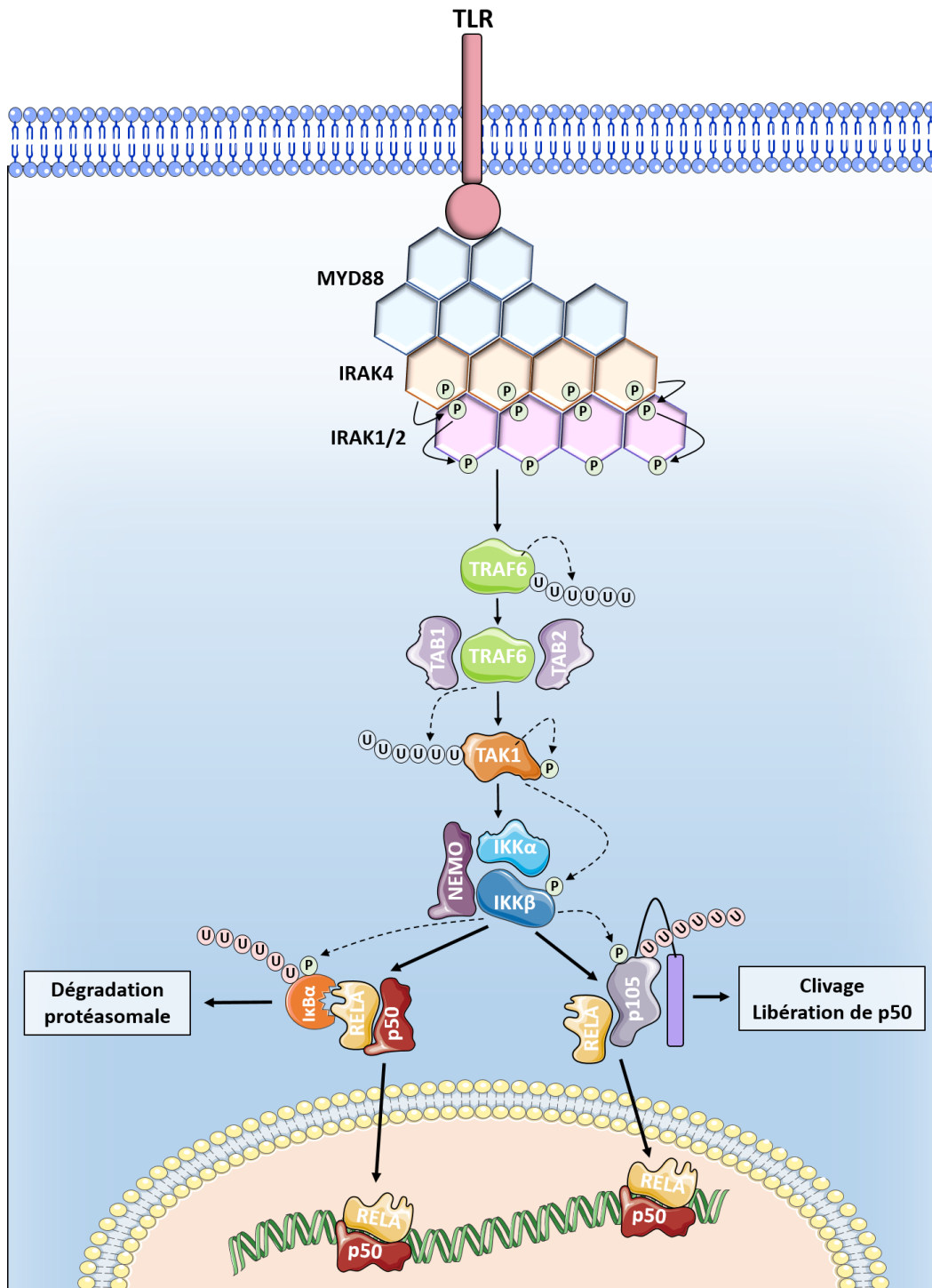
L'activation de la sous-unité IKKβ permet à cette dernière de phosphoryler l'inhibiteur IκBα, rendant ainsi possible sa dégradation par le protéasome via poly-ubiquitination au site K48. Le facteur NFκB ainsi libéré rejoint le noyau pour jouer son rôle de facteur de transcription (Wertz & Dixit, 2010). De la même manière lorsque c'est la forme inactive p105 qui est liée à RelA, celle-ci va être ubiquitinée. Selon les circonstances, elle sera soit entièrement dégradée au niveau du protéasome, soit clivée pour libérer la forme p50 active (**Figure 8**).

#### **ii. La voie non-canonique de NFκB**

La voie non-canonique de NFκB est issue de la stimulation de récepteurs différents de ceux impliqués dans la voie canonique. On va par exemple retrouver le récepteur BAFFR, le récepteur du CD40 Ligand, etc...

Ici le couple mis en jeu est RelB-p52. Dans la majorité des cas, c'est la sous-unité précoce p100 qui retient RelB dans le cytoplasme. Lorsqu'il y a stimulation des récepteurs, cela va conduire à l'activation d'un effecteur appelé NIK (« NFκB Inducing Kinase »). NIK active par phosphorylation la sous-unité IKKα, qui elle-même phosphoryle p100. Une fois p100 phosphorylé cela initie son activation qui sera poursuivie par ubiquitination et qui se terminera par le clivage de la protéine et la libération de sa forme active p52 (Xiao et al., 2004).

Une fois libéré, le dimère RelB-p52 est transloqué au noyau pour y exercer son rôle de facteur de transcription. Par ailleurs, les cibles de la voie non-canonique sont différentes de celles de la voie canonique, et il semblerait que la spécificité de cette voie pour certains gènes s'explique par une meilleure affinité de leurs régions promotrices pour la sous-unité RelB-p52

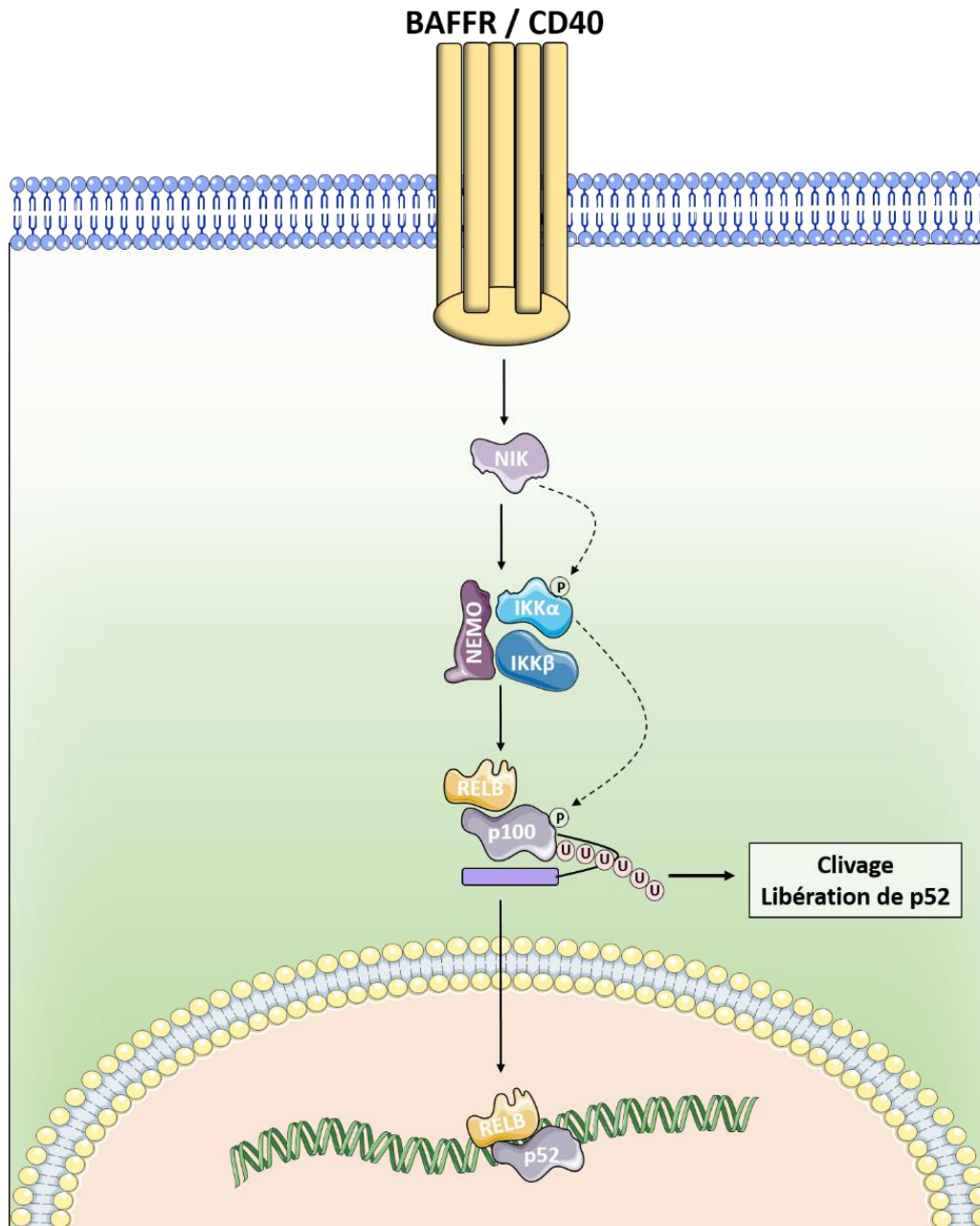


**Figure 8 : Signalisation de la voie NFκB canonique**

Une fois le myddosome formé (MYD88 + IRAK4 + IRAK1/2) il va recruter l'ubiquitine ligase TRAF6. TRAF6 s'active par auto-poly-ubiquitination, est stabilisée par TAB1/2 puis va poly-ubiquitiner TAK1. TAK1 ainsi activé va phosphoryler la sous-unité β du complexe IKK, qui va à son tour phosphoryler IκBα. L'inhibiteur sera poly-ubiquitiné puis dégradé, libérant ainsi le facteur NFκB RELA-p50 qui sera transloqué au noyau. Si c'est p105 qui est lié à RELA, il sera de la même manière poly-ubiquitiné par IKKβ, poly-ubiquitiné puis il sera clivé pour produire sa forme active p50.

(Bonizzi et al., 2004) (**Figure 9**). Enfin, la voie non-canonique de NF $\kappa$ B semblerait fortement impliquée dans le développement et la mise en place des organes lymphoïdes (Dejardin et al., 2002).

Ces voies de signalisation vont avoir un rôle prépondérant tout au long du développement des LB, qui va être détaillé sans plus attendre.



**Figure 9 : Signalisation de la voie NF $\kappa$ B non-canonique**

Lorsque des récepteurs tels que BAFFR ou CD40 sont stimulés, ils recrutent NIK. NIK phosphoryle IKK $\alpha$ , qui va lui-même phosphoryler p100. Cela permet à p100 d'être poly-ubiquitiné, puis finalement clivé pour libérer sa forme active p52. Le couple RELB/p52 est alors transloqué au noyau.

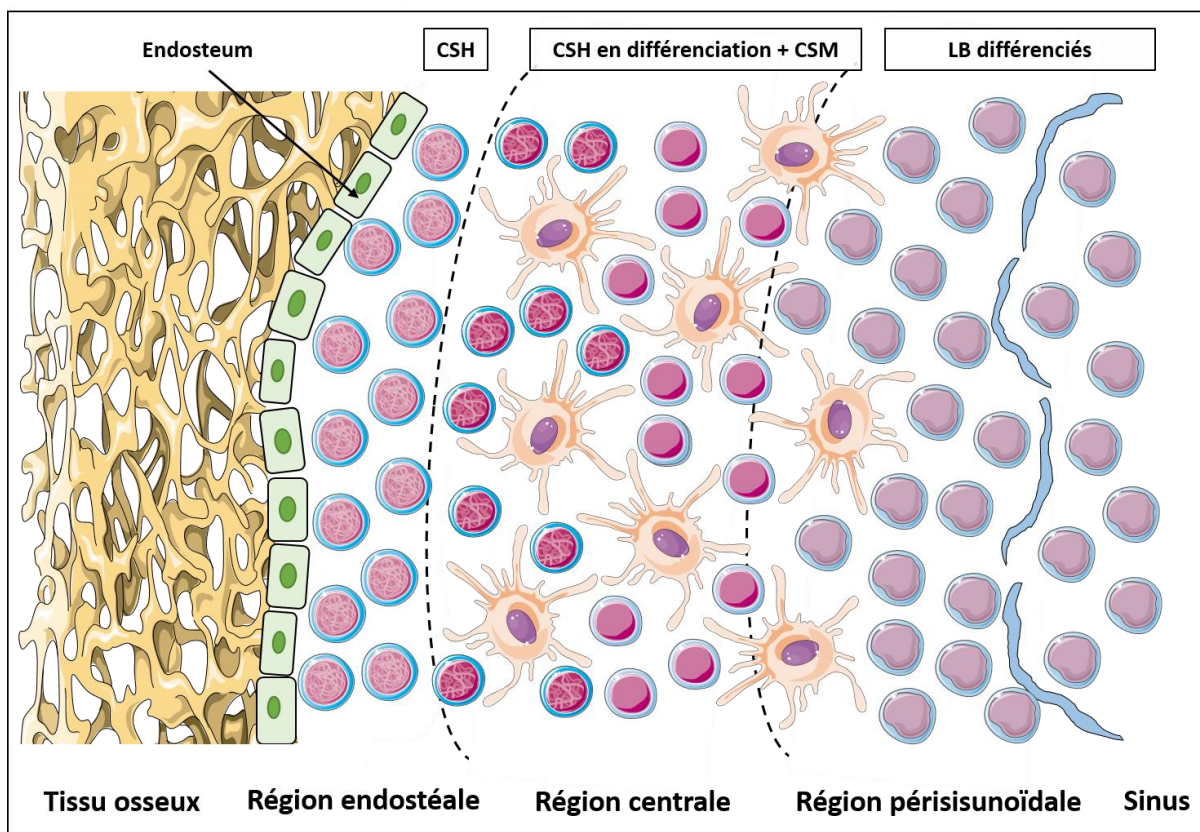
## D. Ontogenèse B

Le développement du LB est un processus complexe qui fait intervenir de nombreux stades de différenciation intermédiaires ainsi que de nombreux systèmes de contrôles. De façon simplifiée on peut diviser ce développement en deux stades : un stade précoce qui prend place dans la moelle osseuse, et un stade tardif qui aura lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, ...).

### 1. Ontogenèse précoce

#### a. La moelle osseuse

La moelle osseuse est le siège des stades de développement les plus précoces du LB. Comme son nom l'indique, elle est contenue au cœur même des os qui constituent la structure des vertébrés. De par son organisation la moelle osseuse dite rouge ou hématopoïétique est adaptée à la lymphomagenèse : à son pourtour on retrouve le tissu osseux, tapissé par un tissu conjonctif appelé endosteum. La couche la plus externe de la moelle osseuse, nommée région endostéale, concentre les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Dans la région



**Figure 10 : Structure schématique de la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse B**

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont concentrées dans la partie distale de l'endostéum, la région endostéale. Les CSH entrant en différenciation rejoignent la région centrale où les cellules stromales médullaires (CSM) fournissent un environnement favorable au processus. Les cellules les plus matures issues de la différenciation des CSH, à savoir les LB différenciés, s'accumulent dans la région périsinguinoïdale en attendant de rejoindre la circulation sanguine via le sinus.

centrale seront retrouvées les cellules hématopoïétiques en cours de différenciation ; et enfin les cellules suffisamment matures pour quitter la moelle osseuse se retrouveront préférentiellement dans la région périsonoïdale (**Figure 10**).

Les cellules stromales médullaires, notamment les cellules réticulaires, vont jouer un rôle prépondérant dans l'hématopoïèse. Ces cellules vont d'abord structurer le tissu médullaire en créant un réseau dense favorable au développement cellulaire ; mais il a également été montré que ces cellules représentent le réservoir principal en ce qui concerne la sécrétion de cytokines et chemokines pro-hématopoïétiques telles que CXCL-12, IL-7, IL-15, IL-34, M-CSF, ou encore BMP-4 (Tikhonova et al., 2019).

## **b. Développement B dans la moelle osseuse**

Les CSH sont des cellules multipotentes qui peuvent potentiellement se différencier en n'importe quelle cellule hématopoïétique et ne sont donc pas les précurseurs spécifiques des LB mais sont cependant les seules à pouvoir se différencier en LB. Les CSH expriment le marqueur souche CD34 (Sidney et al., 2014) et n'expriment pas encore de marqueur de quelque lignage que ce soit, ils sont dits  $Lin^- CD34^+$ . Il est communément admis que les CSH se différencient en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP), qui ont été démontrés comme étant capables de s'engager dans les lignées de différenciation B, T, et NK. Les CLP vont ensuite se différencier en lymphocytes Pré-Pro-B ; il semble par ailleurs que le facteur de transcription *C/EBP $\alpha$*  soit nécessaire pour cette étape (Guo et al., 2018). De plus, à partir de cet instant l'expression du facteur *E2A* est nécessaire à la progression et au maintien du lignage B (Herblot et al., 2002) (**Figure 11**).

### **i. Engagement dans la voie lymphocytaire B**

#### **• Le stade Pré-Pro-B**

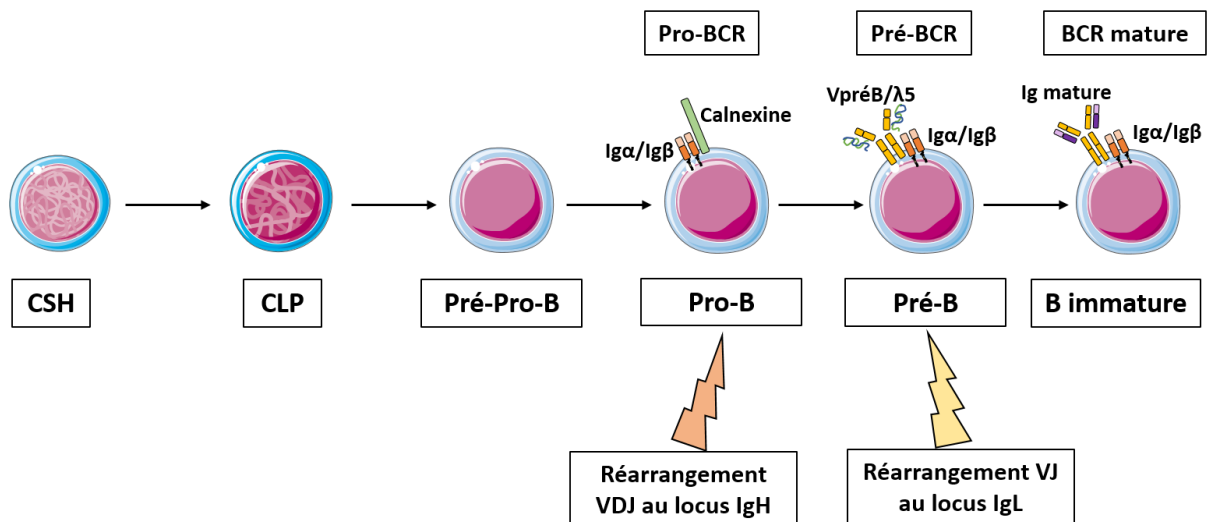
La différenciation en lymphocyte Pré-Pro-B signe le début d'une maturation spécifique de la lignée B. C'est une cellule progénitrice (elle exprime toujours le CD34) qui va exprimer le facteur de transcription clé du développement B : *PAX5*. *PAX5* va d'un côté, réprimer l'expression de gènes qui ne concernent pas le lignage B, et d'un autre côté, activer l'expression des gènes impliqués dans le développement B (Pridans et al., 2008). Plus précisément, *PAX5* permet l'induction de la recombinaison VDJ du locus *IGH* (Zhang et al., 2006).

#### **• Le stade Pro-B**

La recombinaison VDJ des chaînes lourdes d'Ig signe le passage au stade Pro-B. Dans le cas des lymphocytes Pro-B, le BCR exprimé n'est pas mature, il est en fait composé des chaînes  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$  associées à la Calnexine. Ce complexe appelé Pro-BCR permet le maintien du lymphocyte Pro-B en vie le temps qu'il réarrange ses segments V, D et J (Nagata et al., 1997).

La recombinaison VDJ fait intervenir les enzymes RAG1 et RAG2 (Oettinger et al., 1990), Le choix des segments V, D et J utilisés pour la recombinaison est aléatoire. Ces enzymes vont reconnaître des séquences d'ADN spécifiques situées de part et d'autre de chaque segment V, D ou J : les séquences du signal de recombinaison (RSS). Il existe deux types de



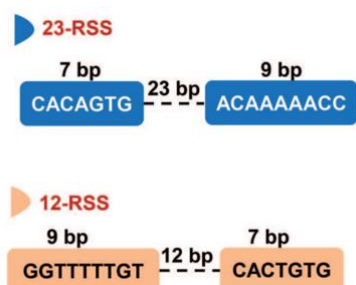


**Figure 11 : Processus schématisé de l'ontogénèse B précoce dans la moelle osseuse**

Les CSH se différencient en CLP, qui donneront elles-mêmes des précurseurs Pré-Pro-B. Les lymphocytes Pré-Pro-B vont commencer à exprimer des facteurs de transcription propres au lignage B, ils forment ainsi des cellules Pro-B. Les Pro-B expriment à leur surface un Pro-BCR primitif constitué des chaînes Igα et Igβ associées à la Calnexine, alors que dans la cellule est initié le réarrangement VDJ sur les locus IgH. Une fois qu'elles expriment les chaînes lourdes d'Ig, ces cellules sont appelées Pré-B. Les Pré-B expriment un pré-BCR qui associe les chaînes lourdes d'Ig avec les pseudo-chaînes légères VpréB et λ5. Les lymphocytes Pré-B réarrangent dans le même temps leurs locus de chaîne légère IgL ; au final les lymphocytes B immatures exprimant correctement un BCR mature pourront poursuivre leur maturation dans les organes lymphoïdes secondaires.

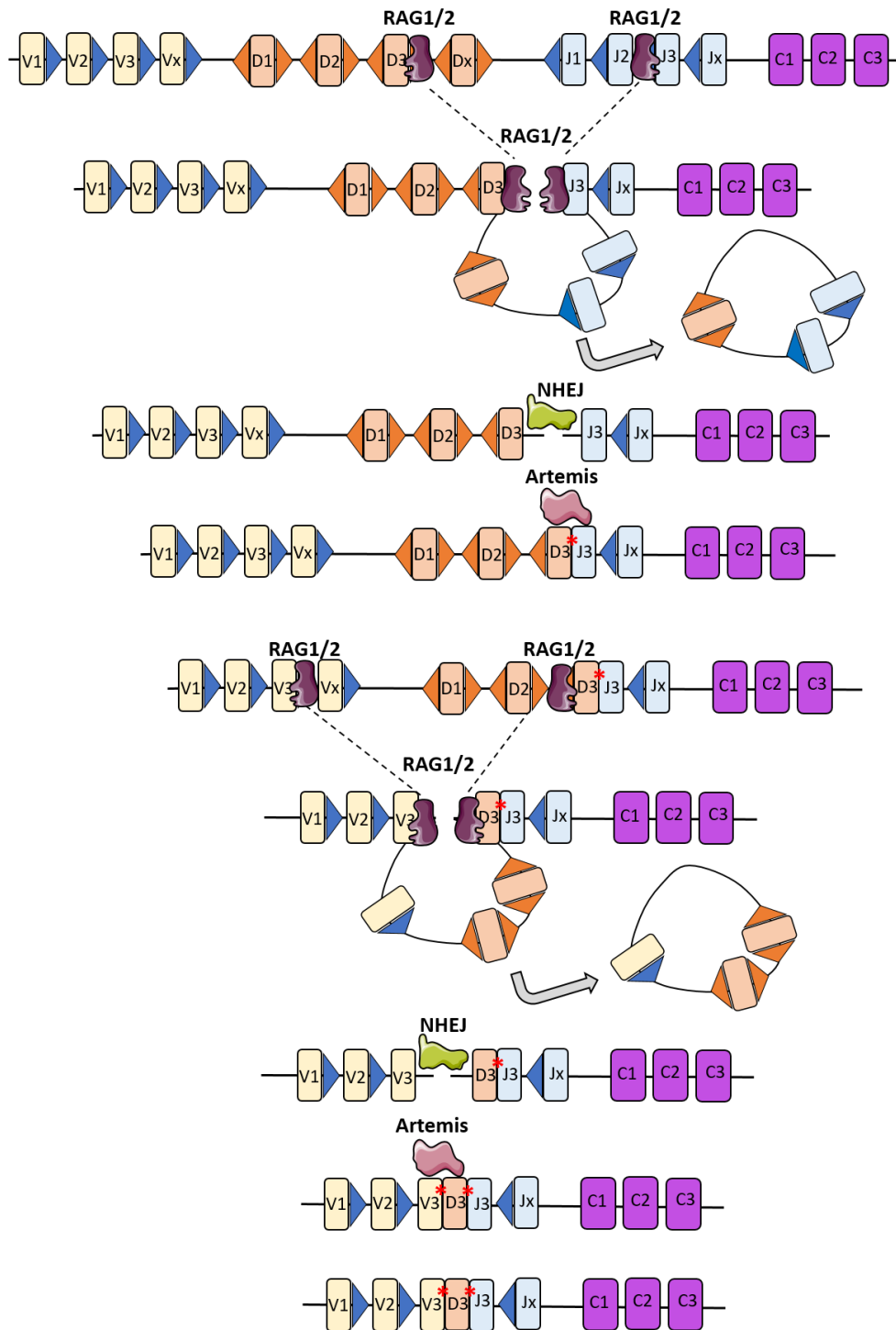
séquences RSS : les séquences 12-RSS (constituées d'un Heptamère / 12 nucléotides aléatoires / un Nonamère) et les séquences 23-RSS (constituées d'un Heptamère / 23 nucléotides aléatoires / un Nonamère) (**Figure 12**). Les séquences des Heptamères et des Nonamères sont fortement conservées.

Les séquences 23-RSS sont retrouvées autour des segments V et J, et les séquences 12-RSS autour des segments D, une séquence 12-RSS ne pouvant être recombinaison qu'avec une séquence 23-RSS. La recombinaison VDJ est dite séquentielle : les segments D et J sont d'abord recombinaison sur les deux allèles pour former un fragment DJ (Alt et al., 1984) ; puis c'est le tour d'un segment V avec le segment DJ déjà réarrangé (Aribi, 2020), cette fois-ci sur un seul des deux allèles choisis de façon aléatoire (Alves-Pereira et al., 2014).



**Figure 12 : Les séquences conservées 23-RSS et 12-RSS**

Les Séquences Signal de Recombinaison (RSS, « Recombination Sequence Signal ») sont des séquences conservées qui servent de repère aux processus de clivage et de réparation de l'ADN lors de la recombinaison V(D)J. M. Aribi *et al.* 2020.



**Figure 13 : Mécanismes moléculaires de la recombinaison V(D)J**

Les enzymes RAG1/2 vont se fixer aléatoirement sur une séquence RSS en amont d'un segment D et d'un segment J. Les segments vont se rapprocher l'un de l'autre, formant une boucle qui est éliminée lors du clivage double brin de l'ADN par RAG1/2. Les deux brins d'ADN sont pris en charge par le système de réparation NHEJ, en résultant des segments D et J recombinés. Le même procédé est suivi pour recombiner un segment V sur le segment réarrangé DJ. Afin d'accroître la diversité génétique, l'enzyme ARTEMIS intervient à chaque site de cassure pour y introduire des mutations aléatoires.

Les enzymes RAG1/2 se fixent sur ces séquences RSS afin de les positionner physiquement l'une en face de l'autre en formant ainsi une boucle avec la séquence située entre les deux séquences RSS, puis clivent l'ADN sur ses deux brins.

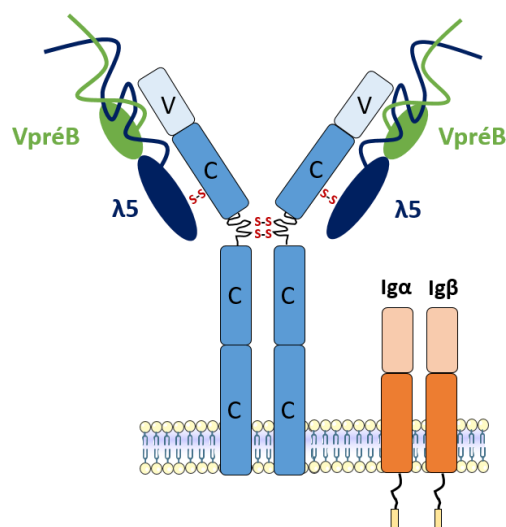
La boucle formée par le processus est ensuite éliminée, puis les deux fragments d'ADN laissés libres vont être pris en charge par le système de réparation de l'ADN NHEJ (« Non Homologous End Joining ») (Bassing et al., 2002).

De plus, au cours de cette réparation, l'enzyme ARTEMIS va intervenir et pourra aléatoirement rajouter ou enlever des nucléotides au niveau de la cassure, ce qui va augmenter encore la diversité génétique des fragments recombinés VDJ (Lieber, 2010) (**Figure 13**).

Ce mécanisme permet d'accroître fortement la diversité du répertoire VDJ, mais il est relativement risqué pour la cellule Pro-B. En effet, en ajoutant ou retirant des nucléotides le risque est de modifier le cadre de lecture de l'ADN (« Open Reading Frame », ORF). Lorsque l'ORF est modifié, la lecture de l'ADN par les ADN polymérases est altérée et peut par conséquent conduire à la survenue d'un codon STOP prématuré. Dans ce cas, le lymphocyte Pro-B va tenter de recombiner sur son second allèle un segment V sur DJ. Si cela conduit à un allèle fonctionnel il pourra poursuivre sa différenciation ; si ce n'est pas le cas le lymphocyte Pro-B restera bloqué à ce stade et finira par mourir (Y. Chang et al., 1999). On parle de sélection positive des LB.

- **Le stade Pré-B**

Les lymphocytes Pro-B qui ont correctement réarrangé leur locus *IgH* l'exprime à présent à la surface de la cellule sous la forme d'un pré-BCR, composé alors de deux chaînes lourdes réarrangées *Igμ*, les deux chaînes *Igα* et *Igβ*, et des pseudo chaînes légères *VpreB* et  $\lambda 5$  (**Figure 14**) (Tsubata & Reth, 1990). L'expression de ce pré-BCR a plusieurs conséquences sur le développement du lymphocyte Pré-B.



**Figure 14 : Structure schématique du pré-BCR**

Au stade Pré-B, les lymphocytes ayant correctement réarrangé leur locus *IgH* vont exprimer à leur surface un complexe appelé le Pré-BCR, qui est composé des deux chaînes lourdes réarrangées et des deux pseudo-chaînes légères exprimées provisoirement le temps que la cellule réarrange ses loci *IgL*. L'immunoglobuline immature est associée à la membrane aux deux chaînes *Igα* et *Igβ*.

Dans un premier temps, l'expression d'un pré-BCR fonctionnel et donc d'une chaîne lourde IgH correctement réarrangée induit un rétrocontrôle empêchant le réarrangement du second allèle *IgH* : on parle d'exclusion allélique. Cette exclusion allélique est rendue possible d'une part par l'inhibition des enzymes RAG1/2, ce qui empêche la recombinaison sur le second allèle (Grawunder et al., 1995) ; et d'autre part par une réorganisation spatiale dans le noyau : l'allèle recombiné productif va rester dans la région claire du noyau afin d'être exprimé, alors que le second allèle va être refoulé dans la région sombre afin de rendre sa recombinaison impossible et de réprimer son expression (Constantinescu & Schlissel, 1997).

Dans un second temps, la signalisation induite par le pré-BCR va permettre au lymphocyte pré-B de recombiner ses loci de chaînes légères *Igk* et/ou *Igl*.

Les mécanismes mis en jeu ici sont les mêmes que pour la recombinaison des chaînes lourdes : l'expression des enzymes RAG1/2 réaugmente et permet la recombinaison d'un allèle  $\kappa$  en premier lieu. Si la recombinaison ne produit pas de chaîne légère fonctionnelle le second allèle  $\kappa$  sera recombiné, puis de la même manière les allèles  $\lambda$  (Maki et al., 2000).

Lorsqu'une chaîne légère correctement recombinée est exprimée, elle remplace la pseudo-chaîne légère à la surface du BCR ce qui induit, comme pour les chaînes lourdes, l'exclusion allélique de tous les autres loci de chaînes légères (A. Tsukamoto et al., 1984).

- **Le stade B immature**

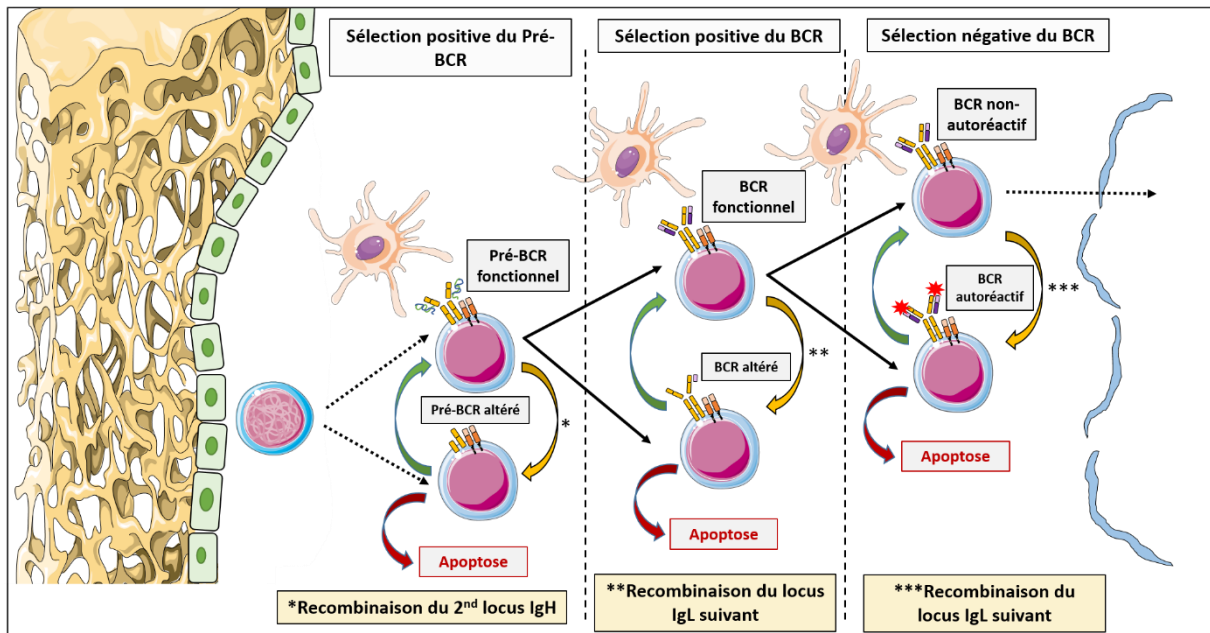
Dès lors qu'il exprime un BCR complet, le lymphocyte Pré-B devient un LB immature. Le BCR exprimé à ce stade est dit BCR IgM, puisque la chaîne lourde exprimée est une chaîne  $Ig\mu$ .

A présent, on se retrouve avec un LB immature qui exprime un BCR unique (exclusion allélique) et qui permet une signalisation efficace (sélection positive). Cependant, le réarrangement des segments V(D)J étant aléatoire, il est tout à fait possible que le LB immature reconnaisse un antigène non pathogène faisant partie intégrante de l'organisme ; on parlerait alors de LB immature auto-réactif. La présence d'un LB immature auto-réactif pourrait être très délétère pour l'organisme. Afin d'éviter ce cas de figure, les LB immatures vont donc subir une sélection dite négative (**Figure 15**).

La sélection négative consiste, dans la moelle osseuse, à mettre en présence les LB immatures avec divers antigènes dits du soi, qui appartiennent à l'organisme. Ces antigènes sont exprimés par les cellules stromales médullaires, par les cellules hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse, ou bien apportés sur site via la circulation sanguine. On parle de sélection négative, car dans ce cas-là et contrairement à ce qui a été évoqué auparavant, c'est la progression des LB immatures dont le BCR est stimulé qui va être stoppée.

Lorsque le LB immature reconnaît un antigène auto-réactif, son devenir va dépendre du type de liaison BCR-antigène. Si cette liaison induit une forte oligomérisation du BCR à la surface, elle va produire un fort signal apoptotique qui conduit à la mort de ce LB immature auto-réactif (Hartley et al., 1991). En revanche si l'affinité du BCR pour l'auto-antigène est modérée, ce dernier exprime à nouveau les enzymes RAG1/2 pour subir un nouveau réarrangement VJ au niveau d'un des locus  $\kappa$  ou  $\lambda$  jusqu'alors éteints (Prak & Weigert, 1995). Dans ce cas de figure, si le nouveau BCR est fonctionnel mais n'est plus auto-réactif, le LB immature pourra poursuivre sa différenciation ; sinon il sera éliminé.

Le LB immature ainsi sélectionné pourra alors quitter la moelle osseuse pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires où il achèvera sa maturation.



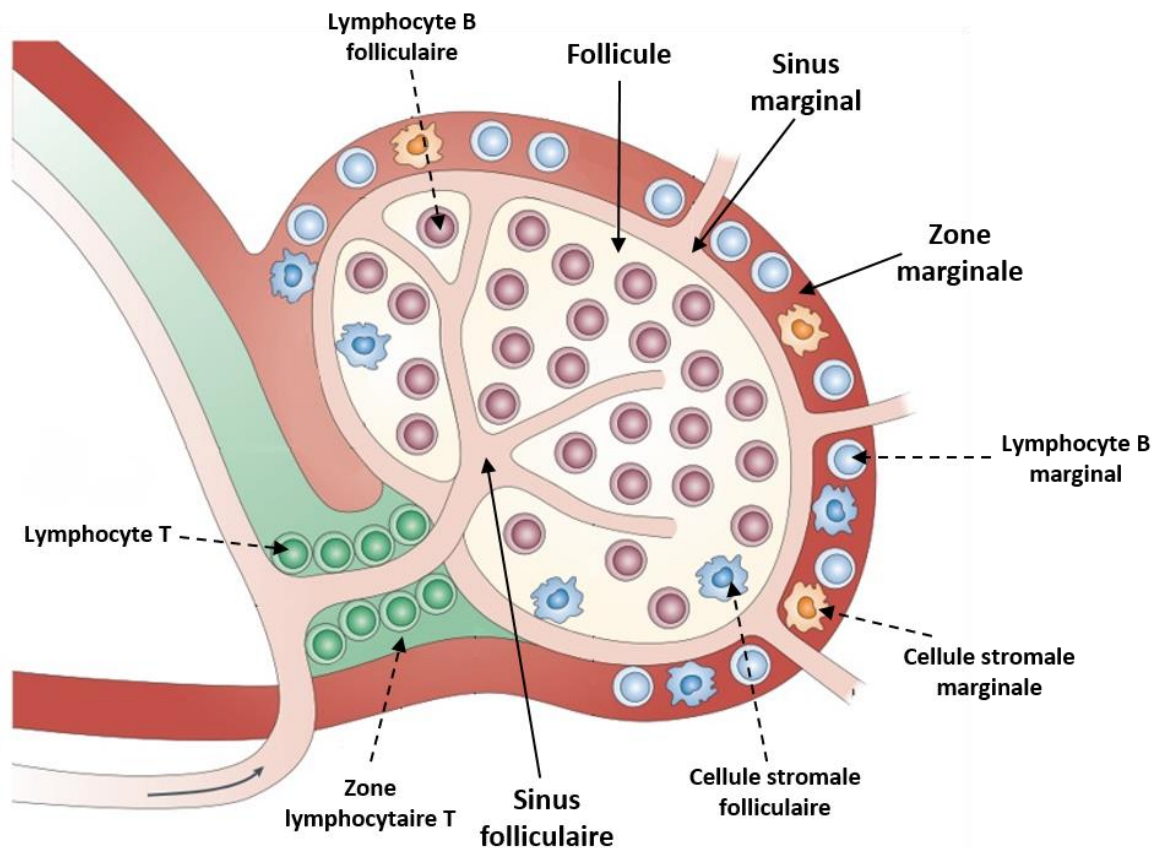
**Figure 15 : Résumé schématique des étapes de sélections positives et négatives du développement B médullaire**

Au stade Pré-B les CSM présentent l'antigène aux cellules pour tester la fonctionnalité de leur BCR. Si ce dernier permet une signalisation correcte la cellule poursuit sa maturation, sinon elle va tenter de recombinaison son second allèle *IGH* pour produire un BCR correct. En cas d'échec la cellule entrera en apoptose dû au manque de stimulation du BCR, c'est la 1<sup>ère</sup> sélection positive. La seconde sélection positive intervient lorsque le LB à réarrangé son locus *IGL*. Ici le principe est le même : les cellules exprimant un BCR fonctionnel seront favorisées et les autres tenteront de réarranger un autre allèle *IGL* (d'abord  $\kappa$  puis  $\lambda$ ) ; si elles n'y parviennent pas elles seront éliminées par apoptose. Enfin au stade B immature le BCR fonctionnel est encore une fois testé par les CSM, si celui-ci s'avère auto-réactif les LB vont tenter de réarranger un autre locus *IGL*. Si la recombinaison fonctionnelle est que le LB n'est pas ou plus considéré comme auto-réactif il pourra rejoindre la circulation sanguine ; sinon il sera éliminé par apoptose.

## 2. Ontogenèse B tardive

Le LB qui quitte la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine est appelé un lymphocyte B transitionnel. Ce LB transite par voie sanguine jusqu'à un organe lymphoïde secondaire (rate, ganglion, etc ...).

Avec l'exemple de la rate, il est notable que plusieurs structures différentes vont avoir un rôle important dans la poursuite du développement des LB. En premier lieu, le développement B pourra se poursuivre soit dans les follicules, soit au niveau de la zone marginale (**Figure 16**). Suivant que le LB soit folliculaire ou bien marginal, son processus de différenciation sera différent.



**Figure 16 : Structure typique d'un organe lymphoïde secondaire (exemple de la rate)**

Dans les organes lymphoïdes secondaires, notamment dans la rate, l'organisation tissulaire est déterminante pour la poursuite du développement B. On distingue d'abord le follicule qui contient les cellules stromales et les LB éponymes ; puis à son pourtour la zone marginale. Ces deux tissus sont richement irrigués par des sinus sanguins. Enfin, à proximité de du sinus principal on retrouve la zone T, qui contient une forte concentration de lymphocytes T. Adapté d'après S. Pillai *et al.* 2009.

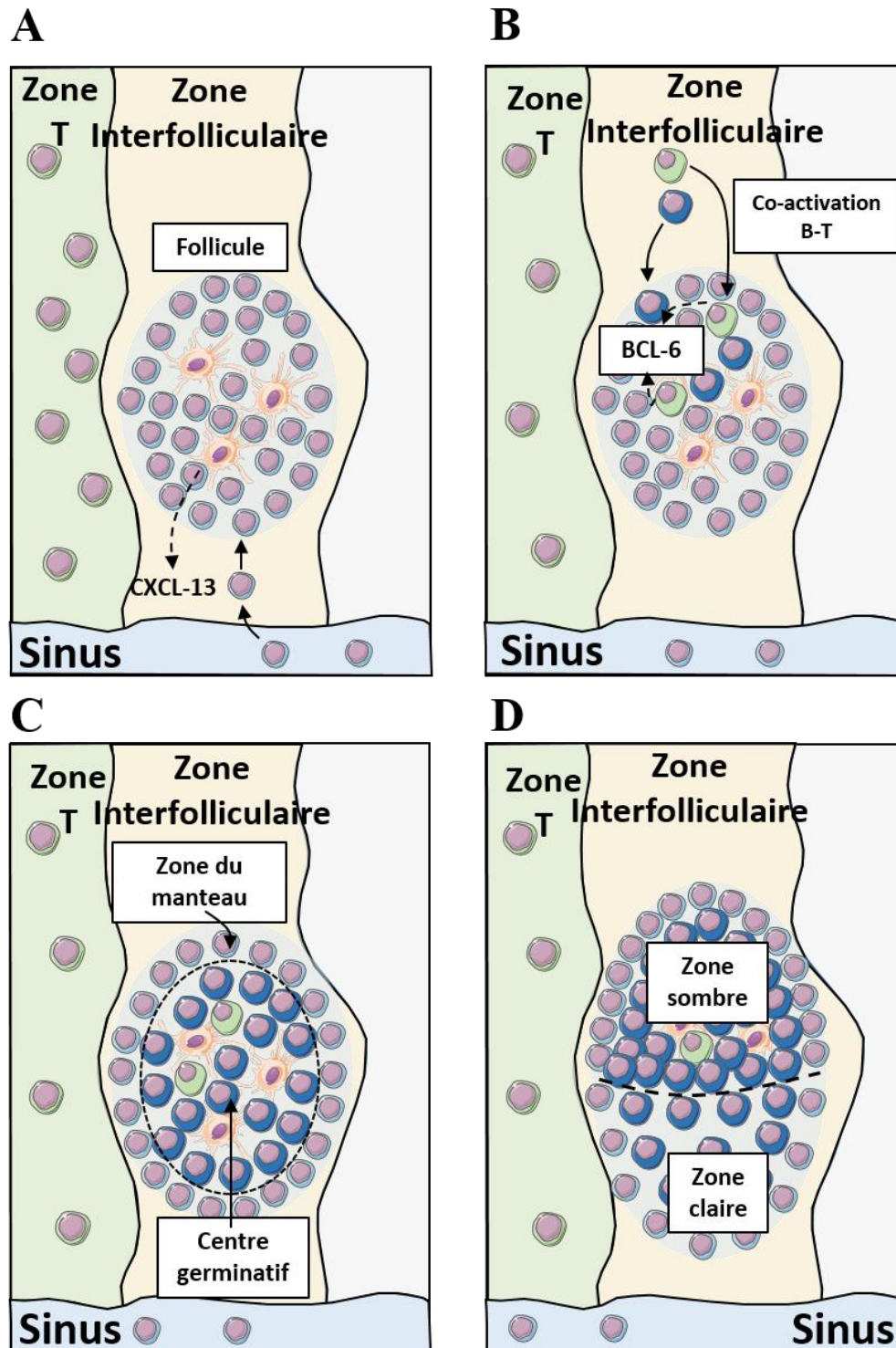
### a. Les lymphocytes B folliculaires

#### i. Activation des LB (zone interfolliculaire)

Les LB transitionnels à ce stade sont doubles positifs  $IgM^+ IgD^+$ . Lorsqu'ils arrivent au niveau d'un organe lymphoïde secondaire, les LB sont attirés par un gradient chimiotactique au niveau d'un follicule. Ceci est rendu possible car les LB expriment le récepteur 5 de chimiokine (CXCR5) et vont par conséquent être attirés au niveau des follicules par les cellules dendritiques folliculaires (FDCs) qui expriment le ligand de CXCR5, la molécule CXCL13 (Cinamon et al., 2008) (**Figure 17A**).

La prochaine étape dans la maturation des LB va consister en leur activation. Pour se faire, les LB vont rejoindre la zone interfolliculaire, où ils vont retrouver des lymphocytes T CD4 (LT CD4) antigène-spécifiques.

Les LT CD4 activés en zone interfolliculaire vont rejoindre le follicule. Sous l'action des FDCs, ces LT CD4 vont exprimer le facteur clé *BCL-6*, qui va de façon autocrine leur permettre



**Figure 17 : La formation du centre germinatif**

**A** : Les FDCs sécrètent de grandes quantité de CXCL-13, qui attire les LB naïfs au niveau du follicule. **B** : Les LB et les LT CD4 vont se rejoindre dans la zone interfolliculaire pour s'activer entre eux. LB et LT activés rentrent dans le follicule ; le LT vont exprimer BCL-6 qui permet aux LB de proliférer. **C** : Le CG émerge, les LB non-activés sont repoussés au pourtour et forment la zone du manteau. **D** : Dans le CG mature deux zones de distinguent : la zone sombre et la zone claire.

de surexprimer le récepteur CXCR5, et donc de rester dans le follicule (Choi et al., 2011). Dès lors, ces LT CD4 seront appelés T « Follicular helpers » (TFh).

Ici, les LB vont rencontrer l'antigène et entrer en compétition pour la liaison aux TFh. A l'issue de cette compétition, les LB ayant la meilleure affinité pour l'antigène vont stabiliser leur liaison aux LT et vont ainsi être activés (Schwickert et al., 2011). Une fois activés, les LB prolifèrent, donnant lieu à un pool oligoclonal de LB dirigés contre l'antigène.

Les LB maintenant pleinement activés, grâce à l'action des LT, vont également rejoindre le cœur même du follicule (**Figure 17B**). Il semblerait que cela soit rendu possible grâce une expression accrue de *BCL6*, qui entraîne une surexpression du facteur *EBI2* (Pereira et al., 2009). Les LB activés vont fortement proliférer dans le follicule, formant l'ébauche de ce que nous appellerons le centre germinatif (CG). En proliférant, les LB activés repoussent les LB transitionnels IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> au pourtour du CG, formant ainsi la zone du manteau (**Figure 17C**). Après quelques jours, le CG est complètement formé. A ce stade, il se subdivise en deux zones : une zone dite sombre et une zone dite claire (**Figure 17D**).

## ii. La zone sombre du CG et le processus d'hypermutation somatique (SHM pour « Somatic Hypermutation »)

Cette zone du CG est dite sombre de par son importante densité cellulaire liée à la forte prolifération des LB appelés ici centroblastes. Ils se distinguent des centrocytes (LB de la zone claire) de par leur phénotype CXCR4<sup>hi</sup> CD83<sup>lo</sup> CD86<sup>lo</sup> (Caron et al., 2009). Dans la zone sombre, les centroblastes vont subir une étape cruciale de leur maturation visant à augmenter considérablement l'affinité de leur BCR pour l'antigène : l'hypermutation somatique (SHM).

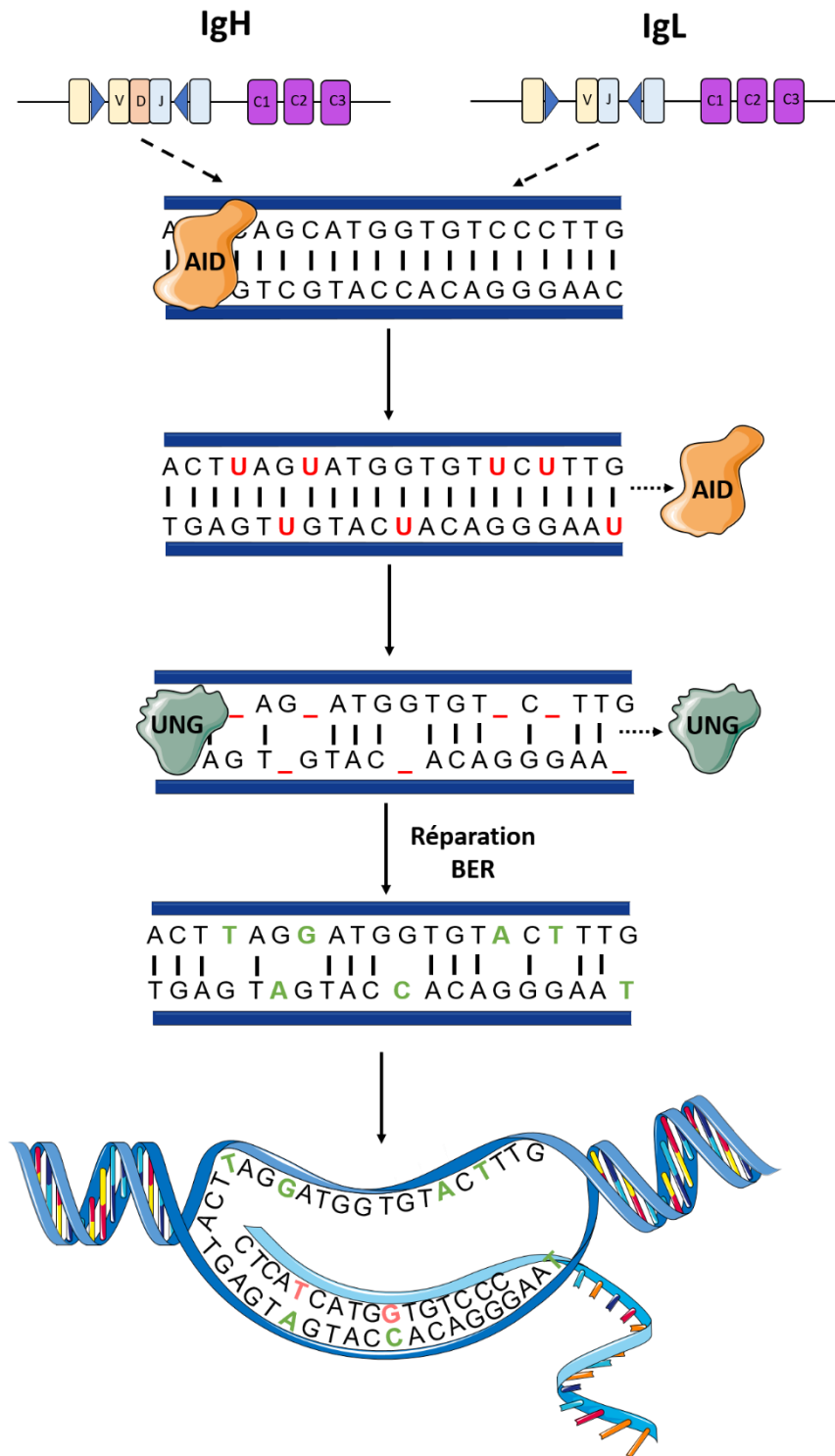
La forte expression de *BCL6* dans le centre germinatif va induire l'expression du facteur *AID* (Williams et al., 2016). AID est une enzyme capable de se fixer à l'ADN, en l'occurrence au niveau des gènes réarrangés V(D)J, et d'agir comme une déaminase. AID va transformer les bases Cytosines en Uraciles. Ces Uraciles sont reconnues et excisées par l'Uracile ADN glycosylase (UNG) créant ainsi des sites abasiques, qui seront pris en charge par le système de réparation de l'ADN nommé BER (« base excision repair »). La réparation de l'ADN ne sera pas fidèle, en conséquence des mutations vont apparaître et seront potentiellement conservées lors de la réplication (**Figure 18**).

Les centroblastes ayant subi la SHM migrent à présent dans la zone claire du centre germinatif.

## iii. La zone claire du CG et la CSR

Arrivés dans la zone claire du CG, les LB sont caractérisés par le phénotype CXCR4<sup>lo</sup> CD83<sup>hi</sup> CD86<sup>hi</sup> et sont appelés centrocytes (Caron et al., 2009). Afin de ne conserver que les centrocytes ayant un BCR le plus affin pour l'antigène, ces derniers subissent une nouvelle sélection positive qui a lieu dans la zone claire du CG. Des lymphocytes TFh vont une nouvelle fois présenter l'antigène aux LB. Ces derniers vont donc entrer en compétition et seuls ceux qui possèdent la meilleure affinité à l'antigène recevront les signaux nécessaires pour survivre (Victoria et al., 2010).





**Figure 18 : Principe moléculaire de l'hypermutation somatique (SHM)**

Au niveau des régions V(D)J des loci *IGH* et *IGL*, l'enzyme AID va être recrutée. Cette déaminase va remplacer des cytosines par des uraciles, qui elles-mêmes seront éliminées par l'enzyme UNG qui créent ainsi des sites abasiques. Le système de réparation BER prend en charge les sites impactés, mais elle va créer des erreurs d'appariement qui conduiront à des mutations somatiques lors de la prochaine réplication.

En plus de signaux de survie, les lymphocytes TFh vont donner la capacité aux centrocytes sélectionnés de retourner dans la zone sombre du CG afin de proliférer, et de subir à nouveau la SHM. Ces cellules ayant subi la SHM une seconde fois dans la zone sombre vont revenir dans la zone claire, vont à nouveau passer par la sélection positive de leur BCR auprès des lymphocytes TFh puis vont revenir dans la zone sombre et etc... Après plusieurs cycles de ce type, le CG ne contiendra plus que des LB ayant une forte affinité pour l'antigène, et aura éliminé les autres (Crotty, 2019). Il semble que le facteur *MYC* et la voie de signalisation NFκB soient impliqués dans la capacité des LB à circuler d'une zone à l'autre du CG (Victoria et al., 2010).

Au cours de leurs multiples passages dans la zone claire, les centrocytes vont éventuellement pouvoir procéder à un nouveau réarrangement au niveau de leur locus *IgH*. Cette fois-ci, ce remaniement moléculaire touche la partie constante de la chaîne lourde d'Ig afin d'en modifier les fonctionnalités. Ce mécanisme appelé recombinaison isotypique (« Class Switch Recombination », CSR) permet de produire des Ig non plus IgM mais IgG, IgA, ou bien IgE.

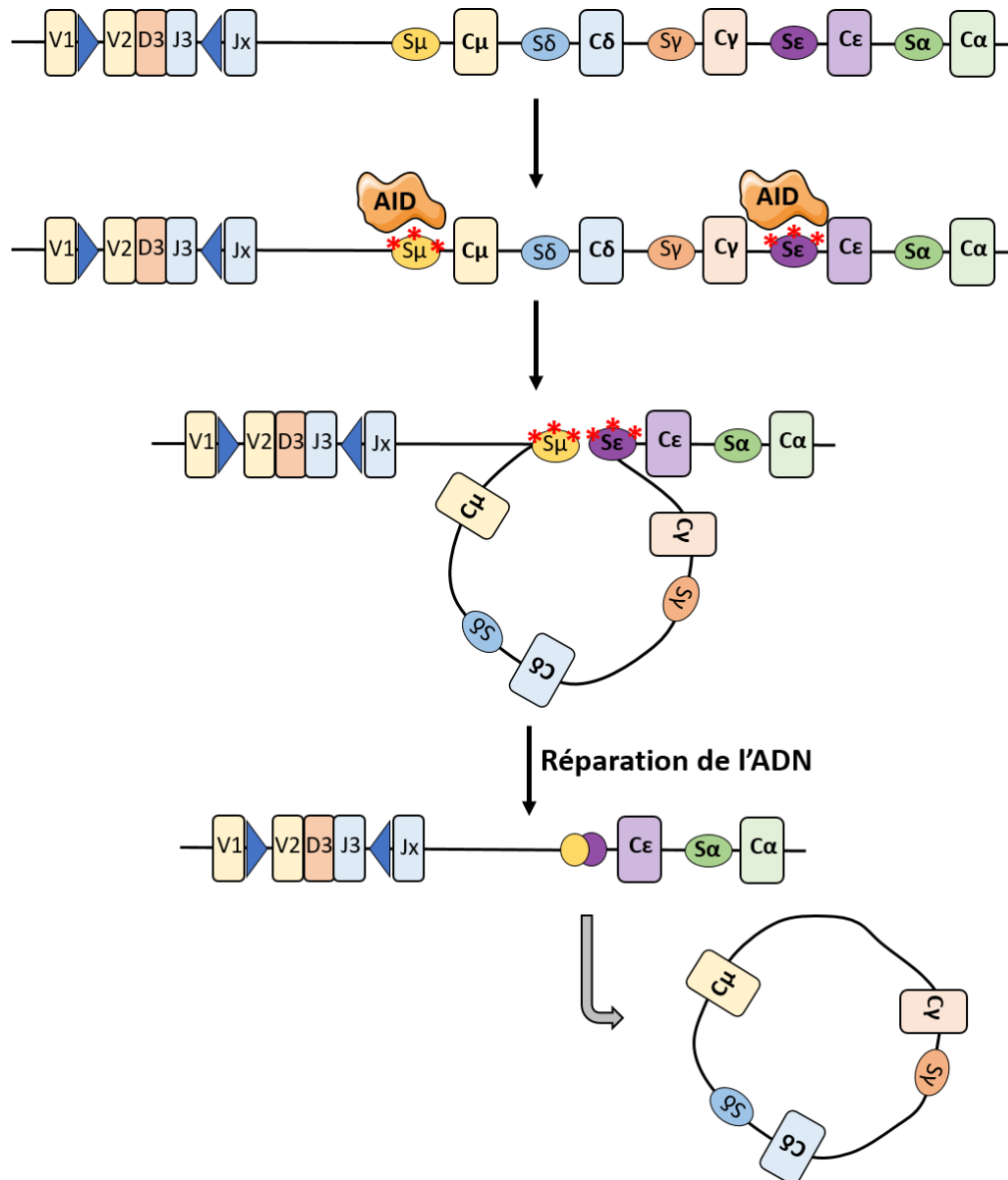
Au niveau du locus *IgH*, les gènes codants les régions constantes (Igμ, Igγ, Igδ, Igε et Igα) sont précédées de domaines spécifiques appelés régions « Switch » (régions S). Lors de la CSR, l'enzyme AID va cibler spécifiquement les régions S pour y provoquer un grand nombre de déaminations. Les deux régions d'intérêt (la région S de l'isotype actuellement exprimé et celle de l'isotype ciblé) vont grâce à différents co-acteurs être juxtaposées. Dû à la forte densité de mutations induites par AID au niveau des régions S, l'ADN va subir des cassures doubles brins. Après réparation, les deux sites S vont être ligaturés entre eux et tout ce qui était situé entre les deux sera éliminé. Au final l'isotype ciblé sera dorénavant exprimé (Xu et al., 2012) (**Figure 19**).

Enfin, dans la zone claire du CG les centrocytes vont pouvoir se différencier pour atteindre les stades ultimes du développement lymphocytaire B : le plasmocyte ou le lymphocyte B mémoire.

#### **iv. Différenciation en plasmocytes / LB mémoire**

Ces deux compartiments cellulaires sont très distincts de par leur rôle dans la réponse immune. Le plasmocyte est la cellule sécrétrice d'anticorps par excellence. Son rôle va être de sécréter une quantité énorme d'Ig spécifiques de l'antigène. Le LB mémoire quant à lui constitue une réserve de LB déjà différenciés qui seront réactivés au besoin lors d'une seconde rencontre future avec ce même antigène.

Il est établi que les centrocytes ayant la meilleure affinité pour l'antigène vont se différencier en plasmocytes. Dans ce cas, une synapse puissante et stable se forme entre le centrocyte et le lymphocyte TFh, ce qui induit un signal BCR puissant mais également l'activation de voies de signalisation supplémentaires telle que la voie NFκB via le récepteur CD40. (M. Saito et al., 2007). En conséquence, les centrocytes vont commencer à exprimer les facteurs de transcription *BLIMP1*, *IRF4*, *BACH2* ; qui vont permettre d'éteindre l'expression de *BCL6* (facteur clé du CG) et de *PAX5* (facteur clé du développement B). La signature génique B est donc perdue progressivement au profit d'une signature spécifique des plasmocytes (Shapiro-Shelef et al., 2003). La différenciation plasmocytaire va être progressive



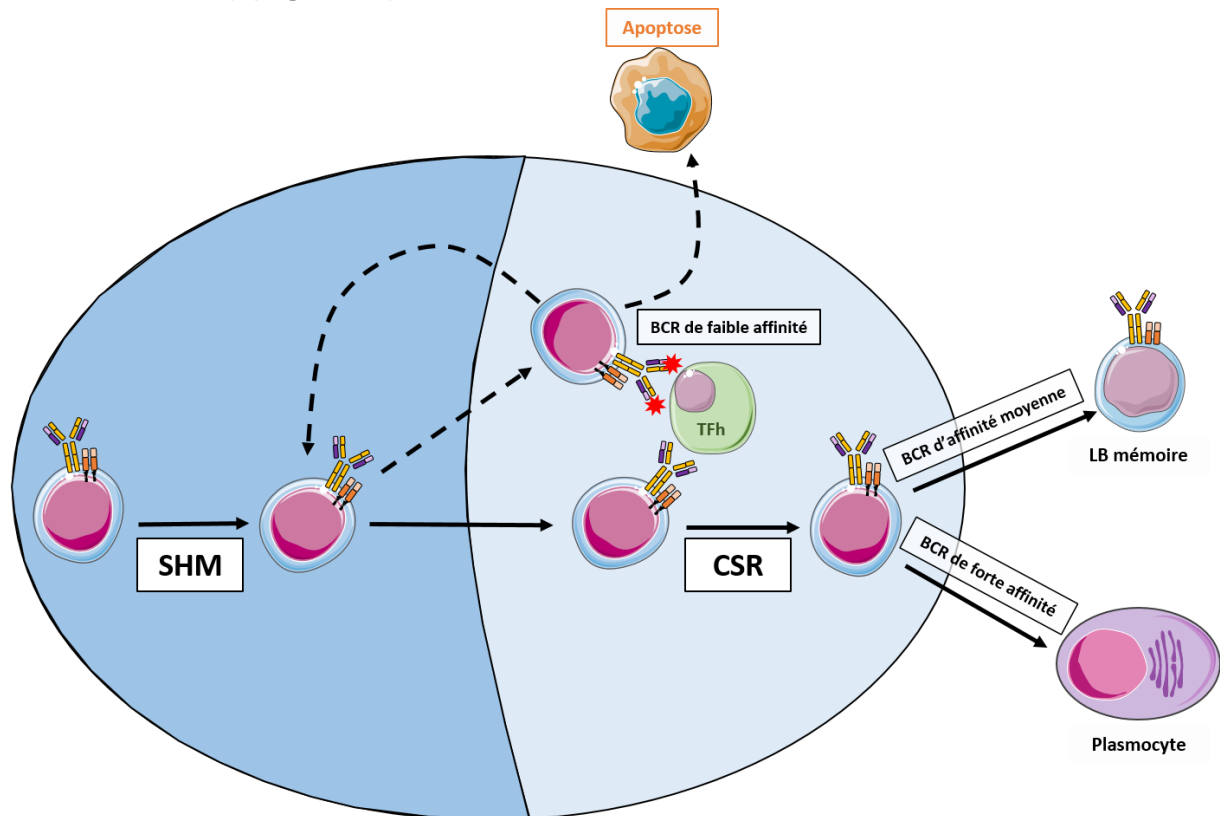
**Figure 19 : Principe moléculaire de la recombinaison isotypique (CSR)**

Au locus *IGH*, les séquences S précèdent le segment constant exprimé et celui ciblé ( $S\mu$  et  $S\epsilon$  respectivement) sont ciblées par l'enzyme AID. AID induit des déaminations conduisant elles-mêmes à l'apparition de sites abasiques. Dans le même temps, plusieurs effecteurs rapprochent physiquement les deux séquences S, une boucle se forme. Le grand nombre de sites abasiques va entraîner des cassures doubles brins au niveau des deux séquences S ; ces cassures sont prises en charge par les systèmes de réparation de l'ADN et la boucle formée par tout ce qui se situait entre  $S\mu$  et  $S\epsilon$  est éliminée.

au fil des divisions cellulaires. Les cellules engagées dans la différenciation plasmocytaire mais qui ne sont pas encore des plasmocytes sont appelées des plasmablastes.

Une fois différenciés, les plasmocytes acquièrent la capacité de produire et de sécréter une grande quantité d'Ig. Ils expriment le marqueur de surface CD138 qui leur est propre, et également le récepteur CXCR4 qui va leur permettre de retourner se nicher dans la moelle osseuse (Benet et al., 2021).

Lorsque l'affinité du BCR pour l'antigène n'est pas maximale, la synapse formée entre le centrocyte et le lymphocyte TFh n'est pas suffisamment stable pour stimuler le récepteur CD40 et induire l'activation de la voie NFκB. Un signal BCR malgré tout satisfaisant va conduire à la répression du facteur *BCL6* (M. Saito et al., 2007). *BCL6* étant jusqu'ici inhibiteur du facteur anti-apoptotique *BCL2* ; ce dernier va se retrouver surexprimé. Cette expression accrue de *BCL2* est significative d'un engagement de la différenciation en LB mémoire (M. Saito et al., 2009) (**Figure 20**).



**Figure 20 : Récapitulatif du passage du lymphocyte B dans le centre germinatif**

Dans la zone sombre du centre germinatif, le LB va subir l'hypermutation somatique (SHM) qui a pour but d'augmenter son affinité pour l'antigène. Il passe ensuite dans la zone claire, où sa capacité à reconnaître l'Ag va être testée par les TFh. Si l'affinité du BCR est médiocre, le LB mourra par apoptose. Si l'affinité est faible, le LB aura la possibilité de retourner dans la zone sombre afin d'y subir à nouveau la SHM et potentiellement augmenter l'affinité de son BCR. Si l'affinité du LB pour l'Ag est bonne, il pourra poursuivre sa différenciation. Si l'affinité de son BCR est excellente le LB se différenciera en plasmocyte ; si l'affinité à l'Ag est seulement intermédiaire le LB se différenciera plutôt en LB mémoire.

## **b. Les lymphocytes B de la zone marginale**

### **i. Différenciation et rétention des LB MZ**

Comme vu en section I. B. 2. A. i), les LB transitionnels sont attirés au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Dans la zone interfolliculaire, l'antigène leur est présenté par les lymphocytes T donnant lieu à une première sélection des LB les plus affins à l'antigène par compétition positive. Nous avons également vu que les lymphocytes B dont le BCR était le

plus affin pour l'antigène allaient coloniser le follicule pour former le centre germinatif ; mais qu'en est-il des LB dont la détection de l'antigène n'est que moyenne ?

Les LB n'étant pas parvenus à une activation suffisante lors de leur première confrontation à l'antigène dans la zone interfolliculaire ne vont stimuler que faiblement la signalisation de leur BCR, ce qui a pour conséquence de les rendre particulièrement sensibles à d'autres types de stimulations et notamment celle du récepteur NOTCH2. Les cellules endothéliales spléniques exprimant le ligand de NOTCH2 (DLL1), vont attirer le LB et induire leur différenciation en LB de la zone marginale (LB MZ). La manière dont la voie NOTCH2 induit la différenciation en LB MZ est encore mal connue, mais il semblerait que la répression du facteur de transcription *E2A* au profit des facteurs *ID2* et *ID3* induites par *NOTCH2* soit impliquée dans ce mécanisme (T. Saito et al., 2003).

Malgré leur présence dans la zone marginale, les LB MZ sont tout de même attirés vers les follicules via le gradient de CXCL-13 sécrété par les FDCs. Les LB MZ ont cependant plusieurs moyens pour contrecarrer ce signal et rester dans la zone marginale : (i) Un signal chimiotactique inverse impliquant la molécule sphingosine-1-phosphate (S1P) et son récepteur S1PR1 à la surface des LB MZ attire ces derniers vers la zone marginale (Cinamon et al., 2004) ; (ii) Les LB MZ expriment les molécules d'adhésion LFA1 (« lymphocyte function-associated antigen 1 ») et l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  ce qui leur permet de former des interactions intercellulaires avec les cellules endothéliales de la zone marginale qui expriment ICAM1 et VCAM1 (Lu & Cyster, 2002).

## ii. Activation T Indépendante des MZ LB

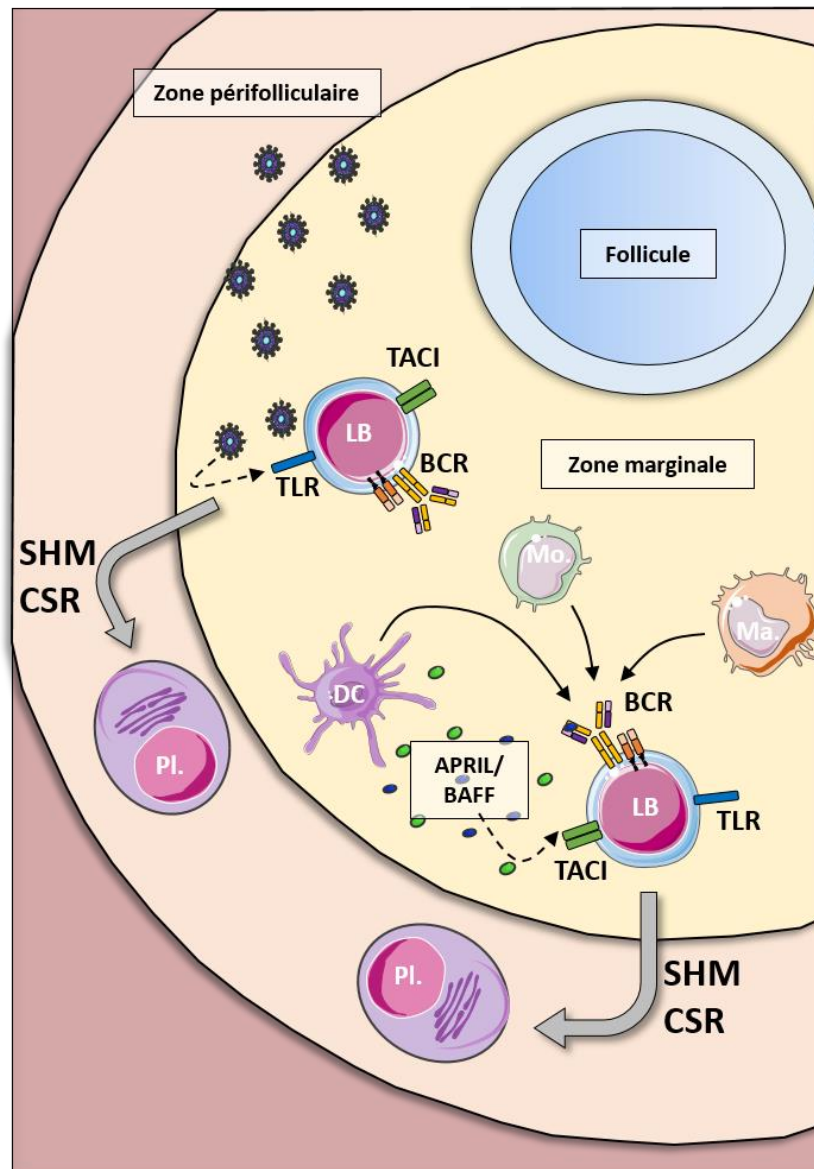
Au niveau de la zone marginale, les LB MZ vont potentiellement rencontrer l'antigène sans pour autant passer par une étape de co-activation avec les lymphocytes T, on parle d'activation T indépendante des LB MZ (**Figure 21**).

La surexpression du facteur *NOTCH2* caractéristique des LB MZ induit chez ces derniers une forte expression des récepteurs du complément. En conséquence l'activation des LB MZ sera beaucoup plus sensible à la présence d'antigènes circulants opsonisés que ne le serait celle des LB folliculaires (Oliver et al., 1997). Les macrophages, cellules dendritiques ou encore neutrophiles qui transitent par voie sanguine vont également participer à l'activation des LB MZ en leur présentant l'antigène (Balázs et al., 2002; Kang et al., 2006). La somme de ces signaux faisant intervenir le BCR, les récepteurs de type PRR (« Pattern Recognition Receptors ») et les récepteurs du CMH vont pleinement activer les LB MZ.

Dans ce micro-environnement activé, les cellules dendritiques de la zone marginale vont sécréter de grandes quantités de facteurs *APRIL* et *BAFF*, qui permettent d'induire la prolifération des LB MZ via le récepteur TACI et l'activation MYD88 dépendante de la voie NF $\kappa$ B (Groom et al., 2007).

Ayant longtemps été une hypothèse controversée, il semblerait pourtant bien que les LB MZ subissent la SHM (Scheeren et al., 2008) et la CSR comme le font les LB folliculaires. Ces remaniements génétiques ont également pour but d'augmenter l'affinité des Ig des LB pour l'antigène mais ont bien lieu en dehors des follicules et du centre germinatif. Dans le cas des LB MZ, la CSR (qui nécessite l'expression d'AID) est liée à une transactivation impliquant TACI, les Toll-like Receptors (initiant la voie NF $\kappa$ B Myd88 dépendante) et le Récepteur associé au TNF (TRAF) (B. He et al., 2010).

En résumé, l'activation T indépendante des LB MZ passe par une interaction directe avec l'antigène (activation des TLRs) et/ou une reconnaissance de l'antigène présenté par les Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA) de l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques, ...). Une fois pleinement activés, les LB MZ vont se différencier en plasmablastes puis en plasmocytes sécréteurs d'anticorps grâce à la surexpression de *BLIMP1* (Martin et al., 2001). Ces cellules jouent un rôle important dans la réponse immune, car elles permettent une réponse peu spécifique mais très rapide contre les infections.



**Figure 21 : Activation T indépendante des LB de la zone marginale**

Les LB de la zone marginale (LB MZ) peuvent être activés par rencontre directe avec l'antigène via la stimulation des TLRs. Ils peuvent également être activés par des CPA qui présentent l'antigène (DC, Mo., Ma.) et enfin, les DC sécrètent de grandes quantités de facteurs APRIL et BAFF1, qui vont participer à l'activation des LB MZ en stimulant le récepteur TACI. Une fois activés les LB MZ vont subir la SHM et la CSR et pourront enfin se différencier en plasmocytes.

LB : Lymphocyte B ; DC : cellule dendritique ; Mo. : Monocyte ; Ma. : Macrophage ; Pl. : plasmocyte. Adapté d'après A. Cerutti *et al.* 2013.

### iii. Activation T dépendante des LB MZ

A la différence des LB folliculaires, les LB MZ possèdent une grande capacité à présenter l'antigène et à induire l'activation des lymphocytes T CD4, grâce d'une part à l'expression des marqueurs de co-activation CD80 et CD86 ; et d'autre part à une forte expression du Complexe Majeur d'Histocompatibilité classe II (CMH II) (Attanavanich & Kearney, 2004).

Après leur rencontre avec l'antigène, les LB MZ vont migrer vers la zone périartériolaire pour rencontrer les lymphocytes T CD4. Grâce à l'expression du CMH II chargé en particules antigéniques associée à la présence des signaux de co-stimulation CD80/86, les LB MZ vont activer les LT CD4. Une fois activés, les LT CD4 vont non seulement exprimer le facteur CD40L mais également sécréter un cocktail de cytokines (IL-4, IL-21, IFN $\gamma$ ). En réponse à ces signaux, les LB MZ vont subir la SHM et la CSR, pour *in fine* produire un réservoir de LB mémoires et de plasmocytes sécréteurs d'IgG principalement (Song & Cerny, 2003) (**Figure 22A**).

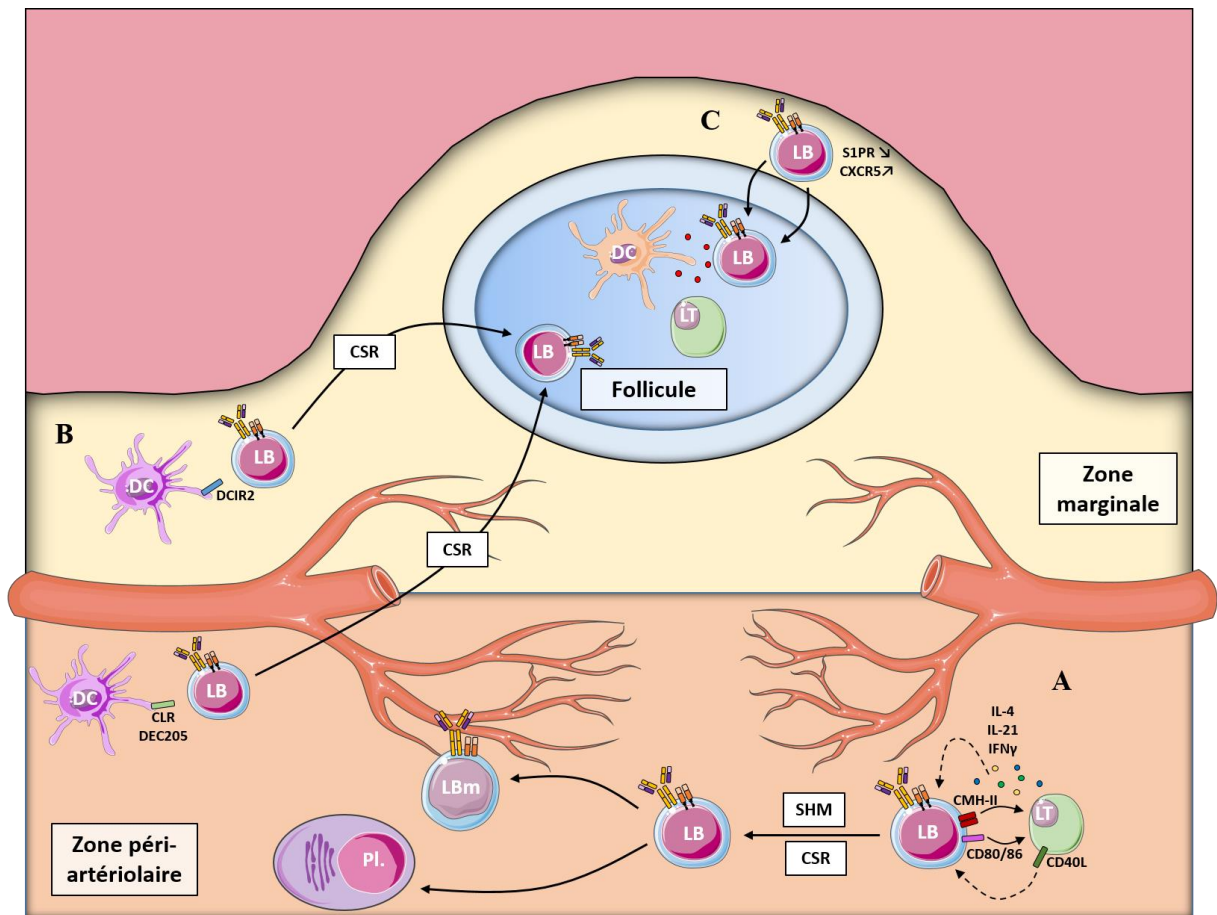
Qui plus est, l'interaction du CD21 et du CD35 exprimé par les LB MZ avec l'antigène va réduire l'expression du récepteur S1PR1, ce qui par conséquent inhibe la rétention des LB MZ au niveau de la zone marginale. Etant à présent sensibles au gradient chimique de CXCR5, les LB MZ vont temporairement rejoindre les follicules, déposer des particules antigéniques à proximité des FDCs, puis rejoindre la zone marginale (Cinamon et al., 2008). Ce processus permet d'alimenter constamment les follicules avec de nouveaux antigènes et éventuellement de favoriser le déclenchement d'une réponse folliculaire (**Figure 22C**).

Les cellules dendritiques peuvent également participer à l'activation T dépendante des LB MZ. Dans la zone marginale, les cellules dendritiques expriment la molécule DCIR2 (« CLR DC inhibitory receptor 2 »), qui induit l'activation et la CSR chez les LB MZ. Dans ce cas, la CSR est restreinte à l'isotype IgG (Chappell et al., 2012). Dans la zone périartériolaire en revanche, les cellules dendritiques expriment un facteur d'activation différent qui est nommé CLR DEC205. Ce dernier va de la même manière activer et induire la CSR chez les LB MZ. Ces LB MZ pourront soit rejoindre le follicule, subir le processus de développement intra-folliculaire décrit en *B. 2. a.* et produire un BCR de haute affinité ; soit rester en dehors du follicule et se différencier en plasmocyte sécrétant des anticorps de faible/moyenne activité (Cunningham et al., 2007) (**Figure 22B**).

### 3. Cas particulier des lymphocytes B1

Les lymphocytes B1 sont une population rare, puisqu'ils ne représentent que 3% des LB totaux. Ils ont été plutôt bien décrits chez la souris, mais leur existence chez l'homme reste encore controversée. Les lymphocytes B1 expriment des marqueurs qui leur sont propres : CD19<sup>hi</sup> CD11b<sup>+</sup> IgM<sup>hi</sup> IgD<sup>lo</sup> CD43<sup>+</sup> CD23<sup>-</sup> CD1d<sup>mid</sup> CD23<sup>-</sup> CD5<sup>+</sup> ou CD5<sup>-</sup>, l'expression du CD5 va par ailleurs discriminer deux sous-groupes : les B1a (CD5<sup>+</sup>) et les B1b (CD5<sup>-</sup>) (Baumgarth, 2004).

L'origine des lymphocytes B1 est différente de celle des LB folliculaires et marginaux, et leur mode de production l'est également. Le stock de lymphocytes B1 est généré dès le développement embryonnaire à partir du foie fœtal hématopoïétique. Lors de la maturation de l'embryon ces cellules vont coloniser la cavité péritonéale principalement, et on en retrouve peu dans la moelle osseuse et la rate (Herzenberg, 2000). A l'âge adulte, le stock de



**Figure 22 : Activation T dépendante des LB dans la zone marginale**

**A** : Les LB MZ expriment fortement le CMH-II et les CD80/86, grâce auxquels ils vont activer les LT CD4. En retour les LT CD4 sécrètent des cytokines (IL-4, IL-21, IFN $\gamma$ ) et expriment le CD40L, qui vont activer les LB MZ. Ces derniers vont ainsi subir l'hypermutation somatique et la recombinaison de classe et pourront se différencier en plasmocytes ou en lymphocytes B mémoires. **B** : Les cellules dendritiques de la zone marginale et de la zone péri-artériolaire activent les MZ LB grâce aux marqueurs DCIR2 et CLR DEC205 respectivement. Les LB vont subir la CSR et migreront vers le follicule pour y subir la réaction folliculaire T dépendante. **C** : Les LB de la zone marginale qui ont rencontrés l'antigène perdent l'expression de S1PR au profit de CXCR5, ce qui leur permet d'aller dans le follicule présenter l'antigène aux cellules dendritiques et de revenir dans la zone marginale ensuite.

LB : Lymphocyte B ; LBm : Lymphocyte B mémoire ; LT : Lymphocyte T ; DC : Cellule dendritique ; Pl. : Plasmocyte ; SHM : hypermutation somatique ; CSR : recombinaison de classe. Adapté d'après A. Cerutti *et al.* 2013.

lymphocytes B1 ne se renouvelle que ponctuellement à partir de précurseurs présents dans la moelle osseuse. Plus précisément, un précurseur médullaire permet bien le renouvellement des lymphocytes B1b alors que pour les B1a il semblerait que le renouvellement cellulaire soit quasi inexistant (Dorshkind & Montecino-Rodriguez, 2007).

Ces cellules vont également exprimer un BCR à IgM, qui serait par ailleurs positivement sélectionné lors de leur maturation. Le BCR des lymphocytes B1 est auto-réactif et peu spécifique, il permet la reconnaissance de composants intra-cellulaires ou de corps apoptotiques par exemple (Chou *et al.*, 2009). Bien qu'ils n'expriment pas le facteur de



transcription plasmocytaire *BLIMP1*, les lymphocytes B1 sont capables de sécréter de grandes quantités d'IgM, et on suppose même que le faible pourcentage de B1 présents dans la moelle osseuse et la rate est responsable de la production d'une large majorité des IgM circulants dans le sang (Tumang et al., 2005). Ces IgM circulants vont constituer la première barrière de défense en cas d'infection car ils vont permettre de recruter et d'activer l'ensemble des effecteurs de l'immunité innée.

Cependant, l'activation et la prolifération des lymphocytes B1 est indépendante du BCR et dépend plutôt de la stimulation des TLRs qui sont fortement exprimés chez ces cellules. Ainsi, lors de l'activation des lymphocytes B1 qui passe par la voie NFκB, il est démontré que les cellules migrent depuis la cavité intra-péritonéale vers les organes lymphoïdes secondaires et notamment la rate sous l'effet de MYD88 qui inhibe l'expression du *CD9* notamment (Ha et al., 2006).

## Chapitre II. Lymphomagenèse B

---

Comme nous venons de le voir, les lymphocytes B subissent un développement long, très complexe mais également risqué dans le sens où, à plusieurs occasions (réarrangements V(D)J, SHM, CSR), ces cellules subissent des cassures simples ou doubles brin de leur ADN ainsi que des mutations. Si ces processus sont essentiels pour le développement des LB et nécessaires au maintien d'un répertoire B exhaustif, une erreur peut cependant suffire pour induire de graves conséquences telles que l'émergence d'un lymphome B.

### **A. Classifications des lymphomes B**

Si le terme « lymphome » fait référence à une maladie cancéreuse ayant pour origine une cellule du lignage lymphocytaire, il reste malgré tout très générique puisqu'il existe des dizaines de lymphomes différents. On distingue tout d'abord les lymphomes Hodgkiniens des lymphomes dits non-Hodgkiniens. Ces derniers regroupent les lymphomes T, NK et les lymphomes B qui vont tout particulièrement nous intéresser.

La grande diversité des lymphomes B rend leur classification à la fois complexe mais nécessaire. Ce travail fastidieux est réalisé sur la base d'observations histologiques et moléculaires et permet de mieux comprendre le développement et l'origine des lymphomes. La description qui va suivre propose de s'intéresser aux sous-types de lymphomes B les plus communs et n'a pas vocation à être exhaustive (**Figure 23, Table 1**), la liste complète des lymphomes B est détaillée et régulièrement mise à jour par l'organisation mondiale de la santé (Alaggio et al., 2022).

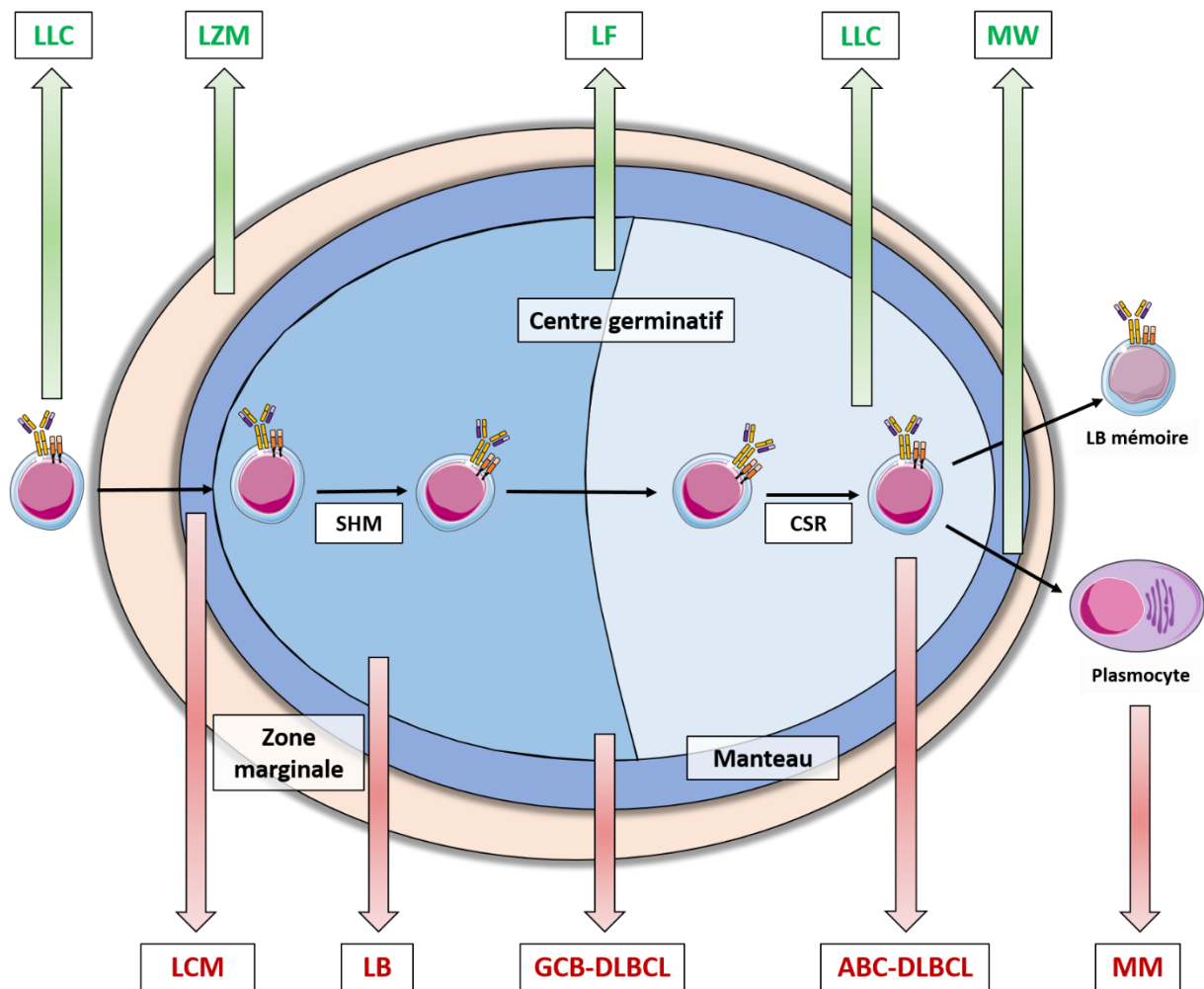
### **B. Les principaux sous-types de lymphomes non-Hodgkiniens B**

#### **1. Les lymphomes B agressifs**

##### **a. Le lymphome Diffus à Grandes Cellules B**

Le DLBCL (pour « Diffuse Large B-Cell Lymphoma ») est le plus courant des lymphomes agressifs, puisqu'il représente à lui seul 31% des lymphomes B. D'abord identifié par la présence de grandes cellules B, l'émergence des techniques d'analyses moléculaires a par la suite permis de distinguer trois sous-catégories de DLBCL en fonction de leur profil mutationnel. Ainsi, les « Germinal Center B cell-like » DLBCL (GCB-DLBCL) qui possèdent un profil similaire aux lymphocytes B du centre germinatif sont distingués des « Activated B cell-like » DLBCL (ABC-DLBCL) dont le profil ressemble plutôt aux lymphocytes B activés.

La troisième catégorie regroupe les DLBCL qui ne correspondent à aucun des deux premiers profils (Alizadeh et al., 2000). Cette classification a permis de démontrer que les ABC-DLBCL étaient de plus mauvais pronostic que les GCB-DLBCL. De plus, cette classification a permis d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteints de DLBCL puisqu'il a été démontré que la réponse aux thérapies n'était pas la même selon que le DLBCL soit de type GCB ou ABC (Rosenwald et al., 2002). Enfin, il faut également noter que la mutation de la protéine MYD88 est fréquemment retrouvée dans les DLBCL de type ABC.

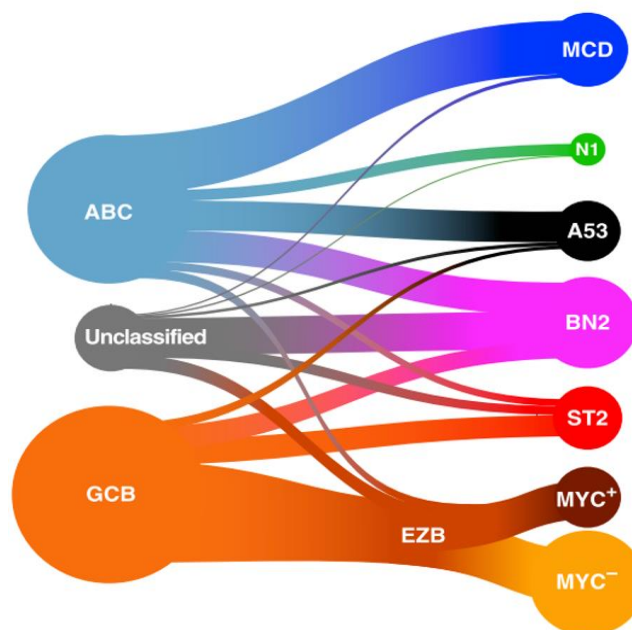


**Figure 23 : Origine de différents lymphomes B non-Hodgkiniens resituée**

LLC : Leucémie lymphoïde chronique ; LZM : Lymphome de la zone marginale ; LF : Lymphome folliculaire ; MW : Maladie de Wamdenström ; LCM : Lymphome à cellules du manteau ; LB : lymphome de Burkitt ; GCB-DLBCL : Lymphome à grandes cellules B du centre germinatif ; ABC-DLBCL : Lymphome à grandes cellules B activées ; MM : Myélome multiple.

Cependant, cette classification des DLBCL n'était pas parfaite et certains cas ne correspondaient à aucun des deux groupes. Grâce à l'arrivée des techniques moléculaires haut débit, une seconde classification a vu le jour plus récemment. Cette classification se base sur les profils mutationnels, profils d'expression génique et s'allie à un algorithme mathématique pour classer les DLBCL en 7 clusters (Wright et al., 2020) (**Figure 24**).

Cette nouvelle classification inclut à présent tous les cas de DLBCL. Les DLBCL étant très hétérogènes, l'origine cellulaire de la maladie ne peut pas formellement être identifiée.



**Figure 24 : Evolution de la classification des DLBCL**

Jusqu'alors classés en 3 sous-catégories dont une qui ne possédait pas de caractéristiques propres, les DLBCL sont aujourd'hui subdivisés en 7 clusters. Le lien entre les deux classifications est ici représenté. GW. Wright *et al.* Cancer Cell. 2020.

### **b. Le lymphome du manteau**

Le Lymphome à Cellules du Manteau (LCM) est un autre type de lymphome agressif se développant au niveau du manteau folliculaire. La cellule d'origine pourrait être un lymphocyte B1a exprimant le CD5 (Pieters *et al.*, 2021). Deux sous catégories de LCM sont distinguées :

- (i) un groupe qui semble se développer à partir d'un LB naïf, présent dans le manteau et n'ayant pas subi la SHM. Dans ce groupe la surexpression du facteur *SOX-11* est caractéristique et l'agressivité tumorale est très prononcée (Queirós *et al.*, 2016) ;
- (ii) le second sous-groupe de LCM semble dériver d'un LB post-CG ou d'un LB mémoire, ayant subi la SHM. Ce sous-groupe sous-exprime au contraire le facteur *SOX-11* et possède un index prolifératif plus modéré que le premier (Navarro *et al.*, 2012).

Quel que soit le sous-groupe du MCL, celui-ci est caractérisé par la présence de plusieurs altérations génétiques :

- La translocation  $t(11;14)(q13;q32)$  est retrouvée dans l'immense majorité des cas de LCM. Cette translocation va placer le gène *CCND1*, situé sur le chromosome 11, dans le locus *IGH* (chromosome 14). La conséquence est une forte surexpression de ce gène *CCND1*, qui code pour la CYCLINE D1. La CYCLINE D1 active les CYCLINES DEPENDANTES KINASES 4 et 6 (CDK4 et 6) qui, en retour, vont inhiber la protéine inhibitrice du cycle cellulaire RB, favorisant la transition G1-S du cycle cellulaire. Ainsi, la surexpression de la *CCND1* induit une activation constitutive du cycle cellulaire et une prolifération anarchique (Albero et al., 2018).
- La délétion du gène *CDKN2A* est retrouvée dans 20 à 25% des cas de MCL (Pinyol et al., 1997). Ce gène code pour l'inhibiteur INK4, qui inhibe normalement l'action des CDK 4 et 6. La délétion de ce gène conduit également à une activation constitutive du cycle cellulaire et une prolifération excessive.
- L'amplification de *CDK4* (Hernández et al., 2005) et les mutations du gène *CCND1* (Mohanty et al., 2016) sont retrouvées plus ponctuellement dans le LCM, mais toutes conduisent au même résultat : une prolifération anarchique due à la dérégulation du cycle cellulaire.

Une étude d'expression génique haut débit a récemment permis de distinguer plusieurs sous-groupes de LCM, chacun de ces groupes possède une valeur pronostic propre allant du cluster 1 (meilleur pronostic) au cluster 4 (plus mauvais pronostic) (Yi et al., 2022).

### c. Le lymphome de Burkitt

Le lymphome de Burkitt est le lymphome agressif dont les causes ont été les mieux établies. Le fait de retrouver la présence du Virus Epstein Barr (EBV) dans plus de 90% des cas montre que ce virus joue un rôle important dans l'émergence de ce lymphome (Grande et al., 2019). Qui plus est, l'exposition chronique à certains pathogènes ou encore la forte prévalence de maladies telles que la malaria ont été identifiées comme des facteurs de risques au développement du lymphome de Burkitt (Rochford, 2021). Ces raisons expliquent la forte hétérogénéité de prévalence et de mortalité du lymphome de Burkitt, qui est peu fréquent et rarement mortel dans les pays développés alors qu'il est très fréquent et dévastateur dans les pays sous-développés d'Afrique notamment.

On retrouve dans plus de 80% des cas une translocation du gène *MYC* au niveau des chaînes lourdes d'Ig, et plus rarement au niveau des chaînes légères (Dalla-Favera et al., 1982). Cette translocation  $t(8;14)(q24;q32)$  place l'oncogène c-MYC sous la dépendance du locus *IGH* (*IGκ* ou *IGλ* dans certains cas) et induit sa surexpression. Il est possible de distinguer deux types de translocations : les translocations ayant eu lieu lors de la SHM vont placer le gène *MYC* à proximité des gènes V(D)J réarrangés, alors que les translocations ayant lieu lors de la CSR vont déplacer le gène *MYC* au niveau des régions Switch en amont des gènes codants les régions constantes (Küppers & Dalla-Favera, 2001). Ces éléments poussent à penser que la cellule d'origine du lymphome de Burkitt serait un lymphocyte B du CG. Dans tous les cas, la suractivation de c-MYC associée à la présence de l'EBV va conduire à une prolifération très importante des cellules tumorales. L'instabilité génomique ambiante dans le CG va, de plus, permettre la survenue de très nombreux événements génétiques favorisant le caractère tumoral (*ID3*, *P53*, *CCND3*, *ARID1A*, *SMARCA4*, ...) (López et al., 2022).

#### **d. Le myélome multiple**

Le myélome multiple (MM) est un type de lymphome particulier puisqu'il tire son origine non pas d'un LB mais plutôt de sa forme la plus différenciée, le plasmocyte. Le myélome multiple fait partie d'un groupe de pathologies appelée les gammopathies monoclonales. En effet, dans le cas du MM, les symptômes cliniques ne vont pas en majorité être causés par la présence et la prolifération de la tumeur, mais plutôt par l'énorme quantité d'anticorps monoclonaux que sécrètent les cellules tumorales. Ces anticorps parfois auto-immuns vont provoquer des neuropathies, un syndrome d'hyper-viscosité, des maux de tête, ... L'ensemble des symptômes caractéristiques du MM est référencé sous l'acronyme CRAB (hyperCalcémie, insuffisance Rénale, Anémie, troubles osseux ou « Bone » en anglais) (Rajkumar et al., 2014).

Les MM sont des pathologies très hétérogènes et il est difficile d'en identifier la cause exacte. Cependant plusieurs altérations génétiques ont été retrouvées :

- La translocation  $t(11;14)$  qui, comme pour le lymphome du manteau, induit la translocation du gène *CCND1* au niveau du locus *IGH*. Le cycle cellulaire est dans ce cas dérégulé. Cette translocation est retrouvée dans 14% des cas.
- Dans 11% des cas la translocation  $t(4;14)$  va induire la surexpression du facteur *NSD2*, ce qui a pour effet de compromettre fortement l'intégrité épigénétique du génome.
- Les mutations de *KRAS* et *NRAS* (23 et 20% respectivement) vont être responsables d'une prolifération cellulaire anarchique causée par une activation constitutive de la voie des MAP kinases.

Dans la plupart des cas les cellules du myélome sont localisées dans la moelle osseuse puisque c'est le lieu de destination finale des plasmocytes (Kumar et al., 2017).

## **2. Les lymphomes B indolents**

### **a. Le lymphome folliculaire**

Le lymphome folliculaire est le plus fréquent des lymphomes indolents. Il semblerait que la cellule d'origine du lymphome folliculaire soit un lymphocyte B du CG, puisque ses cellules partagent plusieurs caractéristiques communes avec eux (expression de *BCL6*, du *CD10*, ...) (Victoria et al., 2012).

Le lymphome folliculaire est caractérisé par la translocation  $t(14;18) (q21;32)$  qui place le facteur anti-apoptotique *BCL2* sous dépendance du locus *IGH*. En temps normal les LB du CG sont très sensibles à l'apoptose afin de garantir que les étapes de sélection dans le CG entraînent bien l'élimination des LB de moindre affinité pour l'antigène. Cette susceptibilité accrue à la mort cellulaire s'explique par l'expression de *BCL6*, qui inhibe en retour *BCL2*.

Dans le cas du lymphome folliculaire, les LB sur-exprimant *BCL2* ne vont pas subir d'apoptose quelle que soit leur condition face à l'antigène. En conséquence ils vont effectuer continuellement des allers retours entre la zone claire et la zone sombre du CG. A chaque passage dans la zone sombre, les cellules tumorales vont proliférer ; puis de retour dans la zone claire elles vont acquérir à chaque fois un peu plus de mutations secondaires favorisant le développement tumoral.

Le pool de cellules tumorales se développe donc de façon lente et continue dans le temps, ce qui explique que ce lymphome ait plutôt un phénotype indolent (Carbone et al., 2019).

### **b. La leucémie lymphoïde chronique**

On subdivise la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) en deux sous catégories, qui diffèrent en terme d'origine mais également de devenir. Le premier sous-groupe de LLC est constitué de LB naïfs qui n'ont pas encore subi la SHM, alors que le second sous-groupe est constitué de LB post-CG exprimant une Ig hypermutée. Les LLC non réarrangées sont de plus mauvais pronostic (Hamblin et al., 1999).

Environ 80% des patients atteints de LLC possèdent au moins une des altérations génétiques suivantes :

- *Del (13q)* : Cette délétion est la plus fréquente. La délétion d'une partie du chromosome 13q induit la perte des gènes codant les miRNA *MIR-15a* et *MIR-161*, qui répriment normalement l'expression de gènes tels que *BCL2*, *CCND1* ou *TP53* (Klein et al., 2010).
- *Del 11q* : La délétion 11q, retrouvée à 18% des cas, est à l'origine de la perte du gène codant la protéine *ATM*, qui est normalement impliquée dans la réparation de l'ADN.
- Trisomie 12 : la trisomie 12 est retrouvée chez environ 16% des patients.
- *Del (17p)* : Retrouvée dans 7% des cas, cette délétion est responsable de la perte du gène *TP53*, codant pour la protéine P53 qui est un régulateur majeur du cycle cellulaire (Zenz et al., 2010).

Le taux de mutations est très élevé dans les cellules de la LLC. Ces dernières vont impacter des voies de survie, de prolifération ou encore altérer les mécanismes de réparation de l'ADN, ce qui favorise encore plus l'instabilité génomique.

### **c. Le lymphome de la zone marginale**

Le Lymphome de la Zone Marginale (LZM) est extrêmement hétérogène puisqu'il peut toucher une multitude d'organes. Ainsi on distingue trois sous-types selon la localisation de la tumeur :

(i) le lymphome du MALT (« extranodal MZL of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue ») qui se développe dans le tissu lymphoïde associé aux muqueuses. Dans cette forme gastrique du lymphome, il a clairement été établi que ce dernier était provoqué par la présence de la bactérie *Helicobacter Pylori* au niveau de l'estomac (Cerhan & Habermann, 2021).

(ii) Le LZM splénique, avec une accumulation de cellules dans la rate, ainsi que dans le sang et la moelle osseuse.

(iii) le LZM ganglionnaire.

Il semble que l'émergence du LZM soit favorisée par la présence de LB auto-immuns, bien que le clone tumoral qui se développe n'ait pas forcément de lien avec ces LB auto-immuns (Xochelli et al., 2019).

Côté génétique, les altérations qui affectent le LZM sont aussi variées que la maladie est hétérogène. Toutefois, on peut notamment distinguer :

- La translocation  $t(11;18) (q21;q21)$  : cette translocation présente dans 15 à 50% des cas induit la formation d'une protéine de fusion BIRC3/MALT1 qui va entraîner une activation constitutive de la voie NFκB (Zucca & Bertoni, 2016).
- La translocation  $t(14;18) (q32;q21)$  retrouvée chez 15 à 20% des patients. Dans ce cas le gène *MALT1* est placé sous dépendance du locus *IGH*. La protéine MALT1 va donc être surexprimée et, ici encore, induire une expression exacerbée de la voie NFκB.
- La translocation  $t(3;14) (p14.1;q32)$  : cette translocation place le gène *FOXP1* sous la dépendance du locus *IGH*. La surexpression de *FOXP1* réprime de nombreux gènes pro-apoptotiques tels que *BIK*, *EAF2* et *HRK* et augmente la survie en lien avec la voie NFκB (van Keimpema et al., 2014).

Malgré sa génétique instable, le LZM reste bien un lymphome indolent puisque la survie des patients au diagnostic est supérieure à 10 ans (Olszewski & Castillo, 2013).

#### d. La maladie de Waldenström

Cette partie n'a pas d'autre vocation que de situer la Maladie de Waldenström (MW) comme étant bien un lymphome indolent. Il n'est nul besoin de rentrer plus en détail ici puisque le chapitre suivant est entièrement consacré à cette maladie.

**Tableau 1 : Récapitulatifs des principales caractéristiques des lymphomes B cités**

Lymphome	Anomalie génétique majeure	Autres anomalies génétiques	Origine
Lymphome diffus à grandes cellules	Hétérogène	Hétérogène	LB du CG/post CG
Lymphome du manteau	$t(11;14)(q32;q32)$ Translocation <i>IgH/CCND1</i>	<i>Del CDKN2A</i> Amplification <i>CDK4</i> Mutations <i>CCND1</i>	LB naïf du manteau ou LB post CG
Lymphome de Burkitt	$t(8;14)(q24;q32)$ Translocation <i>IgH/c-MYC</i>	Mutations <i>ID3</i> ; <i>P53</i> ; <i>CCND3</i> ; <i>ARID1A</i> ; <i>SMARCA4</i> ; ...	LB du CG
Myélome multiple	Mutations <i>KRAS</i> et <i>NRAS</i>	$t(11;14)(q32;q32)$ = surexpression de <i>CCND1</i> $t(4;14)$ = surexpression de <i>NSD2</i>	Plasmocyte post-CG
Lymphome folliculaire	$t(14;18) (q21;32)$ Translocation <i>IgH/BCL2</i>	Hétérogène	LB du CG
Leucémie lymphoïde chronique	<i>Del (13q)</i> <i>Del MIR-15a MIR-161</i>	<i>Del (11q)</i> = <i>Del ATM</i> Trisomie 12 <i>Del (17p)</i> = <i>Del TP53</i>	LB naïf ou LB post-CG
Lymphome de la zone marginale	$t(11;18) (q21;q21)$ Protéine de fusion BIRC3/MALT1	$t(14;18) (q32;q21)$ = surexpression MALT1 $t(3;14) (p14.1;q32)$ = surexpression FOXP1	LB de la zone marginale



## Chapitre III. La maladie de Waldenström

---

### A. Historique et épidémiologie

#### 1. Historique de la maladie de Waldenström

En 1944 Jan Gosta Waldenström, médecin Suédois, publie un article dans le journal « Acta medica Scandinavica ». Dans cet essai, il partage ses réflexions sur le cas de trois de ses patients nés dans les années 1880 (environ 60 ans au moment de l'étude). Les deux premiers présentent des symptômes similaires, une forte anémie associée à des saignements du nez et des gencives. Ces patients ne présentent pas de phase leucémique, mais le Dr Waldenström distingue des modifications au niveau de la moelle osseuse qu'il ne parvient pas franchement à expliquer. Il distingue également une hypergammaglobulinémie mais remarque une absence de douleurs chronique et une évolution lente de la maladie qui n'a pratiquement pas évolué sur le temps de suivi des patients (7 et 2 ans respectivement) (Waldenström, 1944).

A la suite de ces travaux, la maladie de Waldenström (MW) est classée en tant que syndrome lymphoprolifératif par la Classification Européenne/Américaine des néoplasmes lymphoïdes révisée (EALR) en 1944. Il faudra attendre 2001 pour voir figurer la MW dans la liste des Lymphomes LymphoPlasmocytaires (LLP) par l'Organisation Mondiale de la Santé (ES et al., 2001).

#### 2. Epidémiologie de la maladie de Waldenström

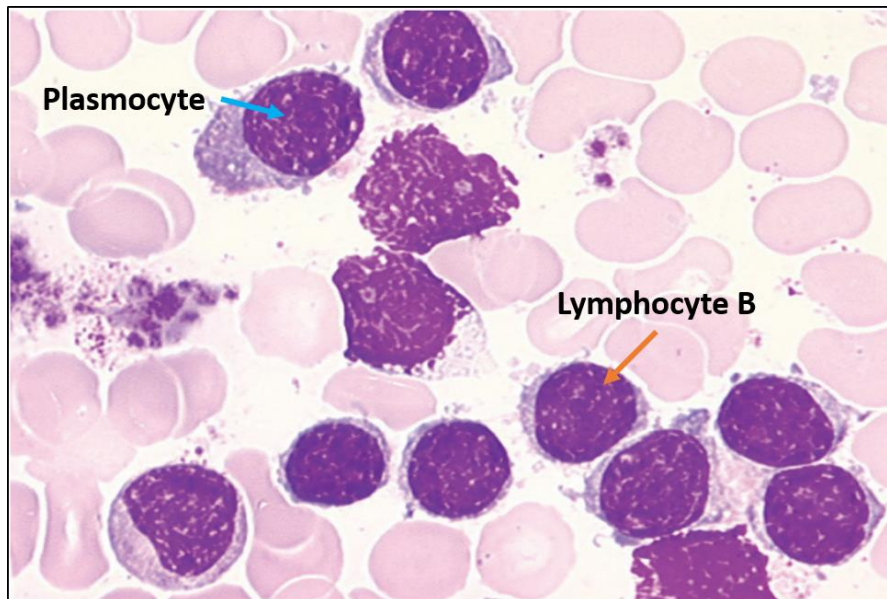
Les LLP dans leur ensemble ne comptent que pour 2% des affections lymphoïdes décelées chaque année. (McMaster, 2023) ; et parmi ces LLP, la MW est la représentante majeure avec 57% des cas.

On recense 0,85 cas de MW pour 100 000 personnes en moyenne, mais cette fréquence s'avère deux fois plus importante au sein des population Européennes et elle touche deux fois plus d'hommes que de femmes. La MW est une pathologie qui affecte le sujet âgé : l'âge moyen au diagnostic est de 73 ans, et le risque de développer la MW est maximal entre 60 et 70 ans (Pophali et al., 2019).

### B. Critères diagnostiques de la maladie de Waldenström

En pratique, la MW est difficilement différenciable du myélome multiple à IgM ou d'un autre LLP. Le suivi thérapeutique entre ces différentes maladies n'étant pas le même, il est malgré tout essentiel de pouvoir les différencier.

Concernant la MW et comme cité plus haut, elle se développe dans la moelle osseuse avec la prolifération plus ou moins abondante d'un clone qui regroupe un spectre continu qui va de la cellule B progénitrice au plasmocyte différencié, le plus souvent de classe IgM : on parle de continuum de différenciation lymphoplasmocytaire (Gayet et al., 2022). Il a de plus été démontré que ce clone exprime les marqueurs du lignage B CD19+, CD20+, CD22+, CD25+, CD27+, CD45+ ; et qu'il n'exprime en revanche pas les marqueurs CD10, CD23, CD38 (Elimimian et al., 2021). Les petits lymphocytes B possèdent un gros noyau central qui occupe presque tout le cytoplasme, alors que les lymphoplasmocytes sont généralement distingués par la présence d'un noyau excentré (**Figure 25**) (Leblond et al., 2013).



**Figure 25 : Histologie médullaire de la maladie de Waldenström**

La MW est caractérisée par la prolifération dans la moelle osseuse d'un clone lymphoplasmocytaire, qui regroupe tous les stades de différenciations intermédiaires entre le lymphocyte B et le plasmocyte. D'Après V. Leblond *et al.* Revue Francophone des laboratoires 2013.

Associé au développement du clone tumoral, on retrouve dans le sang des patients la présence accrue d'immunoglobulines, phénomène que l'on nomme hypergammaglobulinémie. L'hypergammaglobulinémie est détectée lors d'une électrophorèse des protéines effectuée sur le sérum (EPS). Sur l'EPS d'un patient sain nous remarquons un très léger dôme au niveau de la fraction des gamma-globulines, qui signe une concentration normale en Ig. En revanche pour les patients atteints de MW, il est notable que le dôme discret laisse place à un grand pic étroit. Ce pic signe la présence accrue d'Ig monoclonales, qui sont généralement d'isotype IgM (Kyle et al., 2006) (**Figure 26**).

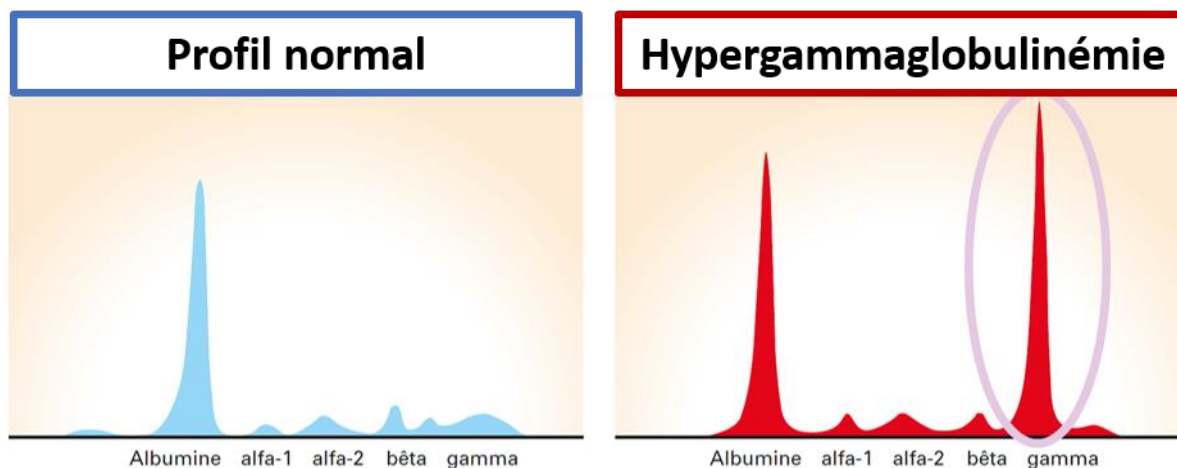
Bien qu'étant une conséquence de la concentration élevée de lymphoplasmocytes dans la moelle osseuse l'hypergammaglobulinémie peut à elle seule provoquer des symptômes lourds.

### **C. Manifestations cliniques de la maladie**

Les manifestations cliniques de la MW sont liées à l'infiltration du clone tumoral dans la moelle et à la forte quantité d'IgM retrouvée dans le sang. On peut distinguer 3 stades d'évolution.

#### **1. Phase indolente Stade MGUS**

Le MGUS (« Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance ») ou Gammopathie monoclonale à significativité indéterminée n'a pas d'autre manifestation que l'hypergammaglobulinémie. Généralement, ce stade est décelé de façon fortuite lors d'un examen clinique sanguin réalisé dans le cadre d'une autre pathologie. De fait seuls 19 à 28%



**Figure 26 : Exemples de profils en électrophorèse des protéines sériques**

L'électrophorèse des protéines sériques permet de séparer l'albumine, les alpha-1/alpha-2 globulines, les bêta-globulines et les gammaglobulines. Chez les patients atteints de la MW on distingue dans les gammaglobulines un pic haut et fin, significatif d'une hypergammaglobulinémie monoclonale. Adapté d'après <https://www.af3m.org/uploads/PDF/Guides/Livret-myelome.pdf>.

des patients atteints de MW sont symptomatiques au diagnostic (Pophali et al., 2019). Chez les patients atteints de MGUS, on peut retrouver l'infiltration d'un clone lymphoplasmocytaire dans la moelle osseuse mais celle-ci ne doit pas dépasser 10%.

Cette affection n'est pas rare, puisqu'elle concerne environ 3,5% des personnes de plus de 50 ans.

## **2. Phase MW asymptomatique**

Afin d'être considéré en phase MW asymptomatique, le patient doit présenter une hypergammaglobulinémie monoclonale à IgM sérique associé à la détection d'un clone lymphoplasmocytaire envahissant la moelle osseuse à hauteur d'au moins 10% ; mais il ne doit cependant présenter aucun autre symptôme.

La phase asymptomatique de la MW peut durer plusieurs années sans être soupçonnée, le taux de progression vers une phase symptomatique étant de 6% à 1 an ; 39% à 3 ans ; 59% à 5 ans et 68% à 10 ans (Kyle et al., 2012).

## **3. Phase MW symptomatique**

Comme l'a suspecté Jan Waldenström il y a plusieurs décennies, les manifestations cliniques de la MW sont très discrètes et ne surviennent que tardivement lors de la phase symptomatique de la maladie. Plus précisément, on commence à parler de phase symptomatique de la MW lorsque les premiers symptômes apparaissent. A savoir que la majorité des symptômes ne va pas être provoquée par le clone tumoral lui-même mais plutôt

de façon indirecte à cause de la sécrétion excessive d'IgM. Dans des cas plus rares, la MW peut même impacter des organes secondairement à l'invasion médullaire.

➤ **Altération de l'état général :**

Les premiers symptômes de la MW sont peu spécifiques, on retrouve de la fatigue excessive, une perte de poids importante, des migraines, de la fièvre provoquant des sueurs, et parfois des arthralgies.

➤ **Altérations liées à la sécrétion d'IgM :**

L'hypersécrétion d'IgM dans le sang va provoquer un grand nombre de symptômes, certains étant très dommageables (**Figure 27**) :

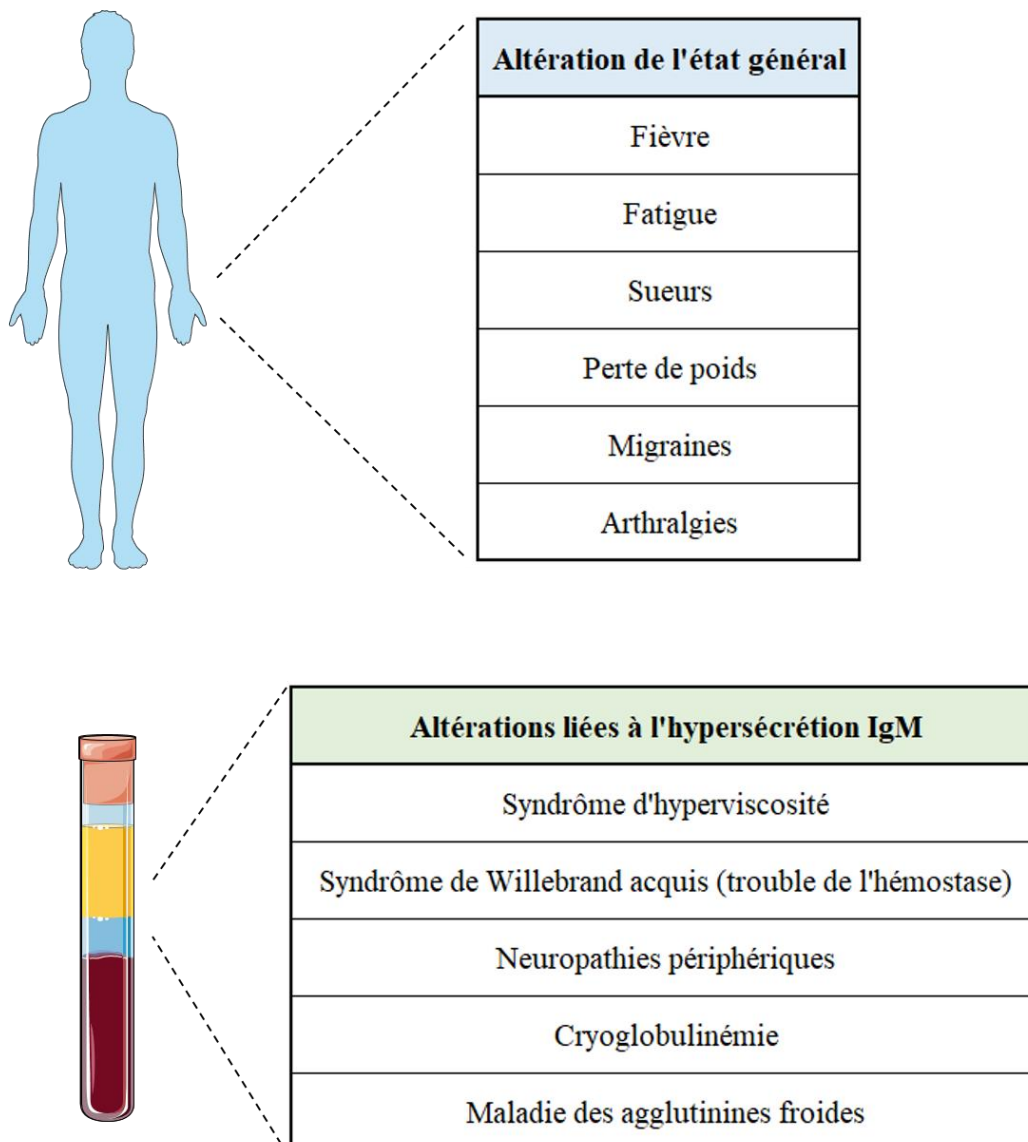
- ❖ On retrouve le syndrome d'hyperviscosité, qui fait référence à la baisse importante de fluidité du sang, qui va entraîner la rupture de vaisseaux sanguins plus ou moins gros, provoquant des saignements et hémorragies. Pour la même raison, l'oxygénation de l'organisme va se trouver fortement perturbée et réduite (Stone, 2009).
- ❖ Dans 15% des cas, les patients présentent un syndrome de Willebrand acquis. Cette pathologie est provoquée par une perte plus ou moins importante du facteur de Willebrand, qui est un acteur essentiel du mécanisme de coagulation. En conséquence, ce syndrome provoque des saignements spontanés et un déficit de coagulation d'intensité variable (Castillo et al., 2017).
- ❖ On peut également retrouver la présence de neuropathies périphériques. Les neuropathies sont très fréquentes dans la MW, on parle d'environ 48% des patients. Il a été démontré que, parmi la grande proportion d'IgM sécrétées, certaines sont capables de reconnaître les motifs glycosylés associés à la myéline qui compose la gaine éponyme, dont le rôle est de protéger les fibres nerveuses. Cette gaine de myéline va par conséquent être dégradée, sensibilisant les nerfs et les rendant avec le temps non-fonctionnels (Levine et al., 2006).
- ❖ Dans 20% des cas les patients présentent une cryoglobulinémie. Ce symptôme a été détecté lors des premières observations faites par le Dr Waldenström en 1944, et se caractérise par une précipitation anormale des IgM dans le sang à basse température ; qui peut provoquer des thromboses (Stone & Pascual, 2010).
- ❖ Enfin, 10% des cas de MW présentent une maladie des agglutinines froides. A basse température, des IgM auto-immuns vont provoquer l'éclatement des globules rouges dans le sang (Berentsen, 2009).

➤ **Atteintes d'organes secondaires :**

Dans 25% des cas de MW, une invasion extramédullaire est détectée, entraînant une hépatomégalie, splénomégalie ou lymphadénopathie (Kapoor et al., 2015). Des atteintes rénales ont également été décelées même si elles sont plus rares (ne concernent que 8% des patients environ (Banwait et al., 2015)). Parmi ces atteintes rénales nous allons retrouver une infiltration directe du clone tumoral dans le rein, et également des pathologies classiquement retrouvées dans les maladies causant une production en excès d'Ac telles que les

gammopathies monoclonales (amylose AL, maladie de dépôt de chaînes légères ou lourdes, etc...) (Uppal et al., 2019).

La durée de survie moyenne après diagnostic de la MW est d'environ 5 ans. Etant donné que les patients diagnostiqués sont en moyenne âgés, moins ils le seront et plus leur survie sera longue (Riva et al., 2022).



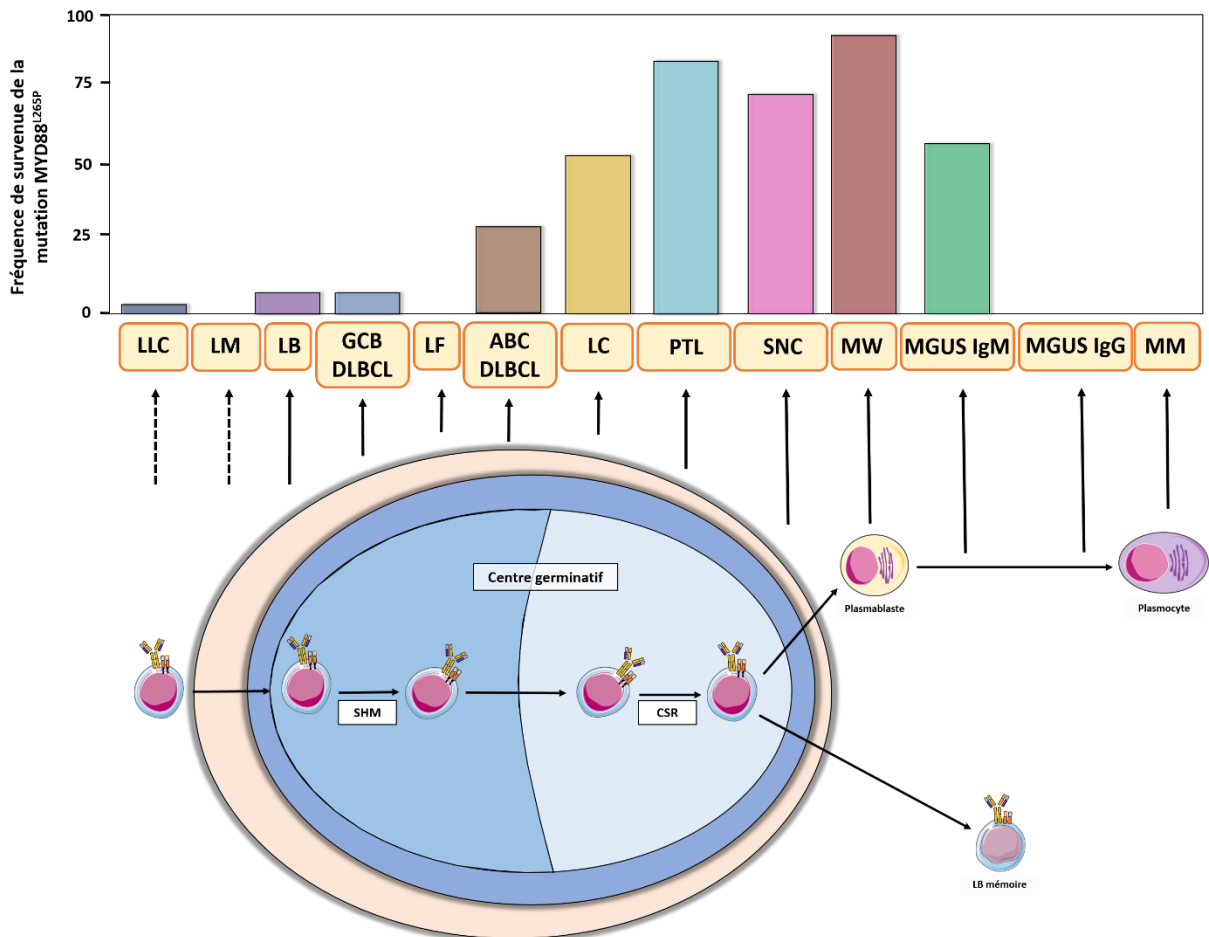
**Figure 27 : Récapitulatif des symptômes de la maladie de Waldenström**

La MW dans sa phase symptomatique provoque des effets généraux tels que la fatigue, fièvre ou perte de poids ; mais les symptômes les plus graves sont provoqués par l'hypersécrétion d'IgM dans le sang.

## D. Evènements génétiques associés à la maladie de Waldenström

### 1. Mutations de *MYD88*

En 2011, N.Go *et al.* a démontré l'existence de mutations dans le gène *MYD88* et leur implication dans plusieurs types de lymphomes B, la plus notable étant la mutation L265P. La mutation *L265P* de *MYD88* se démarque par sa forte capacité à induire l'activation des voies NFκB et JAK/STAT de façon constitutive. Elle apporte par conséquent aux cellules tumorales une capacité accrue à la prolifération et à la survie (Ngo *et al.*, 2011).

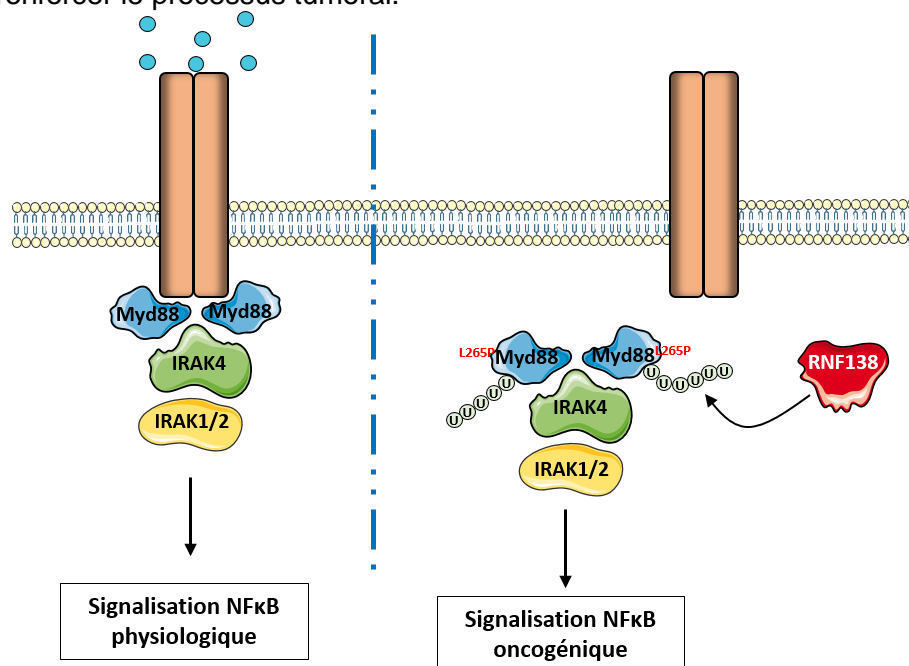


**Figure 28 : Fréquence de survie de la mutation MYD88L265P en fonction des différents lymphomes B et de leur origine cellulaire**

La mutation L265P de MYD88 est quasiment inexistante dans les lymphomes pré et post- centre germinatif. Sa fréquence est particulièrement élevée chez les lymphomes qui prennent leur origine dans le CG en revanche. LLC : leucémie lymphoïde chronique ; LM : lymphome du manteau ; LB : lymphome de Burkitt ; GCB DLBCL : lymphome diffus à grandes cellules type centre germinatif ; LF : lymphome folliculaire ; ABC DLBCL : lymphome diffus à grandes cellules type activé ; LC : lymphome cutané ; PTL : lymphome testiculaire ; SNC : lymphome du système nerveux central ; MW : maladie de Waldenström ; MM : myélome multiple. Adapté d'après X. Yu *et al.* Cancer res. 2018.

En 2012, SP. Treon *et al.* montre que la mutation *L265P* de *MYD88* est présente dans environ 90% des cas de MW, et ces résultats sont confirmés en 2013 par S. Poulain *et al.* (Poulain *et al.*, 2013; Treon *et al.*, 2012). Dès lors, en cas de suspicion de MW la mutation *MYD88<sup>L265P</sup>* est systématiquement recherchée. La présence de cette mutation n'est pas exclusive à la MW, puisqu'on peut notamment la retrouver dans 74% des cas de « DLBCL testiculaire » ; 70% des cas de « DLBCL du système nerveux central » (SNC) ; ou encore 54% des cas de « DLBCL cutané » (CTL). De manière intéressante, La mutation *MYD88<sup>L265P</sup>* est également retrouvée dans une large proportion de MGUS à IgM (56%) et de DLBCL de type ABC (24%) (Yu *et al.*, 2018) ; ce qui montre que la mutation de *MYD88* est préférentiellement retrouvée dans les lymphomes du CG (**Figure 28**).

Cependant, la réelle cause mécanistique de ce phénomène est restée assez floue. Cependant, en 2021, Yu *et al.* avance une explication. Il démontre en effet que lorsque la mutation *L265P* est présente, elle modifie la conformation de la protéine *MYD88* ce qui a pour effet d'augmenter très sensiblement l'affinité de *RNF138* pour *MYD88*. *RNF138* est une ubiquitine ligase E3, qui poly-ubiquitine *MYD88* au site K63 uniquement lorsque cette dernière porte la mutation *L265P*. Lorsque *MYD88<sup>L265P</sup>* est poly-ubiquitinée, son affinité pour *IRAK4* est augmentée d'un facteur 20. Ainsi, cette poly-ubiquitination par *RNF138* spécifique de la forme mutée *L265P* de *MYD88* permet alors former le myddosome et d'activer la voie *NFκB* constitutivement et indépendamment de la stimulation des récepteurs en amont (Yu *et al.*, 2021) (**Figure 29**). La voie *NFκB* suractivée va augmenter très fortement la prolifération et la survie des cellules mutées, leur laissant l'occasion d'acquérir des mutations secondaires qui vont venir renforcer le processus tumoral.



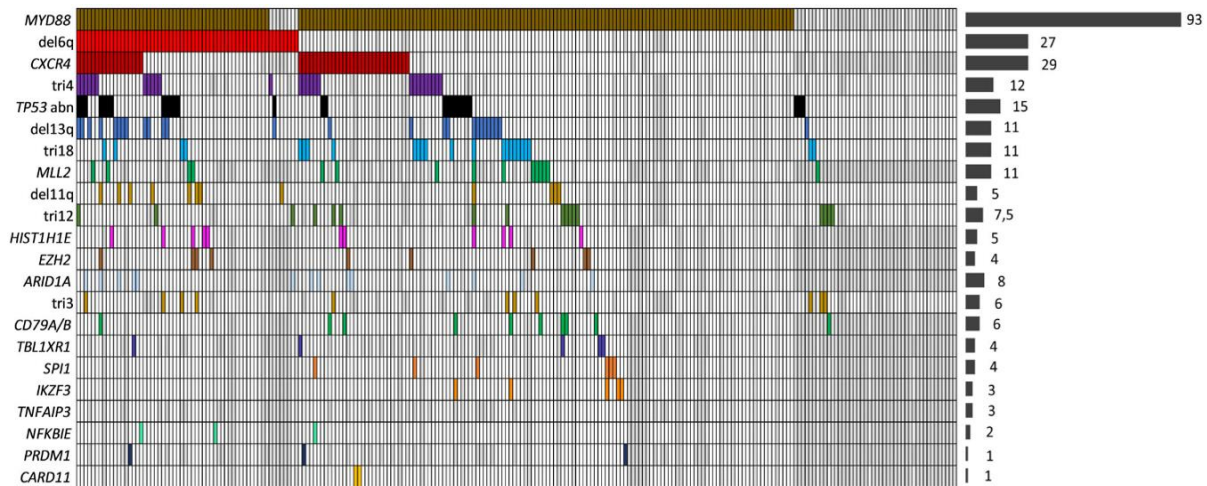
**Figure 29 : Signalisation NFκB oncogénique dépendante de la mutation *MYD88L265P***

En temps normal, la voie *NFκB* n'est activée que lorsque les récepteurs en amont (TLR, IL1R) sont stimulés. Il y a recrutement de *MYD88* qui va permettre la formation du myddosome et initier l'activation de la voie. La mutation *L265P* de *MYD88* va augmenter fortement l'affinité de *RNF138* pour ce dernier ; *MYD88* va donc être ubiquitiné au site K63. Ainsi activé *MYD88<sup>L265P</sup>* peut former le myddosome et initier la signalisation *NFκB* indépendamment des récepteurs. Adapté d'après X. Yu *et al.* Blood 2021.

## 2. Autres mutations associées à la maladie

Si la mutation *MYD88*<sup>L265P</sup> est retrouvée dans la quasi-totalité des cas de MW, d'autres évènements génétiques vont participer au développement de la maladie.

Dans cette figure issue de D. Krzish *et al.* sont présentés les évènements génétiques les plus fréquemment retrouvés dans une cohorte de 239 patients atteints de MW (Krzisch *et al.*, 2021) (**Figure 30**). Afin de mieux comprendre les mécanismes génétiques qui conduisent au développement de la MW, de brèves précisions vont être apportées sur les principales anomalies génétiques.



**Figure 30 : Evènements génétiques impliqués dans la maladie de Waldenström**

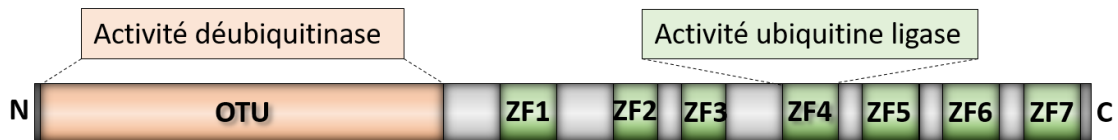
Liste des différents évènements génétiques associés à la maladie de Waldenström. D'après D. Krzisch *et al.* Am J Hematol. 2021.

### a. Délétion du chromosome 6q (*Del 6q*)

La délétion du bras long du chromosome 6 (*Del 6q*) est un évènement très fréquent puisqu'elle touche 50% des patients atteints de MW. Cette délétion peut être partielle ou totale. Quoiqu'il en soit selon le travail de Garcia-Sanz *et al.*, la *Del 6q* est peu fréquente dans les MGUS à IgM (9%) mais fréquemment retrouvée dans la MW (30%), ce qui pourrait signifier qu'il s'agisse d'un des évènements génétiques favorisant le passage du MGUS vers la MW. De même, il montre que le risque d'évolution vers une forme symptomatique de la MW est 28 fois plus important pour les patients présentant la *Del 6q* (Ocio *et al.*, 2007).

Côté mécanistique, le bras long du chromosome 6 porte notamment le gène *TNFAIP3*. Ce gène code pour une déubiquitinease nommée A20, qui est directement impliquée dans la régulation négative de la voie NFκB. A20 est constituée d'un domaine OTU qui lui permet d'exercer son activité de déubiquitinease ; alors qu'un second domaine ZF4 lui permet, à l'inverse, une activité d'ubiquitine ligase E3 (Ma & Malynn, 2012) (**Figure 31**). *TNFAIP3* est un gène cible majeur de la voie NFκB. En effet, A20 va induire un rétro-contrôle négatif sur cette voie en exerçant son activité déubiquitinease d'une part sur TRAF6 et d'autre part sur NEMO en retirant la chaîne de poly-ubiquitination qui lui permet de constituer un complexe IKK actif.



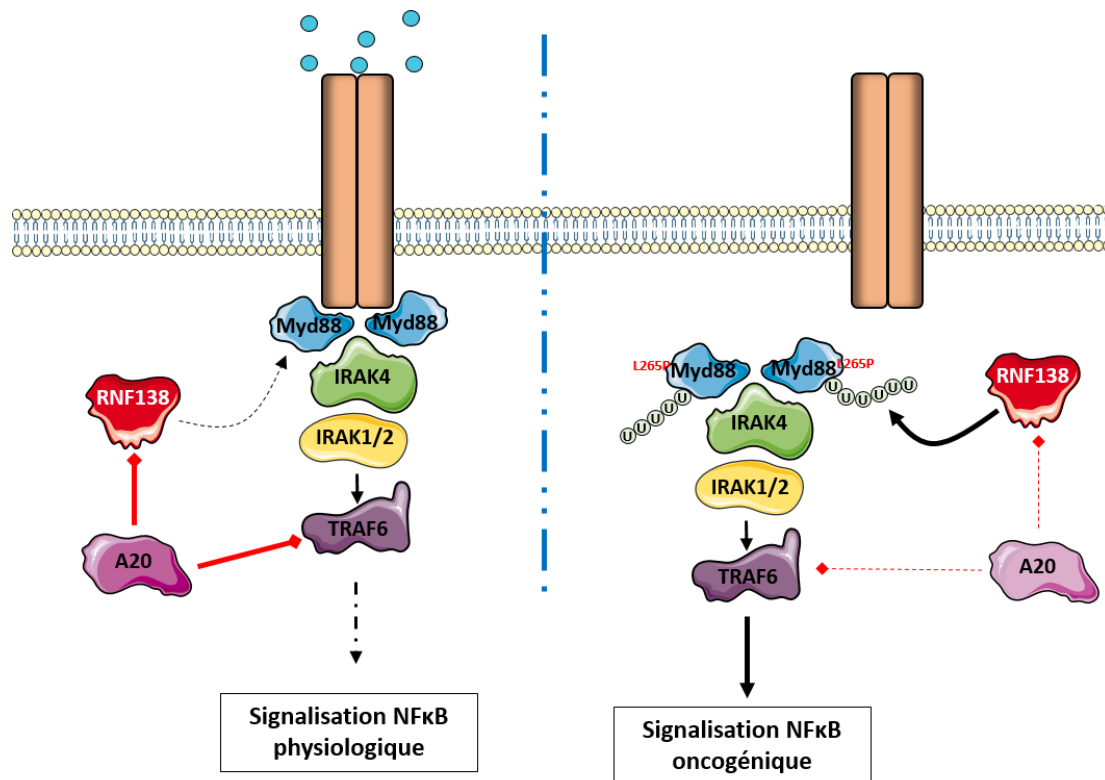


**Figure 31 : Structure de la protéine A20**

A20 est constituée d'un domaine OTU dans sa partie N-terminale qui porte l'activité déubiquitineuse. Le domaine ZF4 quant à lui permet l'activité ubiquitine ligase de la protéine.

L'objectif de ce rétro-contrôle est d'empêcher un emballement de la voie NFκB (Wu et al., 2020).

Dans le cas de la MW nous avons ci-dessus montré le rôle de RNF138 et son effet sur la protéine mutée *MYD88<sup>L265P</sup>*. Il se trouve que A20 exerce son activité ubiquitine ligase notamment en ciblant le site K48 de RNF138, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome. Il apparaît donc que la *Del 6q* est complémentaire à ce mécanisme puisque la perte de A20 lève l'inhibition de RNF138 et renforce la signalisation constitutive NFκB induite par *MYD88<sup>L265P</sup>* (Yu et al., 2021) (**Figure 32**).



**Figure 32 : Rôle de A20 et conséquence de sa perte dans la MW**

A20 exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie NFκB en inhibant RNF138 et TRAF6. L'activité de A20 est perdue dans 50% des cas de MW, ce qui a pour conséquence d'éteindre ce rétrocontrôle négatif de NFκB, en plus de favoriser l'effet activateur de RNF138 sur *MYD88<sup>L265P</sup>*. Adapté d'après X. Yu *et al.* Blood 2021.

### **b. Mutation S338X de CXCR4**

Comme évoqué dans le chapitre I, le récepteur couplé aux protéines G, CXCR4, est exprimé par les LB au cours de leur développement mais également par les plasmocytes afin qu'ils puissent retourner se nicher dans la moelle osseuse.

Dans la MW, la mutation S338X de CXCR4 est retrouvée dans 27% des cas (Krzisch et al., 2021). Cette mutation est surtout connue pour être responsable d'une pathologie appelée le syndrome WHIM, qui provoque une immunodéficience chez le patient.

La mutation de CXCR4 impacte la région C-terminale de la protéine mais n'impacte pas sa capacité à induire une réponse en cas de fixation de son ligand CXCL12. Ainsi, lorsque le récepteur est stimulé il est normalement internalisé : c'est un système de régulation qui permet de contrôler le niveau de réponse à CXCL12. Cependant lorsque CXCR4 est muté, il va perdre cette capacité à être internalisé, on parle de désensibilisation du récepteur. Le récepteur désensibilisé ne va plus subir de régulation et va être continuellement stimuable (Balabanian et al., 2005). Cette mutation favoriserait l'émergence clonale dans la moelle. A noter de plus que les patients portant la double mutation MYD88<sup>L265P</sup> / CXCR4<sup>S338X</sup> présentent une pathologie plus prononcée.

### **c. La trisomie 4 (Tri 4)**

C. Terré *et al.* montre que la trisomie du chromosome 4 est présente chez 18% des patients atteints de MW (Terré et al., 2006). Cet évènement pourrait être une des caractéristiques secondaires majeures qui permet le développement tumoral de la MW, puisque des oncogènes se trouvent sur ce chromosome et se retrouvent donc surexprimés. C'est le cas par exemple du facteur *c-KIT* (Terré et al., 2006). C-KIT est un récepteur de surface membranaire (aussi appelé CD117) qui lie la cytokine SCF (« Stem Cell Factor»). Une fois activé, C-KIT engage une signalisation qui conduira à l'activation des voies MAPK et PI3K/Akt ; favorisant ainsi la survie et la prolifération cellulaire (Z.-C. Feng et al., 2015).

### **d. Altérations de p53**

P53 est une protéine connue comme étant le gardien de l'intégrité cellulaire. Sans rentrer dans le détail, p53 est le premier rempart contre le développement tumoral puisque cette protéine va normalement être exprimée chez les cellules présentant une anomalie de réplication et/ou de prolifération, typiquement les cellules en cours de transformation tumorale. Lorsqu'il est actif, p53 va inhiber le cycle cellulaire, activer les systèmes de réparation de l'ADN et en dernier recours induire l'apoptose (Marei et al., 2021). Dans de nombreuses pathologies cancéreuses qui ne se limitent pas aux lymphomes, les inactivations de p53 qu'elles soient dues à des mutations, des pertes d'hétérozygoties ou des délétions complètes sont très courantes et constituent un moteur important du développement tumoral.

Dans le cas de la MW, des altérations de l'expression de p53 sont retrouvées dans environ 10% des cas. Parmi ces altérations on retrouve (i) des mutations qui touchent principalement les exons 5 à 8 (domaine de liaison à l'ADN) ; (ii) la délétion du bras court du chromosome 17p, qui contient le gène exprimant p53 (Poulain et al., 2017).

## **E. Hypothèses concernant la cellule d'origine**

Comme pour chaque lymphome et même chaque cancer au sens large, la connaissance de la cellule donnant naissance à la maladie est un point capital qui permet la compréhension et la prévention des mécanismes mis en jeu. Devant la grande hétérogénéité de cellules se développant dans les cas de MW, l'identification claire de la cellule B d'origine est complexe et encore controversée. Nous allons ici citer les principales hypothèses avancées bien qu'à l'heure actuelle aucune ne soit validée par l'ensemble de la communauté scientifique.

### **1. Précurseur lymphocytaire B**

De façon moins conventionnelle, une des hypothèses avancées pour expliquer l'origine de la MW serait que la cellule d'origine soit en réalité très précoce dans les stades de développement B. Dans une cohorte de 10 patients atteints de MW, la mutation phare de la maladie, la mutation *L265P* de *MYD88*, est retrouvée très précocement au niveau des précurseurs lymphocytaires B CD34+ (Rodríguez et al., 2020). Toutefois plusieurs dizaines de mutations sont retrouvées dans les cellules tumorales alors qu'elles sont absentes des précurseurs. Il semblerait donc que la mutation de *MYD88* soit un évènement précoce prédisposant fortement les progéniteurs B à dériver vers la MW, mais que la survenue de mutations secondaires plus tardives soit nécessaire à l'émergence du clone tumoral.

### **2. Lymphocyte B mémoire**

L'hypothèse la plus probable concernant l'origine du clone provoquant la MW serait celle d'un LB mémoire. Au cours du développement B, les cellules de la MW pourraient être apparentées à des LB post-CG qui entament leur différenciation en plasmocytes. Une étude du niveau de méthylation du génome démontre d'ailleurs l'existence de deux sous-groupes de MW ayant des similitudes épigénétiques soit avec le stade plasmocyte, soit avec le stade LB mémoire (Roos-Weil et al., 2020).

Comme expliqué ci-dessus les LB de la MW présentent un phénotype correspondant à la différenciation lymphoplasmocytaire associée à l'expression du CD27, et il se trouve qu'un sous-groupe de LB mémoires similaires a été découvert (Sahota et al., 2009). De plus, un groupe non conventionnel de LB mémoires CD22+ CD25+ montrent de nombreuses similarités avec les cellules de la MW, telles que la surexpression des voies NFκB, JAK/STAT, PI3K/AKT, ITPK1 et PDPK1 (Paiva et al., 2015).

Cependant comme évoqué plus haut, le développement B est un processus bien moins ordonné que ce qui était envisagé, et nous savons à présent d'une part que les phénomènes comme la SHM et la CSR ne sont pas restreint au CG ; et d'autre part que les LB mémoires peuvent provenir aussi bien du CG que de la zone marginale. L'origine des LB de la MW reste donc une question grandement controversée.

### **3. Lymphocyte B de la zone marginale**

Nous avons pu voir que lors du développement B, si le pool de LB mémoire était en grande partie constitué de cellules passant par le CG, il était également possible que des LB de la zone marginale puissent se différencier en LB mémoire sans passer par le CG. Cette

hypothèse n'est donc pas incompatible avec la précédente et au contraire. Il serait avancé que la MW trouverait son origine d'un LB mémoire issu spécifiquement de la zone marginale. A noter que contrairement à ce qui était reconnu pendant longtemps, les LB MZ sont capables de subir la SHM et ce notamment grâce à l'activation de la voie NFκB. Enfin, ils expriment majoritairement de l'IgM. Autant de similitudes avec les cellules de la MW qui ont ainsi conduit à cette hypothèse (Ettinger et al., 2007).

#### **4. Lymphocyte B1**

De la même manière, une autre hypothèse propose que la cellule d'origine de la MW soit un lymphocyte B1. Les lymphocytes B1 sont très bien caractérisés chez la souris mais leur présence en quantité significative reste toutefois controversée chez l'homme. Les lymphocytes B1 sont une catégorie de LB à part, plus proches de l'immunité innée qu'adaptative ils sont connus comme étant des cellules sécrétant de grandes quantités d'IgM et ayant la capacité de se différencier en plasmocytes sans passer par le centre germinatif. Il semblerait également que les lymphocytes B1 puissent se différencier en LB mémoires, rendant donc intéressante l'idée que ces LB mémoires issus de la population des lymphocytes B1 puisse être à l'origine de la MW (Janz, 2013).

#### **F. Thérapies et maladie de Waldenström**

##### **1. Décomposition de l'arsenal thérapeutique**

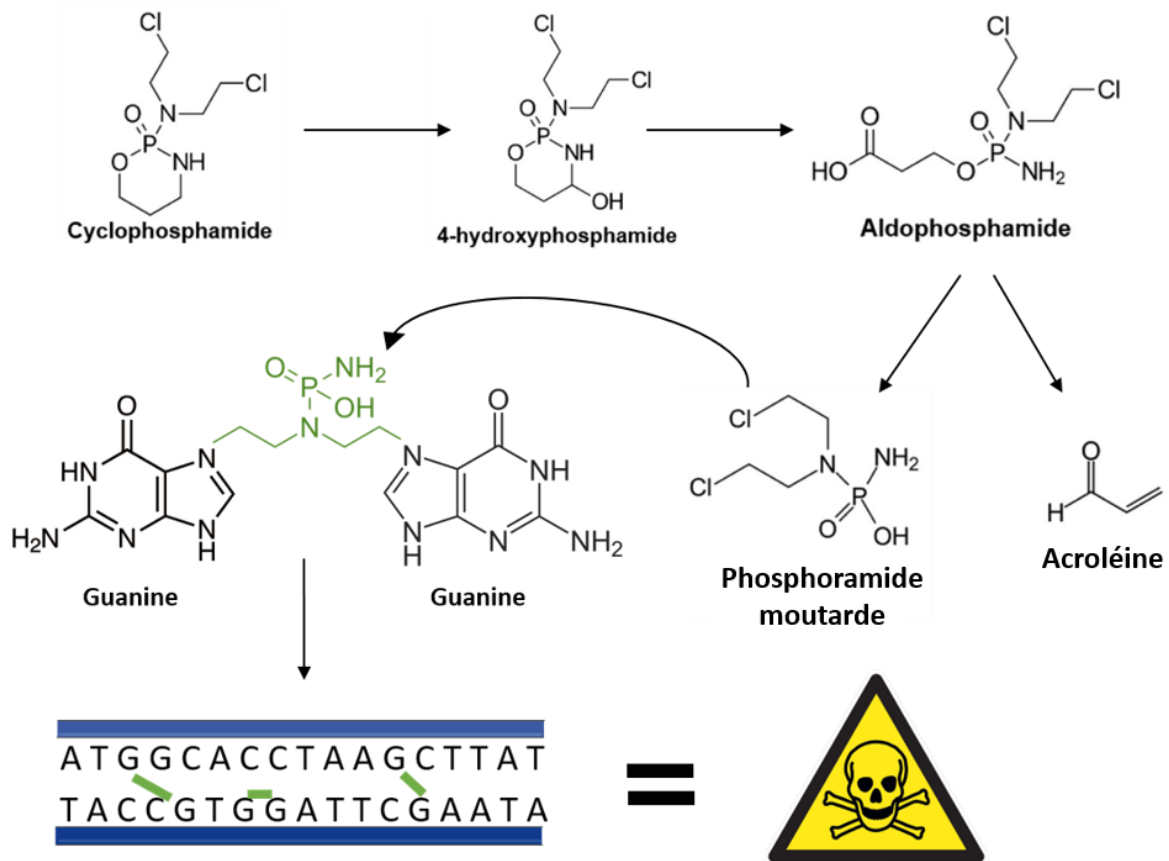
###### **a. Les chimiothérapies**

Comme pour tout cancer, le traitement de la MW repose avant tout sur un traitement par chimiothérapie. Les agents utilisés peuvent être la Fludarabine, la Bendamustine, la Cyclophosphamide ou encore le Chlorambucile. Ces molécules font partie de la famille des agents alkyants, car elles ont la propriété de se lier aux bases Adénine, Cytosine et Guanine de l'ADN et ainsi de créer des ponts entre ces différentes bases, qu'elles soient sur le même brin d'ADN ou non. Le cyclophosphamide par exemple, comme schématisé sur la Figure 33, est décomposé en 4-hydroxyphosphamide puis en aldophosphamide, lui-même donnant de l'acroleïne et du phosphoramidate moutarde qui est la molécule active de cette cascade. Le phosphoramidate moutarde va former un pont entre deux résidus Guanine. Ces modifications importantes de l'ADN vont compromettre son intégrité, conduisant à des cassures simples ou doubles brins, des mutations ; en somme des lésions irréparables qui vont conduire à la mort des cellules tumorales (Fonseca et al., 2018) (**Figure 33**).

###### **b. Les immunothérapies (Rituximab)**

La principale thérapie ciblée utilisée dans le traitement des lymphomes B se nomme le Rituximab®. Le Rituximab® est un anticorps thérapeutique capable de fixer le marqueur CD20, spécifique des lymphocytes B.

Cet anticorps va entraîner la mort des cellules B de manière directe, car la stimulation du CD20 va inhiber les voies de signalisation PI3K/Akt, NFκB, et celles des MAPK passant par p38 et ERK1/2 (Jazirehi et al., 2004, 2005; Pedersen et al., 2002; Suzuki et al., 2016). Le Rituximab® apporte également un effet anti-tumoral indirect, puisque le fragment Fc de



**Figure 33 : Mode d'action des agents alkylants, exemple du cyclophosphamide**

Le cyclophosphamide est dégradé en 4-hydroxyphosphamide puis en Aldophosphamide, qui donnera lui-même de l'acroléine et du phosphoramidate moutarde. Ce dernier est une molécule active au niveau de l'ADN qui va avoir la capacité de former un pont entre deux résidus guanine. Ces liaisons pas toujours réparables de l'ADN conduisent à la mort des cellules.

l'anticorps thérapeutique va activer la Toxicité Cellulaire Induite par l'Anticorps (ADCC) et la Cytotoxicité Dépendante du Complément (CDC). Ces deux mécanismes vont induire la mort des cellules tumorales en recrutant des cellules de l'immunité innée à action cytotoxique (cellules NK par exemple) et également en activant la mort cellulaire via la cascade du complément.

### c. Les inhibiteurs thérapeutiques

#### i. Ibrutinib

L'Ibrutinib® est un inhibiteur covalent de l'enzyme « Bruton Tyrosine Kinase » (BTK). L'inhibiteur se lie de façon covalente à la cystéine 481 de BTK, au niveau du site actif de l'enzyme. BTK étant nécessaire à la transduction des signaux de prolifération et de survie induits par le BCR, son inhibition conduit alors à la mort des lymphocytes B.

Cette molécule est particulièrement efficace et utilisée dans le traitement des lymphomes B. Elle fait plus exactement partie de la première génération des inhibiteurs de BTK. Bien que des molécules de seconde génération telles que l'Acalubrutinib® ou le Zanubrutinib® existent, c'est principalement l'Ibrutinib® qui est utilisé en routine.

## ii. Bortezomib

Dans la cellule le rôle du protéasome est de dégrader et recycler les protéines non nécessaires au fonctionnement cellulaire. Une trop grande quantité de protéines stockées dans le cytoplasme provoque chez les cellules un stress pouvant aller jusqu'à entraîner la mort. L'activité du protéasome est donc nécessaire et permet de réduire ce stress cellulaire.

Des cellules telles que les plasmocytes produisent énormément de protéines, notamment des anticorps, et en stockent une partie dans leur cytoplasme en attendant de pouvoir les sécréter. Dans ces cellules, le stress est important et l'activité du protéasome est nécessaire à leur survie. Le Bortezomib® est un inhibiteur des fonctions du protéasome, et par ce biais il provoque la mort des cellules. La MW étant issue d'un clone lymphoplasmocytaire, cette molécule est particulièrement indiquée.

## 2. Traitements de première ligne

Avant toute chose, si le patient présente une hyperviscosité sérique il est conseillé de pratiquer une plasmaphérèse avant ou même pendant le traitement, car il est connu que dans 30 à 80% des cas l'administration de Rituximab® entraîne en premier lieu une augmentation de la concentration en IgM sérique (on parle d' « IgM flare »), ce qui ne peut qu'aggraver les symptômes provoqués par l'hyperviscosité (Ghobrial et al., 2004).

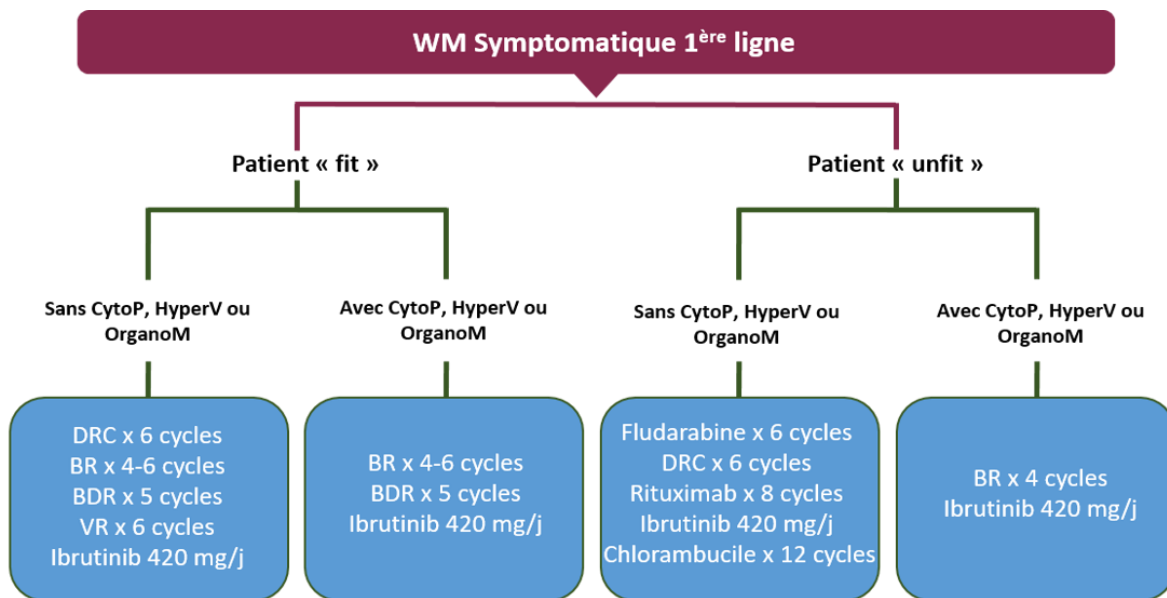
Selon l'état du patient et les symptômes qu'il présente, quatre orientations sont données avec chacune plusieurs possibilités de combinaisons thérapeutiques (**Figure 34**) :

- **Patient en état correct « fit » sans cytopénie, hyperviscosité ou organomégalie :** Ces patients pourront recevoir soit de l'Ibrutinib® en monothérapie, soit du Rituximab® associée à une chimiothérapie : bendamustine ou cyclophosphamide ; ou bien associé au Bortezomib®. La Dexaméthasone est un glucocorticoïde de synthèse à effet anti-inflammatoire éventuellement donné au patient afin de limiter les effets indésirables de la chimiothérapie.
- **Patient en état correct « fit » avec cytopénie, hyperviscosité ou organomégalie :** Dans ce cas les choix de traitements sont fortement réduits, le patient recevra au choix (i) de l'Ibrutinib® en monothérapie, (ii) du Rituximab® associé à la Bendamustine ou (iii) une association de Rituximab® et de Bortezomib®.
- **Patient en état détérioré « unfit » sans cytopénie, hyperviscosité ou organomégalie :** Ces patients plus fragiles recevront préférentiellement des monothérapies, soit de chimiothérapies (Fludarabine® ou Chlorambucile®) ; soit de molécules ciblées (Rituximab® ou Ibrutinib®). Une association de Rituximab® + Bortezomib® peut toutefois être administrée.
- **Patient en état détérioré « unfit » avec cytopénie, hyperviscosité ou organomégalie :** Enfin, pour les cas de patients les plus gravement atteints par la

maladie le choix de traitement se limite soit à de l'ibrutinib® en monothérapie, soit à une association de Rituximab® + Bendamustine® en dose réduite.

En quelques mots, la survie sans progression (« Progression-Free Survival », PFS) donne un indice très intéressant de l'efficacité du traitement. Comme son nom l'indique, ce facteur indique le nombre/pourcentage de patients dont la pathologie n'a pas évolué pendant une durée de traitement donnée. Ces chiffres sont obtenus grâce à des études cliniques rétrospectives de plus ou moins grande ampleur. En ce qui nous concerne les valeurs suivantes sont obtenues : (i) PFS à 4 ans = 85% pour BR (Bendamustine + Rituximab®) ; (ii) PFS à 4 ans = 75% pour l'ibrutinib® ; (iii) PFS à 4ans = 50% pour BDR (Bortezomib®+Dexaméthasone+Rituximab®) ; (iv) PFS = 40% pour DRC (Dexaméthasone + Rituximab® + Cyclophosphamide) (Castillo et al., 2022; Dimopoulos et al., 2013; Gavriatopoulou et al., 2017; Paludo et al., 2018).

Actuellement, un essai clinique est en cours pour tester l'efficacité de l'association Venetoclax® (inhibiteur de BCL2) avec le Rituximab®.



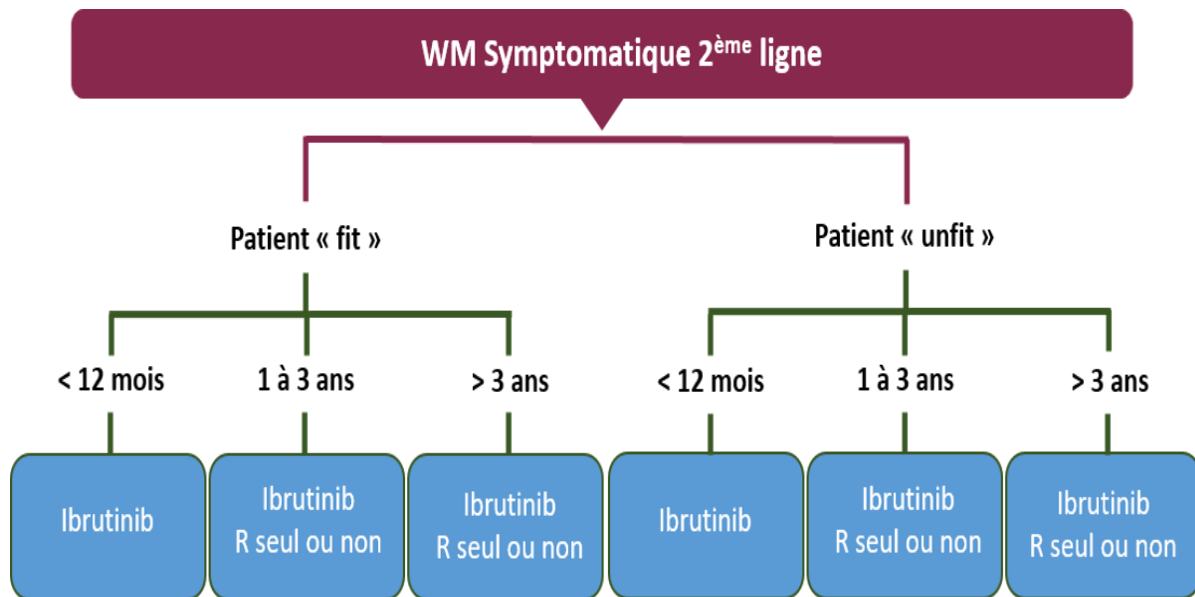
**Figure 34 : Arbre décisionnel des traitements de 1ère ligne de la MW**

Le choix du traitement en 1ère ligne va dépendre de l'état du patient (« fit », en bon état général ; « unfit », mauvais état général). De plus, le choix va dépendre des symptômes que présentent les patients. CytoP : cytopénie ; HyperV : syndrome d'hyperviscosité ; OrganoM : organomégalie. DRC : Rituximab®-cyclophosphamide-dexaméthasone ; BR : bendamustine-Rituximab® ; BDR : Bortezomib®-dexaméthasone-Rituximab® ; VR : Bortezomib®-Rituximab®. Adapté d'après E. Kastritis *et al.* ESMO 2018.

### 3. Traitements de seconde ligne

Lorsque les patients deviennent réfractaires au traitement ou qu'ils rechutent avec un certain laps de temps, une ligne secondaire de traitements est mise en place. Le choix du traitement proposé est malheureusement beaucoup plus simple dans ce cas car limité (**Figure 35**).

Quel que soit l'état du patient, si celui-ci rechute moins d'un an après la première ligne de traitement, l'Ibrutinib® sera privilégié. Pour les patients qui rechutent entre un et trois ans après la thérapie initiale, ils recevront soit de l'Ibrutinib® soit du Rituximab® seul ou combiné avec une autre molécule (différente de celle du traitement de première ligne). Enfin pour les patients rechutant plus de trois ans après le traitement de départ, l'Ibrutinib® peut être conseillé tout comme une thérapie à base de Rituximab® (qui cette fois-ci peut être la même que celle utilisée en première ligne). En somme, pour les traitements de seconde ligne l'Ibrutinib® est préconisé, excepté pour les patients inéligibles qui ont déjà reçu de l'Ibrutinib® en première ligne ou qui possèdent des facteurs de résistance (mutation de CXCR4 par exemple) (Kastritis et al., 2018).



**Figure 35 : Arbre décisionnel des traitements de 2nd ligne de la MW**

En seconde ligne de traitement 3 cas de figures s'imposent : (i) le patient à rechuté moins de 12 mois après la fin de la 1<sup>ère</sup> ligne de traitements : Ibrutinib® ; (ii) le patient à rechuté entre 1 et 3 ans après les premiers traitements : Ibrutinib® ou Rituximab® seul ou associé à une autre molécule (on ne donne pas le même traitement qu'en 1<sup>ère</sup> ligne) ; (iii) en cas de rechute plus de 3 ans après les premiers traitements : Ibrutinib® ou Rituximab® seul ou combiné. Adapté d'après E. Kastritis *et al.* ESMO 2018.

### **G. Transformation de la MW en lymphome agressif**

Lors du développement de certains lymphomes indolents, il est connu que des mécanismes de transformation puissent survenir. Au cours de cette transformation le lymphome indolent va subir des modifications génétiques et phénotypiques conduisant à la formation d'un lymphome agressif. C'est notamment le cas de la leucémie lymphoïde chronique, au cours de laquelle ce processus (appelé transformation de Richter) conduit au développement d'un lymphome agressif de type DLBCL (Douglas, 2022).

Pour ce qui est de la MW, le suivi des patients sur le long terme a permis de démontrer que même si elle était rare, une transformation en lymphome agressif type DLBCL était possible. Sur une cohorte de 1466 patients, J. Castillo *et al.* montre que le phénomène de transformation



est survenu dans 1,36% des cas (Castillo et al., 2016). Qui plus est, le travail mené par GW. Wright *et al.* pousse les auteurs à émettre l'hypothèse que le cluster de DLBCL MCD (issu de l'ex sous-type ABC-DLBCL) pourrait en fait correspondre à des cas de MW transformés en lymphomes agressifs (Wright et al., 2020).

Cependant, si la transformation de la MW en lymphome agressif est un phénomène réel puisqu'on l'identifie chez plusieurs patients ; nous ne pouvons à l'heure actuelle pas avancer de relation génétique entre la MW et la forme transformée proche du DLBCL. L'origine de la transformation et les mécanismes impliqués sont également toujours méconnus, il reste en somme encore beaucoup de points à éclaircir concernant la transformation de la MW.

## Chapitre IV. Le micro-environnement immun tumoral des lymphomes B

### A. Les acteurs principaux du micro-environnement tumoral immun

#### 1. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) sont les cellules effectrices de la réponse immune adaptative par excellence. Elles expriment un récepteur de surface appelé TCR (« T Cell Receptor ») qui peut être de deux types : TCR  $\alpha\beta$  ou bien TCR  $\gamma\delta$ . Ici nous traiterons uniquement des LT exprimant le TCR  $\alpha\beta$ .

L'expression du TCR à la surface des LT est nécessaire à leur fonctionnement, puisque c'est grâce à ce récepteur que les LT vont être capables de reconnaître l'antigène exogène ou tumoral. Cependant, les LT ne sont pas capables de reconnaître l'antigène sous sa forme native. Pour être reconnu ce dernier devra nécessairement être exprimé à la surface d'une CPA via le CMH de classe I ou II.

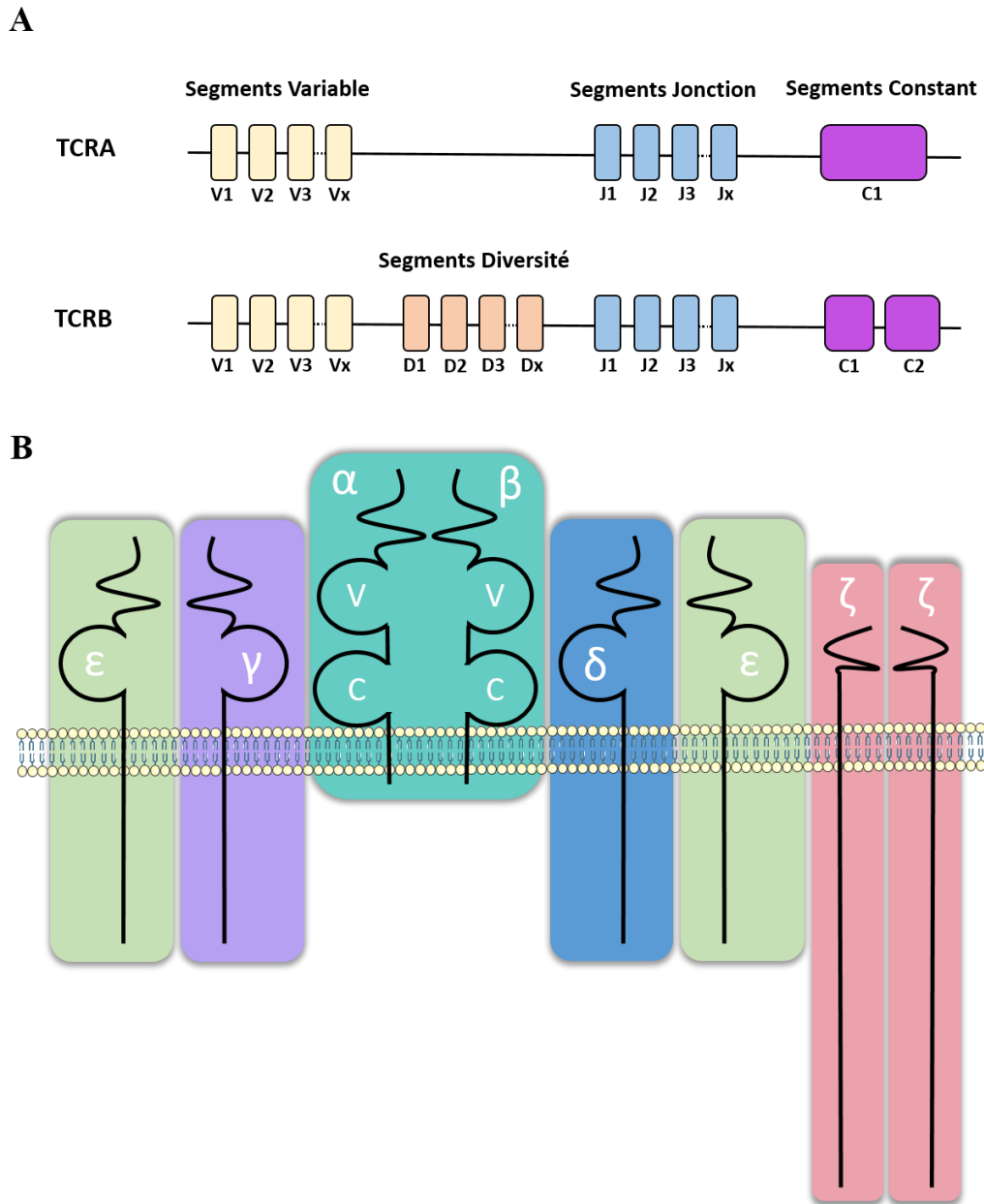
Les LT  $\alpha\beta$  sont subdivisés en deux groupes : les LT exprimant le CD4 (LT CD4<sup>+</sup>) et les LT exprimant le CD8 (LT CD8<sup>+</sup>). Ces deux groupes possèdent un rôle différent dans la réponse immune, qui sera précisé ci-après.

##### a. La structure du TCR

Comme pour les LB, la maturation des LT est étroitement liée à la production d'un récepteur fonctionnel. Afin de bien comprendre les étapes de différenciation des LT, il est donc nécessaire de traiter en détail le processus de formation du TCR par les LT.

Le TCR  $\alpha\beta$  est composé de deux chaînes : une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$ . Chaque chaîne est constituée d'un domaine variable (V) et d'un domaine constant (C) extracellulaires. Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont liées par un pont disulfure qui unit les domaines C à proximité de la membrane plasmique. En ce qui concerne les domaines variables, ils vont subir un réarrangement génétique qui sera synonyme de maturation pour le TCR.

Les gènes codant les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont localisés respectivement en *14q11.2 (TCRA)* et *7q34 (TCRB)* chez l'homme. Le locus  $\alpha$  contient environ 70 segments V et 61 segments J ; le locus  $\beta$  possède quant à lui 52 segments V, 2 segments D et 13 segments J (Jr et al., 2001) (**Figure 36A**). Le réarrangement de ces segments, appelé recombinaison V(D)J, fait intervenir les mêmes acteurs que ceux lors de la maturation B. Ainsi, les enzymes RAG1 et RAG2 vont reconnaître des séquences spécifiques de part et d'autre des segments à recombinaison, cliver l'ADN entre les segments et ainsi entraîner la prise en charge des extrémités clivées par les systèmes de réparation de l'ADN (Ru et al., 2015). La chaîne  $\beta$  va être recombinaison la première. Les segments D et J vont d'abord être recombinaison, puis le réarrangement V-DJ aura lieu (De Simone et al., 2018). Cependant, malgré le réarrangement des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , le TCR ne sera pas fonctionnel. En effet afin de produire une signalisation efficace, l'hétérodimère  $\alpha\beta$  doit être relié à un complexe hétéroprotéique : le complexe CD3. Le complexe CD3 est composé de 3 chaînes : (i) une chaîne hétérodimérique  $\epsilon\delta$ , (ii) une chaîne hétérodimérique  $\epsilon\gamma$ , (iii) une chaîne homodimérique  $\xi\xi$  (Dong et al., 2019) (**Figure 36B**).



**Figure 36 : Structure du TCR et représentation des locus codant les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$**

**A** : Le locus TCRA contient 70 segments V, 61 segments J et 1 segment constant ; il ne contient pas de segment D. Le locus TCRB contient 52 segments V, 2 segments D, 13 segments J et 2 segments constants. **B** : Le TCR est composé des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  associées au complexe CD3 composé d'une chaîne  $\epsilon\gamma$ , d'une chaîne  $\epsilon\delta$  et d'une chaîne  $\zeta\zeta$ . Adapté d'après *cours-pharmacie.com*.

Si c'est bien le TCR  $\alpha\beta$  qui reconnaît l'antigène via le CMH I ou II, la transmission de l'information intracytosolique sera rendue possible par le complexe CD3 (Mariuzza et al., 2020). La signalisation du complexe TCR $\alpha\beta$ /CD3 $\xi\xi$  sera détaillée ci-après.

## **b. Le développement des lymphocytes T**

### **i. Développement précoce et production du TCR**

A l'instar des LB, les LT sont issus d'un précurseur lymphoïde commun (PLC) provenant de la moelle osseuse. Ce précurseur va voyager par voie sanguine jusqu'au thymus, qui est l'organe de maturation des LT. Les PLC sont d'abord attirés au niveau du thymus grâce aux cellules endothéliales thymiques qui expriment une protéine d'adhésion, la P-Selectin (Rossi et al., 2005) ; puis ils sont retenus dans le cortex thymique par les cellules corticales thymiques (TEC) via la sécrétion d'un cocktail de chemokines (CCL21, CCL25 et CXCL12) (Calderón & Boehm, 2011).

Une fois arrivé dans le cortex thymique, on ne parlera plus de PLC mais de précurseur T double négatif (DN) car il n'exprime pour l'instant ni le CD4 ni le CD8. Le précurseur T va alors passer par 4 stades de différenciation distingués par ses niveaux d'expression des marqueurs CD44 et CD25 : (i) stade DN1 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) ; (ii) stade DN2 (CD44<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) ; (iii) stade DN3 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) ; (iv) stade DN4 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) (D. I. Godfrey et al., 1993).

A partir du stade DN3, le précurseur T va commencer à exprimer son TCR. Il va dans un premier temps exprimer la chaîne  $\alpha$  non réarrangée (pré-TCR $\alpha$ ), puis il va subir le réarrangement de sa chaîne TCR $\beta$  ; les deux chaînes formeront le pré-TCR $\alpha\beta$ .

Le pré-TCR $\alpha\beta$  va se lier au complexe CD3, l'association des deux conduira à une signalisation active ; ainsi à partir de cet instant la survie du précurseur T sera conditionnée par l'état de sa signalisation pré-TCR $\alpha\beta$ /CD3 $\xi\xi$  (van Oers et al., 1995). Ce phénomène est appelé la sélection  $\beta$  : seules les cellules ayant achevé avec succès le réarrangement de leur chaîne TCR $\beta$  pourront exprimer à leur surface un pré-TCR $\alpha\beta$  fonctionnel et ainsi induire une signalisation de survie, les autres en revanche sont condamnées à l'apoptose (Tikhonova et al., 2019).

Au stade DN4, les cellules vont subir le réarrangement VJ de la chaîne TCR $\alpha$ . Le pré-TCR $\alpha\beta$  laisse place à un TCR $\alpha\beta$  mature qui va s'assembler avec le CD3 $\xi\xi$  et initier un début de signalisation, conduisant à l'expression du CD8 en premier puis du CD4 à la suite. Les thymocytes exprimant à présent les deux marqueurs sont dits Doubles Positifs (DP) (Robey & Fowlkes, 1994).

### **ii. La sélection des thymocytes DP**

Les cellules DP vont à présent subir une sélection induite par les cellules corticales thymiques qui expriment une variété d'antigènes à la surface du CMH-I et II. Ces antigènes sont généralement des antigènes du soi, aussi il existe trois cas de figure. L'immense majorité des DP ne reconnaissent pas l'Ag, ils seront conduits à l'apoptose (on parle de mort par négligence). A l'inverse, certaines cellules DP vont avoir une affinité trop importante pour l'Ag, ils seront également éliminés par sélection négative pour éviter de générer des clones auto-réactifs. Enfin, seulement une petite partie des cellules DP reconnaîtront l'Ag de façon modérée, produisant ainsi le signal adéquat à leur survie et leur progression, il s'agit dans ce cas d'une sélection positive (von Boehmer et al., 1989).

### iii. La restriction CD4/CD8

Les cellules T DP n'existent que de façon transitoire au cours du développement T dans le thymus. Les prochaines étapes de maturation vont consister pour les cellules DP à abandonner un des deux marqueurs CD4 ou CD8 afin de devenir des cellules simples positives (SP) CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>. Comme nous venons de le voir, c'est la qualité du signal TCRαβ/CD3ξξ qui va conditionner la survie des cellules DP. Mais le paramètre quantitatif joue également un rôle important dans le devenir des cellules DP puisque c'est la durée du signal TCRαβ/CD3ξξ qui va conditionner la différenciation en cellules SP CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>.

Il faut savoir que les marqueurs CD4 et CD8 sont bien plus que des marqueurs typiques de lignées cellulaires. Ce sont en réalité des co-récepteurs puissants qui vont potentialiser la signalisation du TCRαβ/CD3ξξ et permettre une bien meilleure signalisation intracellulaire pour un stimulus donné. Le CD4 va seulement reconnaître le CMH classe II alors que le CD8 ne reconnaîtra que le CMH classe I. Le modèle qui permet d'expliquer la différenciation en LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> est appelé « modèle de la force de signal ». Ce modèle se base sur le fait que le CD4 traduit le signal plus efficacement que le CD8 chez les cellules DP. Ainsi, à niveau de reconnaissance égale de l'antigène, la signalisation provoquée par le TCR-CD4 sera plus longue et forte que celle provoquée par le TCR-CD8. La signalisation soutenue du CD4 entraîne la production d'un clone CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, alors qu'un signal plus faible et bref émanant donnera naissance à un clone CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (Veillette et al., 1989) (**Figure 37**).

Une fois la décision CD4/CD8 prise, les LT CD4 et CD8 naïfs produits vont rejoindre les organes lymphoïdes secondaires via la circulation sanguine.

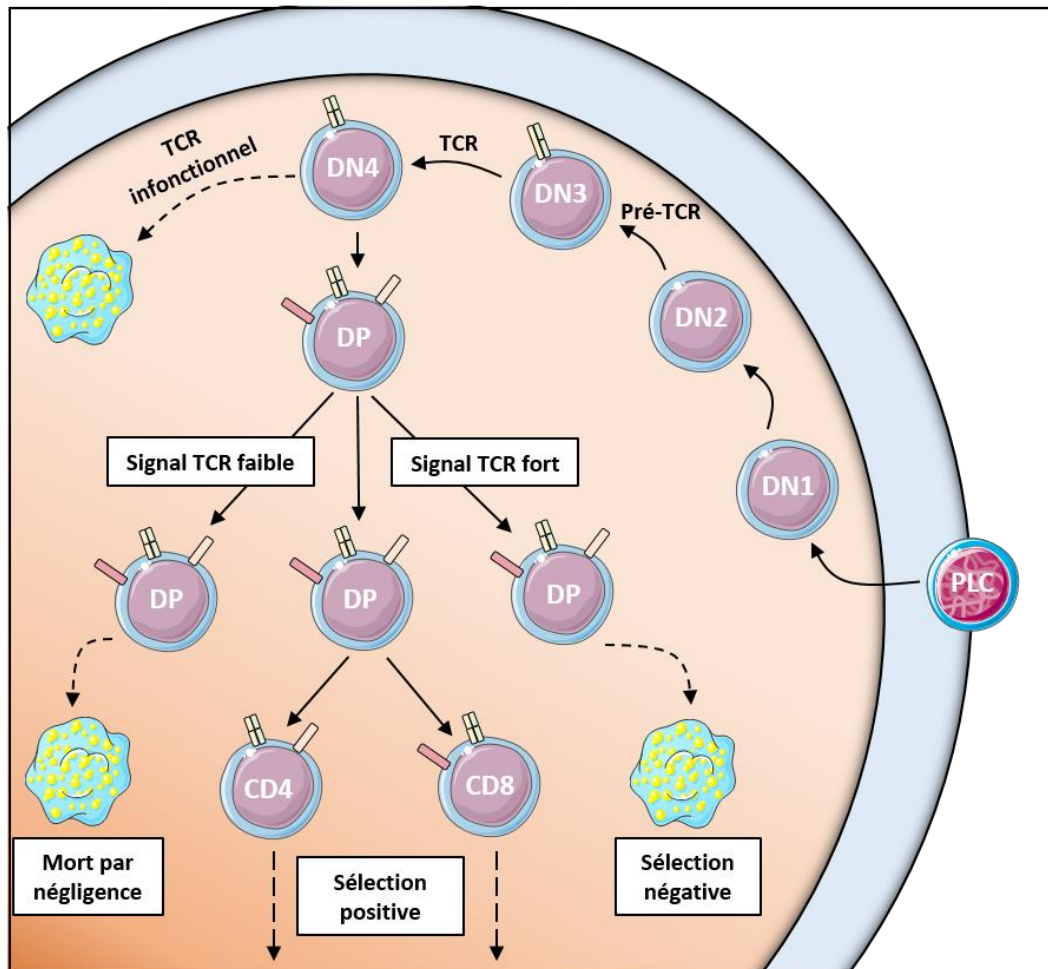
### c. L'activation des LT

#### i. Le signal primaire TCRαβ/CD3ξξ

Le TCR va reconnaître l'antigène lorsque celui-ci est présenté à la surface des complexes du CMH I ou II. Lorsque cela se produit, une synapse se forme entre le LT et la Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA). Cette synapse dite immunologique va induire le recrutement de plusieurs complexes TCRαβ/CD3ξξ afin de potentialiser la réponse intra-cytosolique du LT (Huppa & Davis, 2003).

Ce phénomène de clusterisation va également concentrer au niveau de la synapse immune les protéines CD4 ou CD8. Dès lors que le CD4/8 reconnaît le CMH-II/I, ce dernier va recruter au niveau de sa partie intra-cytosolique une protéine nommée « Lymphocyte-spécifique protéine tyrosine-kinase » (LCK). LCK étant concentrée en région intracytosolique sous la synapse immune, elle va pouvoir exercer son activité en phosphorylant les motifs ITAMs (« Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs ») présents au niveau des régions cytosoliques des sous-unités du complexe CD3, particulièrement au niveau des chaînes ξ (Love & Hayes, 2010). Cette modification a pour conséquence de permettre le recrutement d'une autre tyrosine kinase, ZAP70. LCK va activer par phosphorylation ZAP70, qui va elle-même pouvoir phosphoryler sa cible principale : la protéine transmembranaire LAT (« Linker for Activation of T-cells ») (Horejsí et al., 2004).

La protéine LAT phosphorylée va recruter de nombreux effecteurs, on retrouve notamment :

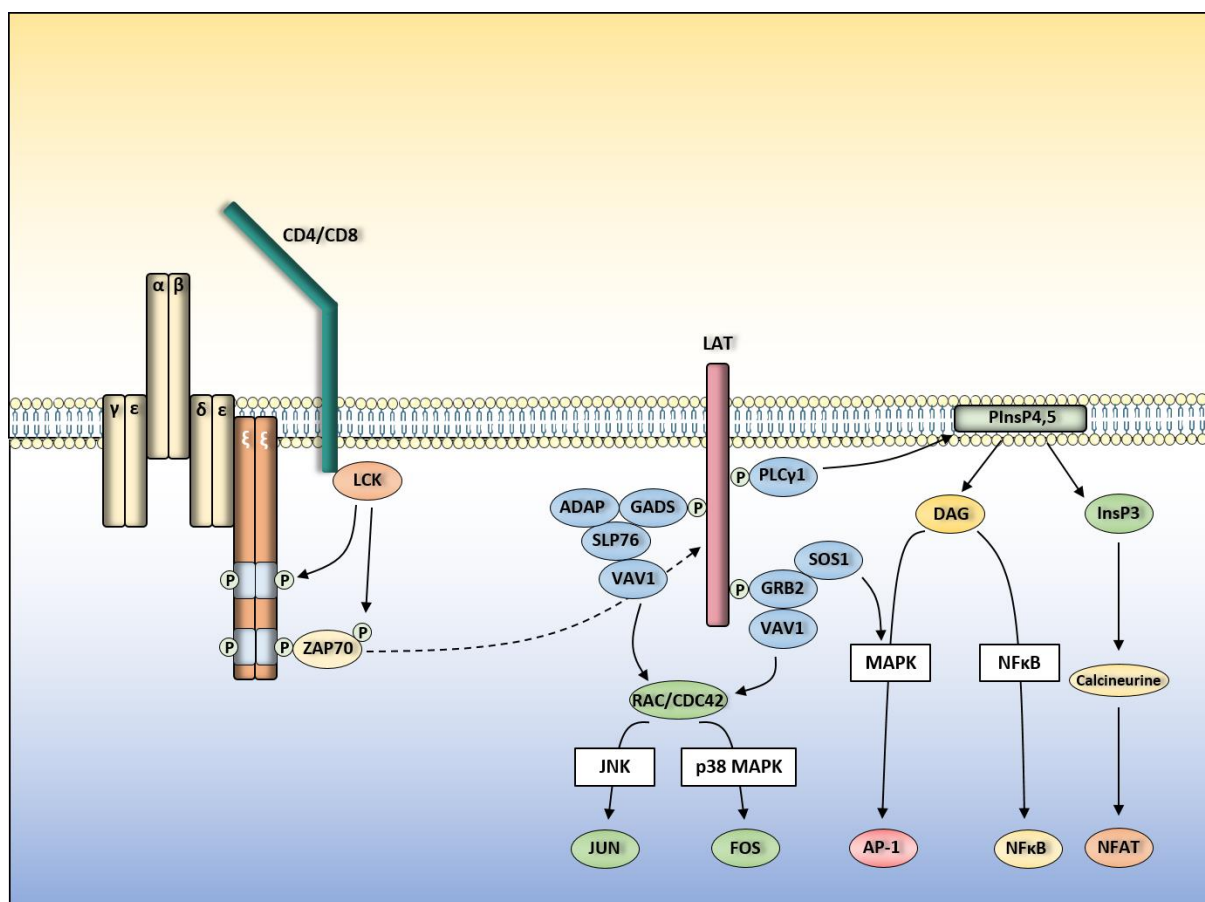


**Figure 37 : Les étapes principales du développement T**

Le progéniteur lymphoïde commun (PLC) pénètre dans le thymus, il va se différencier successivement en cellule double négative (DN) 1, DN2, DN3 qui exprimera le pré-TCR ; puis DN4 qui exprime le TCR. Les DN3 n'exprimant pas un TCR fonctionnel sont par ailleurs éliminées par apoptose. Le DN4 se différencie en cellule double positive (DP) qui ne se différenciera en CD4 ou en CD8 que sous condition que son signal TCR reconnaisse l'Ag de façon moyenne. Si le DP reconnaît trop bien ou trop peu l'Ag, il mourra soit par sélection négative soit par négligence.

- **La phospholipase  $Cy1$**  ( $PLC\gamma1$ ), qui catalyse la production de Diacylgcérol (DAG) et d'inositol-3-phosphate (InsP3) à partir de la phosphatidylinositol-4,5-biphosphate. Le DAG va d'une part activer la voie des MAPK et induire l'expression du facteur de transcription AP-1, et d'autre part activer la voie NF $\kappa$ B ; et l'InsP3 va induire le relarguage du calcium, activant la calcineurine qui permet l'activation du facteur de transcription NFAT.
- « **Growth factor Receptor Bound protein 2** » (GRB2), qui joue le rôle d'adaptateur et permet le recrutement de (i) « Son Of Sevenless homolog 1 » (SOS1), qui va activer lui aussi la voie des MAPK ; (ii) VAV1, qui active les voies JNK et p38 MAPK qui induisent respectivement l'activation des facteurs de transcription Jun et Fos. VAV1 induit également le remodelage du cytosquelette.

- **“GRB2-related adaptor downstream of Shc”** (GADS), qui recrute VAV1 via l'intermédiaire de ADAP et SLP76 ; VAV1 ayant les mêmes effets que ceux cités au point précédent (**Figure 38**).



**Figure 38 : Résumé de la signalisation du TCR**

Une fois le TCR stimulé, il recrute le CD4 qui va de son côté recruter la kinase LCK. LCK phosphoryle les chaînes  $\zeta$  du TCR, qui recrutent ZAP70. Cette dernière phosphoryle LAT, permettant l'induction de 3 signalisations majeures : (i) via la PLC $\gamma$ 1 il y a clivage du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIInsP4,5) en diacyglycérol (DAG) et inositol-3-phosphate (INSIP3). Le DAG active les voies MAPK et NF $\kappa$ B ; l'INSIP3 active le facteur de transcription NFAT. (ii) via GRB2 qui recrute SOS1 (activation de la voie MAPK) et VAV1 (activation des voies JNK et p38 MAPK). (iii) via GADS qui grâce aux protéines adaptatrices ADAP et SLP76 recrute VAV1, activant par lui les voies JNK et p38 MAPK.

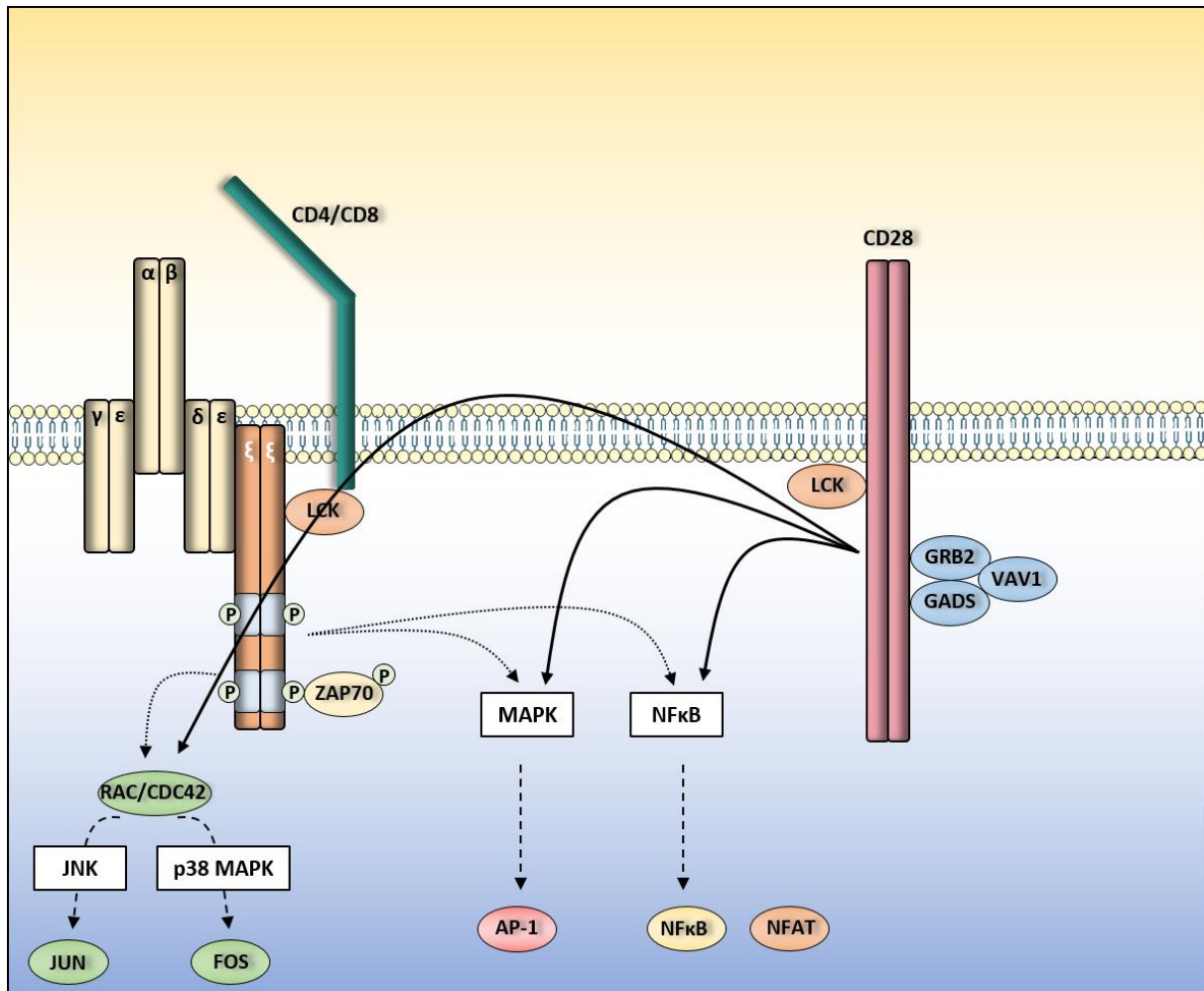
## ii. Le signal secondaire CD28

Le récepteur de surface CD28 est exprimé par les lymphocytes T. Ce récepteur va transmettre un signal dit co-activateur par rapport à la signalisation TCR $\alpha\beta$ /CD3 $\xi\xi$ . Lors de la formation de la synapse immune, le CD28 à la surface du LT va reconnaître ses ligands CD80 et CD86 qui sont eux exprimés à la surface des CPAs uniquement lorsqu'elles sont activées.

Le CD28 ainsi stimulé va pouvoir recruter dans sa partie cytoplasmique de nombreux effecteurs dont nous avons déjà parlé juste avant : LCK, GRB2, GADS ou encore VAV1. Une fois recrutés, ces effecteurs vont activer les mêmes voies de signalisation que peut le faire le

complexe TCR-CD3 ce qui va considérablement potentialiser la puissance de signalisation de ce dernier (Esensten et al., 2016) (**Figure 39**).

Sans ce signal de co-activation, la puissance des signaux envoyés par le complexe TCR $\alpha\beta$ /CD3 $\xi\xi$  ne sera pas suffisante pour activer pleinement les LT. Ce mécanisme permet la régulation de la réponse immune T, de sorte à ce qu'elle ne soit activée que lorsque cela est nécessaire et pas de façon excessive.



**Figure 39 : Signalisation du signal de co-activation CD28**

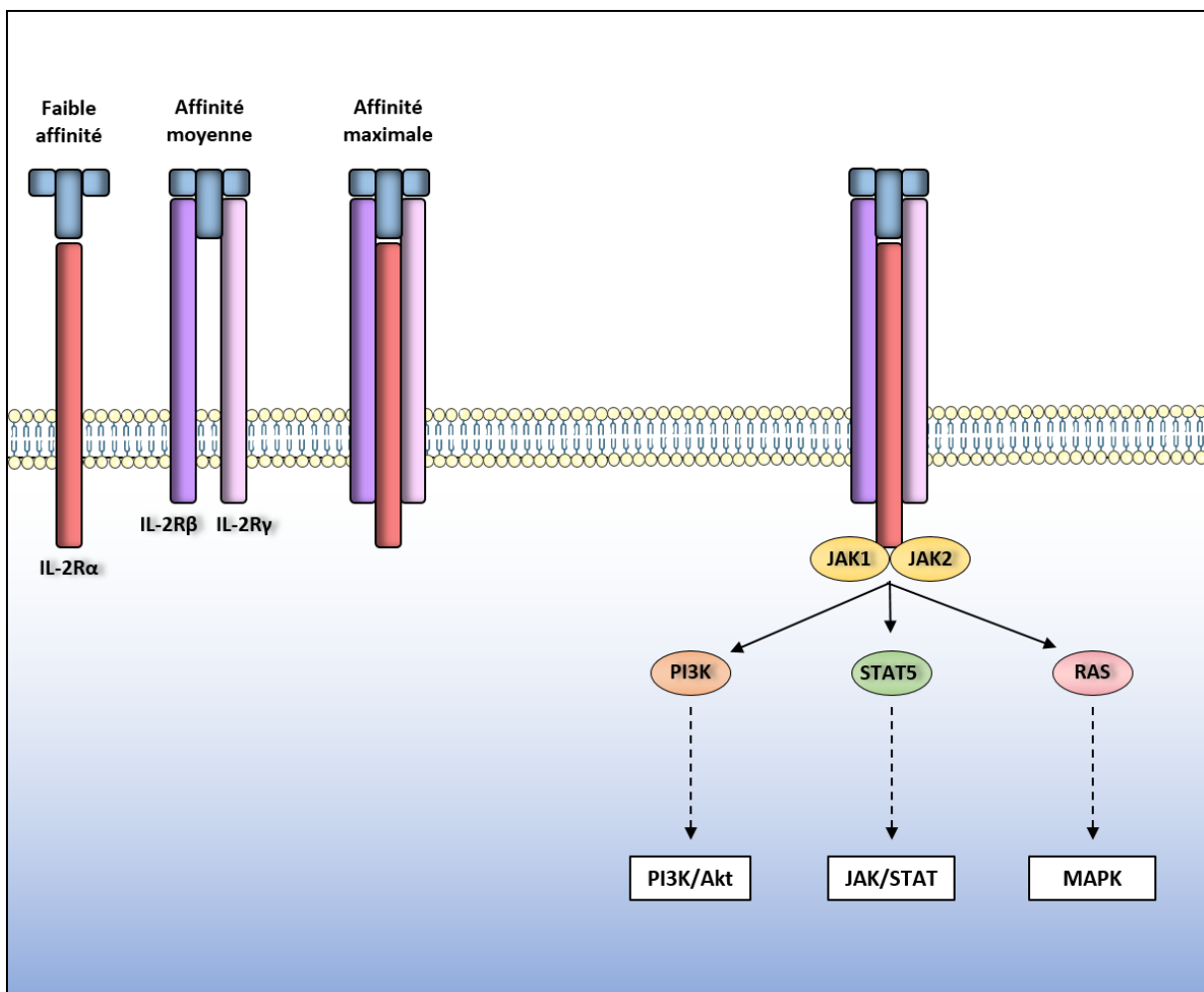
Le récepteur CD28 reconnaît ses ligands CD80 et CD86. Une fois stimulé il va recruter les effecteurs LCK, GRB2, VAV1 et GADS afin de potentialiser fortement le signal induit par le TCR et qui passe par les voies JNK, p38 MAPK, MAPK, NFkB et NFAT.

### iii. La signalisation du récepteur à l'IL-2 (IL2R)

L'IL-2 est définie comme une cytokine majeure impliquée dans l'activation des lymphocytes T. Pour cause, la fixation de la cytokine sur son récepteur à la surface des LT provoque un signal d'activation efficace. Concernant le récepteur à l'IL-2, il faut savoir qu'il est constitué de trois sous-unités : une sous-unité IL-2R $\beta$  (CD122), une sous unité IL-2R $\gamma$ c (CD132) et une sous-unité IL-2R $\alpha$  (CD25). Ces sous-unités sont toutes capables de fixer l'IL-2 avec une affinité plus ou moins grande (Damoiseaux, 2020). A l'état basal, les LT expriment majoritairement à leur surface le dimère IL-2R $\beta$ -IL-2R $\gamma$ c de moyenne affinité. Cependant,



lorsque les signaux primaire (via le TCR) et secondaire (via le CD28) sont activés, ils vont conduire à l'expression à la membrane de la sous-unité IL-2R $\alpha$ , conduisant à la formation du récepteur de haute affinité pour l'IL-2. Par ailleurs les LT activés vont également sécréter de l'IL-2, qui aura donc un effet autocrine sur ces cellules. Une fois stimulé par son ligand, l'IL-2R va recruter au niveau de sa région cytoplasmique les kinases JAK1 et JAK2, qui vont exercer leur fonction en phosphorylant la région C-terminale de la sous-unité IL-2R $\beta$  du récepteur. En conséquence de cette modification du récepteur dans sa partie intra-cytoplasmique, divers effecteurs tels que PI3K, STAT5 ou RAS vont être recrutés et phosphorylés par JAK1/2, conduisant respectivement à l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt, JAK/STAT et MAPK (Shatrova et al., 2016) (**Figure 40**).



**Figure 40 : Signalisation du récepteur à l'IL-2**

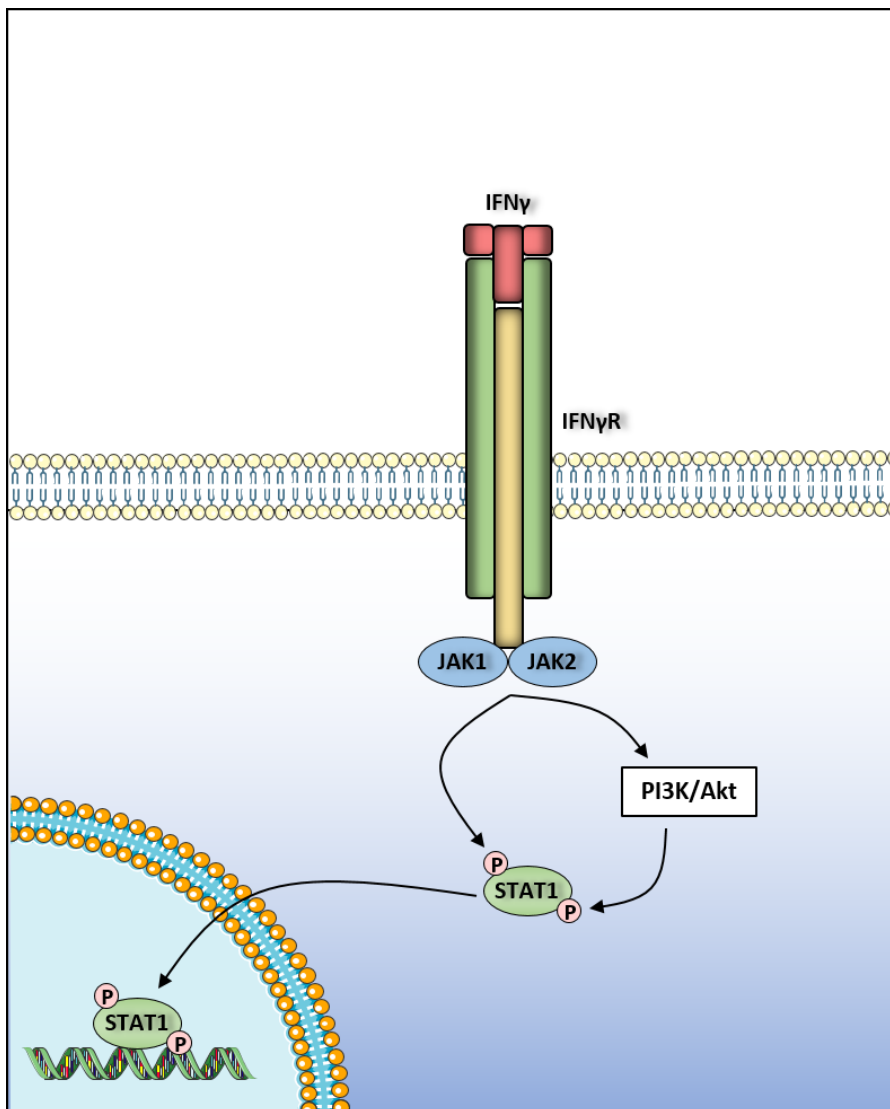
Le récepteur à l'IL-2 est composé de 3 sous-unités IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  et IL-2R $\gamma$ . La sous-unité  $\alpha$  ne dispose que d'une faible affinité pour l'IL-2, l'association des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  présente une affinité moyenne, et le récepteur complet composé des 3 sous-unités présente une affinité maximale.

Une fois stimulé, l'IL-2R va recruter les kinases JAK1 et JAK2, qui vont phosphoryler PI3K, STAT5 et RAS ; activant ainsi les voies de signalisation PI3K/AKT, JAK/STAT et MAPK.

#### iv. La signalisation du récepteur à l'interferon gamma (IFN $\gamma$ R)

L'interferon gamma (IFN $\gamma$ ) est une seconde cytokine capable d'activer les LT. Comme pour l'IL2, l'IFN $\gamma$  est sécrétée de façon autocrine par les LT mais également produite par les CPA. Lorsqu'elle fixe son récepteur à la surface des LT, un signal d'activation passant par les voies JAK/STAT1 et PI3K/Akt va être transduit, favorisant l'activation et la prolifération des LT CD8 notamment (Whitmire et al., 2005) (**Figure 41**).

L'ensemble de ces signaux conduit à l'activation des LT suite à la reconnaissance de l'antigène. Les LT jusqu'ici naïfs vont être capables d'exercer leur fonction. Ils sont donc à présent nommés T effecteurs. Selon qu'ils expriment le CD4 ou le CD8, les LT ne vont pas avoir la même fonctionnalité.

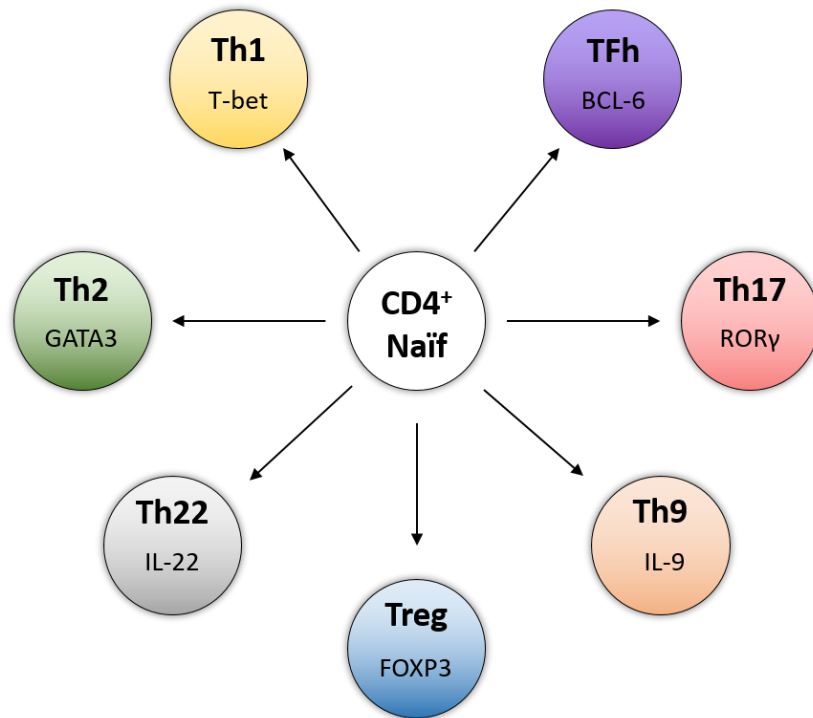


**Figure 41 : Signalisation du récepteur à l'IFN $\gamma$**

Le récepteur à l'IFN $\gamma$  une fois stimulé par son ligand va activer la voie JAK/STAT en phosphorylant STAT1 de deux manières : d'une part le récepteur va recruter les kinases JAK1 et JAK2 qui vont directement phosphoryler STAT1 ; et d'autre part il va y avoir stimulation de la voie PI3K/AKT, qui conduit elle aussi à la phosphorylation de STAT1. Adapté d'après LC. Plataniias *et al.* 2005.

#### d. Lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les LT CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> qui ont tout juste quitté le thymus sont dits naïfs, puisqu'ils n'ont pas encore rencontré l'antigène. Ces cellules constituent le réservoir de LT « helpers » (LT<sub>h</sub>) dont le rôle va être de soutenir indirectement la réaction du système immunitaire en favorisant l'activation de ses effecteurs directs (LB, macrophages, cellules dendritiques, ...). De même qu'il n'existe pas une seule et unique réaction immunitaire, nous allons retrouver plusieurs catégories de LT<sub>h</sub> dont la différenciation à partir des LT CD4 naïfs va dépendre du type de pathogène qui déclenche la réaction immunitaire. Dans cette partie, les différents sous-types de LT<sub>h</sub> et leur implication dans le cancer vont être présentés brièvement (**Figure 42**).



**Figure 42 : La polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Les LT CD4<sup>+</sup> vont subir une polarisation qui va varier selon le stimulus auquel ils sont soumis. L'expression du facteur T-bet est spécifique des Th1 ; le facteur GATA3 est propre aux Th2 ; le facteur ROR $\gamma$  est propre aux Th17 ; le facteur FOXP3 est propre aux Tregs. Les Th9 et Th22 sécrètent respectivement de l'IL-9 et de l'IL-22 ; et les TFh expriment BCL-6.

#### i. Les Th1

Les LT<sub>h</sub> vont se polariser en Th1 lors des infections causées par des pathogènes viraux ou bactériens intracellulaires. La polarisation des LT<sub>h</sub> naïfs en Th1 est provoquée par la présence de deux cytokines essentielles : l'IL-12 et l'IL-18. Ensemble ces cytokines activent la voie de signalisation JAK/STAT1/4 et provoquer l'expression du facteur de différenciation *TBX21* (*T-BET*), qui est spécifique des Th1. T-BET permet aux Th1 de sécréter de grandes quantités d'IFN $\gamma$ , qui (i) d'une part a une activité autocrine en favorisant l'expression de T-BET (maintien de la polarisation) (Bradley et al., 1996) ; et (ii) d'autre part a une activité paracrine sur les LT CD8 en favorisant leur activation (Whitmire et al., 2005).

Lors de la réponse anti-tumorale, les Th1 ont de par leur importante sécrétion d'IFN $\gamma$  un rôle anti-tumoral complet en favorisant la polarisation M1 des macrophages et en provoquant l'anergie des T régulateurs par exemple. Cependant, un effet pro-tumoral de l'IFN $\gamma$  a récemment été découvert en favorisant l'expression de PD-L1 à la surface des cellules endothéliales (Lane et al., 2018) et également à la surface des cellules tumorales, empêchant ainsi l'accumulation des LT CD8 (Y.-F. He et al., 2005).

## ii. Les Th2

Les Th2 sont impliqués dans la réponse immunitaire concernant les pathogènes extra-cellulaires. Leur polarisation est provoquée par la présence d'IL-4, sécrétée par des cellules de l'immunité innée telles que les éosinophiles, les basophiles ou encore les mastocytes. Par le biais de la voie JAK/STAT6, l'IL-4 favorise le facteur de transcription clé de cette polarisation : *GATA3*. *GATA3* va permettre aux Th2 de sécréter tout un cocktail de cytokines (IL-5, IL-9, IL-13 et IL-25) qui ont pour effet d'activer les cellules effectrices de l'immunité innée. Qui plus est, *GATA3* induit également la sécrétion d'IL-4, permettant ainsi le maintien des Th2 de manière autocrine (Maier et al., 2012). Les Th2 sont plutôt connus pour leur effet pro-tumoral. Cet effet n'est pas direct, cependant dans certains cas une polarisation biaisée vers le type Th2 va empêcher une réponse immune anti-tumorale correcte.

## iii. Les Th9

Les Th9 sont, comme les Th2, impliqués dans la réponse aux pathogènes extra-cellulaires et également aux allergies. Leur polarisation nécessite également la présence d'IL-4, mais ils vont en plus avoir besoin de TGF $\beta$  (« Tumor Growth Factor  $\beta$  »). Dans le cas des Th9, les facteurs de transcription *GATA3*, *SMAD22* et *SMAD4* sont nécessaires pour induire la polarisation (Wang et al., 2013) alors que dans le même temps *NFAT2* et *PU.1* vont réprimer la polarisation Th2 (H.-C. Chang et al., 2010).

Les Th9 sont spécialisés dans la sécrétion d'IL-9, mais ils sécrètent également de l'IL-10 et de l'IL-21 (Y. Li et al., 2016). Les Th9 semblent avoir un rôle pro-tumoral dans les cancers hématopoïétiques et il est démontré que la sécrétion d'IL-9 favorise l'abondance et l'activité des T régulateurs (L.-L. Feng et al., 2011).

## iv. Les Th17

Les Th17 jouent de leur côté un rôle dans la réponse immune associée aux muqueuses. Leur différenciation est induite par les cytokines TGF $\beta$ , IL-6 et IL-1 $\beta$ . L'IL-21 et l'IL-23 quant à elles permettent le maintien de cette différenciation (Knochelmann et al., 2018). Le facteur de transcription majeur des Th17 est *ROR $\gamma$*  (« Receptor-related Orphan nuclear Receptor gamma »). A la différence des précédents (*T-BET* et *GATA3*), *ROR $\gamma$*  ne bénéficie d'aucun mécanisme d'autorégulation positive, son expression est donc très instable et provoque une grande plasticité phénotypique chez ces Th17 (Ciofani et al., 2012).

De par leur très grande hétérogénéité, les Th17 peuvent selon le contexte avoir soit un rôle pro-tumoral en promouvant l'angiogenèse, soit un rôle anti-tumoral en sécrétant de l'IFN $\gamma$  et en recrutant les LT CD8<sup>+</sup> (Ye et al., 2013).

## v. Les Th22

Les Th22 vont effectuer leur activité immunitaire dans les tissus épithéliaux, notamment au niveau de la peau. Ils vont sécréter de l'IL-13 et du TNF $\alpha$ , mais ne sécrètent pas du tout d'IFN $\gamma$  ni d'IL-4 (Azizi et al., 2015). Leur différenciation est médiée par AHR (« Aryl Hydrocarbon Receptor ») (Baba et al., 2012).

Ces cellules sécrètent de grandes quantités d'IL-22, une cytokine dont le rôle pro-tumoral est clairement identifié puisqu'elle favorise la prolifération des cellules tumorales en activement notamment la voie JAK/STAT3 (Jiang et al., 2011).

## vi. Les TFh

Les LT folliculaires ont déjà en partie été traités dans ce manuscrit, puisque ces cellules jouent un rôle prépondérant dans le développement des lymphocytes B. Elles sont localisées dans les organes lymphoïdes secondaires où elles vont créer un environnement favorable au développement du centre germinatif, notamment via la production de BCL-6.

## vii. Les T régulateurs (Tregs)

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) sont une catégorie particulière de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ils peuvent être générés par polarisation des LT CD4<sup>+</sup> dans les organes lymphoïdes secondaires, mais leur origine peut également être beaucoup plus précoce. En effet les Tregs sont produits dans le thymus à partir de LT CD4<sup>+</sup> hautement réactifs aux auto-antigènes couplés au CMH-II, mais ayant malgré tout survécu aux mécanismes de sélection thymique (Josefowicz et al., 2012).

Les Tregs expriment le marqueur CD25 (IL2R $\alpha$ ) qui ne leur est pas propre puisqu'il est exprimé par tous les LT activés. En revanche, ils expriment de façon spécifique le facteur de transcription *FOXP3* (« Forkhead bOX P3 »), ce qui permet par conséquent de les identifier facilement (Fontenot et al., 2003).

Ces cellules sont spécialisées non pas dans le support du système immunitaire, mais plutôt dans l'inhibition de ce dernier. Ce rôle peut paraître paradoxal mais il est le garant d'un bon fonctionnement de la réponse immune. Comme nous l'avons vu, l'activation des LT passe par de nombreuses voies de signalisation qui se synergisent et s'auto-activent entre elles. Cette activation puissante est nécessaire pour éliminer les pathogènes et cellules infectées, mais il comporte un risque important d'emballement. Ainsi, les Tregs sont présents pour freiner la réponse immune et permettre de la garder sous contrôle.

Les mécanismes mis en jeu par les Tregs pour inhiber la réponse immune sont nombreux, on retrouve notamment :

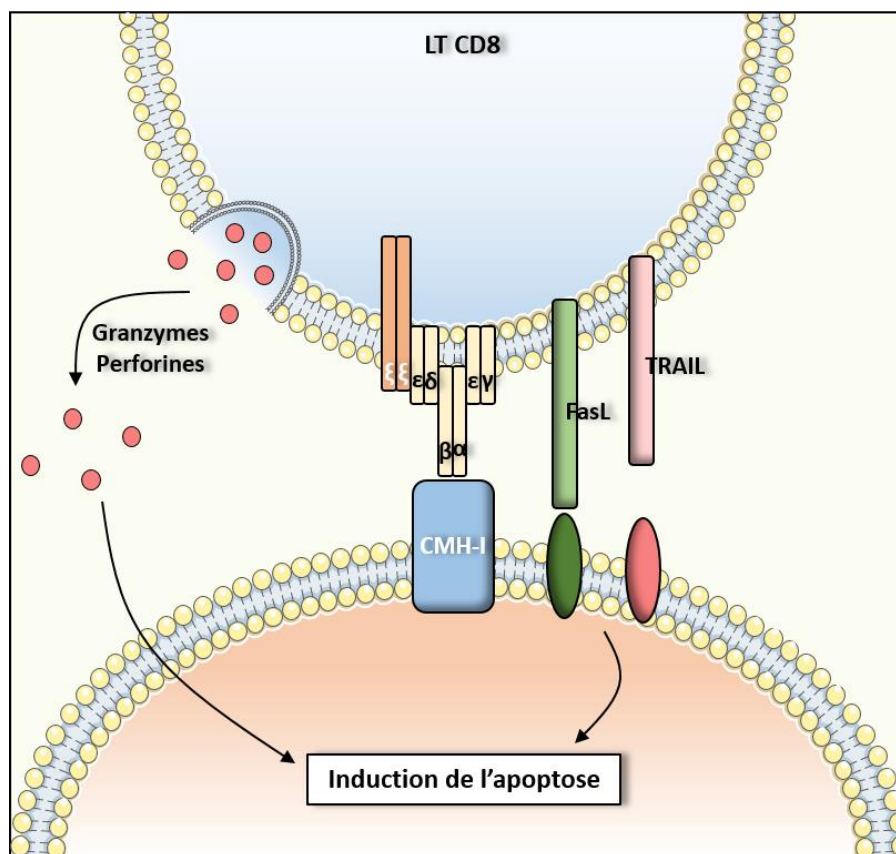
- L'expression à leur surface des marqueurs CD39 et CD73, qui sont capables de convertir l'ATP extra-cellulaire en adénosine. L'adénosine va inhiber l'activation des LT et des cellules myéloïdes.
- La sécrétion de cytokines immuno-modulatrices telles que l'IL-10 et le TGF $\beta$ .
- L'expression du récepteur CTLA-4, son rôle sera précisé dans la suite de ce mémoire. Comme le facteur de co-activation CD28, CTLA-4 est un récepteur des marqueurs

CD80 et 86. Les Tregs vont donc entrer en compétition avec les LT pour la fixation de CD80/86, ce qui empêche ces derniers d'être pleinement activés (Plitas & Rudensky, 2016).

L'étude des Tregs en oncologie bénéficie d'un intérêt croissant car il a été démontré dans de très nombreuses pathologie cancéreuses que les Tregs étaient dérégulés, et qu'une amplification de tous ces mécanismes immuno-modulateurs favorisait le développement tumoral.

### e. Lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Les LT CD8<sup>+</sup> sont dits lymphocytes T cytotoxiques, ce sont eux qui vont directement induire la mort des cellules infectées, ou tumorales. Pour cause, les LT CD8<sup>+</sup> ont la particularité de produire dans leur cytoplasme des vésicules chargées de protéines cytotoxiques (perforines, granzymes). Les LT CD8<sup>+</sup> exercent leur activité de deux manières qui coexistent : en sécrétant ces vésicules cytotoxiques qui vont aller agir sur les cellules cibles ; et en exprimant des marqueurs inducteurs de mort chez les cellules cibles (FasL et TRAIL) (**Figure 43**).



**Figure 43 : L'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

Les LT CD8<sup>+</sup> sont capables d'induire la mort des cellules infectées ou cancéreuses de deux manières : ils produisent des vésicules chargées en enzymes cytotoxiques telles que les granzymes et les perforines, qu'ils relarguent dans le milieu extra-cellulaire à proximité des cellules cibles. Ils expriment également les marqueurs FasL et TRAIL, qui activent leurs récepteurs à la surface des cellules cibles. L'ensemble de ces signaux induit la mort des cellules cibles par apoptose.

## f. Les LT mémoires

À l'issue d'une réponse immune efficace, l'activité des LT va être fortement réduite par l'absence d'antigène d'une part et par l'action des Tregs d'autre part. La grande majorité des LT effecteurs vont par conséquent entrer en apoptose, mais une petite fraction aura l'occasion de se différencier en LT mémoires.

Les LT mémoires sont des cellules de surveillance, elles sont expérimentées pour un antigène donné et circulent dans le sang et les tissus pour détecter une potentielle seconde infection par le même antigène. Lorsque cette seconde infection se produit, les LT mémoires vont proliférer de façon exponentielle et induiront ainsi une réponse immune beaucoup plus rapide et efficace que lors de la première rencontre.

## 2. Les autres acteurs du micro-environnement tumoral immun

### a. Les Monocytes

Les monocytes sont des cellules immunitaires issues de la lignée myéloïde. Elles ont une origine commune avec les LB qui est la cellule souche hématopoïétique (CSH) de la moelle osseuse. La CSH se différencie en Précurseur Myéloïde Commun (PMC) qui donnera lui-même naissance à un progéniteur granuleux/monocytaire (PGM). Cette cellule finira par se différencier en monocyte, qui est défini par l'expression des marqueurs CD14 et CD16 chez l'homme ; CD11b et Ly6C chez la souris (Ginhoux & Jung, 2014).

Trois sous catégories de monocytes peuvent être identifiées :

- Les monocytes **CD14<sup>hi</sup> CD16<sup>lo</sup>**, qui ont un rôle dans l'immunité innée essentiellement grâce à leur grande capacité de phagocytose. Ils sécrètent de grandes quantités d'IL-10 (Cros et al., 2010).
- Les monocytes **CD14<sup>hi</sup> CD16<sup>mid</sup>**, pro-inflammatoires qui sécrètent l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  et qui seraient plutôt impliqués dans l'activation des lymphocytes T (Wong et al., 2011).
- Les monocytes **CD14<sup>hi</sup> CD16<sup>hi</sup>**, dits non-conventionnels, qui circulent par voie sanguine et qui infiltrent les tissus en cas d'infection pour promouvoir l'inflammation sur site (Cros et al., 2010).

Les monocytes, une fois présents dans le tissu, sont capables de se différencier en macrophages.

### b. Les Macrophages

Les macrophages vont posséder une capacité à phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes plus grande encore que les monocytes. Les macrophages ne circulent que très peu dans le sang et ils sont plutôt infiltrés dans les tissus, inflammatoires ou tumoraux. Ils vont également avoir un rôle de support important (CPA), car l'activité de phagocytose leur permet d'exprimer, via leur CMH, des antigènes potentiellement uniques (composants cellulaires internes par exemple).

Les macrophages sont caractérisés par l'expression de marqueurs tel que le F4/80 et sont polarisés en deux sous-catégories :

- **Les macrophages type M1** : ces macrophages sont formés tôt dans la réaction inflammatoire, ils ont par conséquent un rôle pro-inflammatoire et ont une activité de phagocytose soutenue.
- **Les macrophages M2** : ces cellules anti-inflammatoires formées plus tardivement lors de la réaction immune vont au contraire inhiber cette réaction afin de la garder sous contrôle. Leur effet tient notamment à la sécrétion de différentes cytokines inflammatoires (IL-6) et anti-inflammatoires (IL10) et va toucher tous les effecteurs du microenvironnement (Yang et al., 2014).

### c. Les cellules NK

Les lymphocytes NK sont issus du même précurseur que les lymphocytes B et T, le CLP. Elles sont cependant plus proches des LT CD8<sup>+</sup>. Une fois différenciés, les cellules NK expriment entre autre le marqueur CD56 chez l'homme, CD335 chez la souris.

Le rôle des cellules NK est, de la même manière que les LT CD8<sup>+</sup>, d'induire la mort des cellules infectées ou cancéreuses par dégranulation de vésicules contenant perforine et granzymes. Cependant, les NK font bien partie de l'immunité innée et non adaptative comme c'est le cas pour les LT CD8<sup>+</sup>.

L'activation des cellules NK passe par la stimulation de différents récepteurs à leur surface, les récepteurs KIRs chez l'homme et Ly49 chez la souris (Canossi et al., 2016; Dam et al., 2003). Ces récepteurs reconnaissent le CMH-I, et ils induisent en réalité une inhibition de fonction des cellules NK. Malgré le fait qu'elles ne puissent pas reconnaître d'antigène en particulier ; certains travaux montrent que la nature et l'intensité du signal vont déterminer la réaction de la cellule NK. En effet, il semblerait que les NK subissent lors de leur maturation un phénomène de sélection qui favorise les cellules qui reconnaissent les antigènes du soi. L'organisme s'assure ainsi qu'il ne peut pas exister de cellules NK auto-réactives, puisque tant que les NK reconnaîtront un antigène du soi lié au CMH-I elles seront inhibées. En revanche lorsqu'un antigène étranger associé au CMH-I va leur être présenté, il va se produire une levée d'inhibition qui conduira à la dégranulation cytotoxique des lymphocytes NK (Yokoyama & Kim, 2006).

En association à cette voie, les cellules NK expriment également le récepteur NKG2D (« Natural Killer Groupe 2 member D »), lors de l'activation de la cellule NK ce récepteur fixe ses ligands RAE1 et H60, ce qui déclenche une cascade de signalisation promouvant l'activation et la prolifération cellulaire via les voies MAPK, NFκB et PI3K/Akt (Sutherland et al., 2002).

Les lymphocytes NK ont enfin un rôle plus général dans le micro-environnement immun, puisqu'ils vont sécréter quantité de cytokines (notamment de l'IFNγ) essentielles aux fonctions des autres effecteurs de la réponse immune.

## B. Les mécanismes d'échappement tumoral

Comme nous l'avons vu le microenvironnement immun est constitué de nombreux effecteurs. Chacun d'entre eux jouent un rôle précis lors de la réaction immune en apportant une réponse contre l'agression pathogène, mais également en communiquant avec les autres effecteurs pour favoriser leur activité. De plus, à son échelle chaque membre du



microenvironnement immun participe à l'équilibre de cette réponse en la stimulant ou au contraire en l'inhibant pour éviter un phénomène d'emballement.

Au regard du système immunitaire le développement tumoral est considéré comme une agression. La réponse immune se met donc en place et chacun des effecteurs tente de jouer son rôle. Malheureusement, les cellules tumorales sont capables de moduler le microenvironnement immun à leur avantage pour détourner et éteindre la réaction anti-tumorale. Les principaux mécanismes d'échappement tumoral sont décrits dans cette partie.

## **1. L'épuisement des lymphocytes T**

L'épuisement des LT est un phénomène d'abord identifié chez des patients atteints d'infections virales au VIH ou à l'hépatite C. Il a ensuite été retrouvé dans le cas de certains cancers (Yokosuka et al., 2012). Cet épuisement se traduit par une perte de fonctions profonde des LT qui ne sont plus capables d'exercer une activité cytotoxique ou sécrétrice normale et qui compromet très fortement l'équilibre du microenvironnement immun et la réponse immune anti-tumorale.

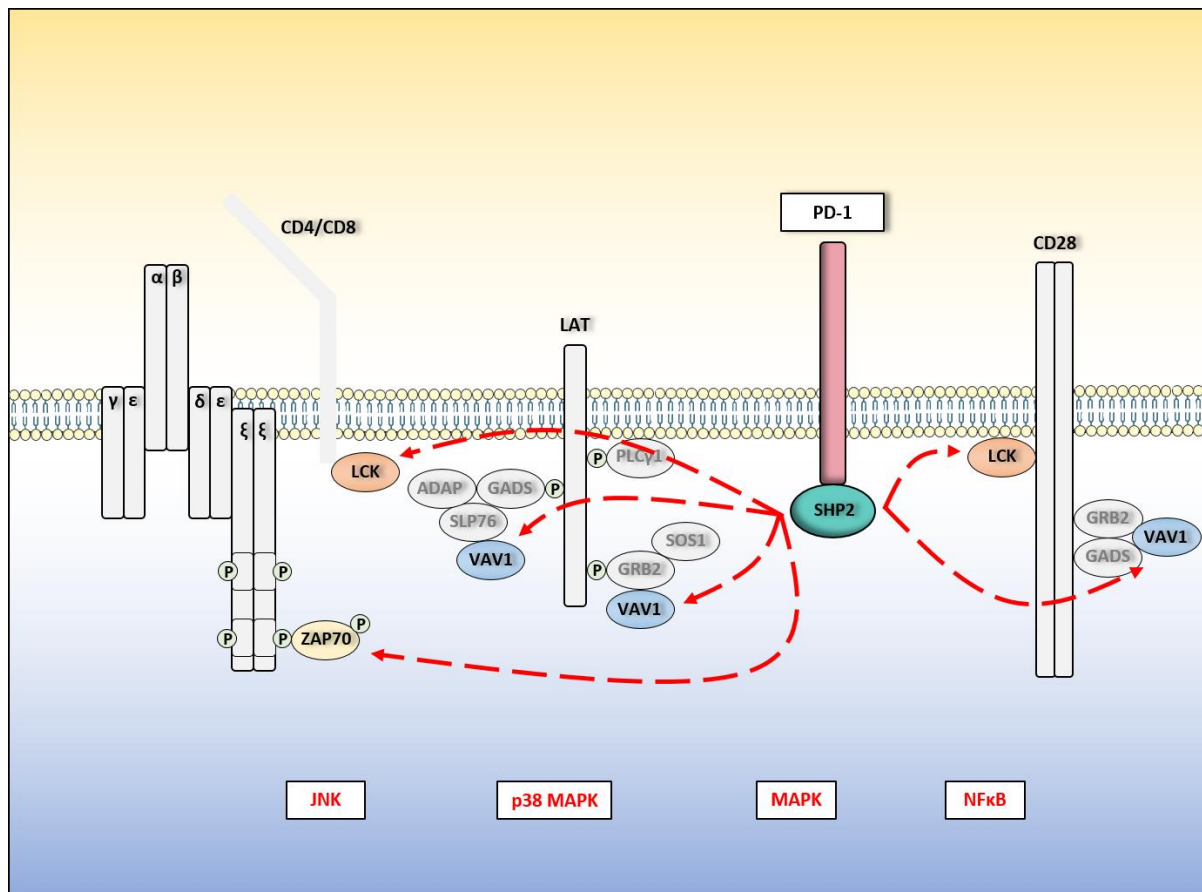
En temps normal lorsque les LT s'engagent dans une réaction immunitaire, celle-ci ne va pas durer plus de quelques jours. En revanche lorsqu'un cancer se développe, l'affection peut durer beaucoup plus longtemps (plusieurs années pour ce qui du cas de la MW). Ce contexte inflammatoire prolongé ainsi qu'une exposition chronique des LT à l'antigène va provoquer cet épuisement. De la même manière, les LT activés expriment en temps normal des récepteurs inhibiteurs que l'on nomme « points de contrôles » qui permettent de freiner leur activité. Lorsque les LT sont épuisés, ces récepteurs sont largement surexprimés. Les cellules tumorales exprimant un voir plusieurs ligands de ces récepteurs, le phénomène d'inhibition par épuisement s'en trouve renforcé. La signalisation de chaque point de contrôle immunitaire est détaillée ici.

### **a. Axe PD-1/PD-L1**

#### **i. La signalisation de PD-1**

Le point de contrôle le plus connu de la réponse immune est certainement l'axe PD-1/PD-L1. Le récepteur PD-1 (« Programmed cell-Death 1 », CD279) est exprimé par les LT activés afin de produire un effet de rétrocontrôle ; mais il se trouve que cette fonction va être détournée par les cellules tumorales pour inhiber la réponse T.

PD-1 comporte dans sa partie cytosolique un domaine ITSM (« immunoreceptor tyrosine-based switch motif »). Lorsque le récepteur est stimulé, il va être phosphorylé au niveau de ce domaine ITISM, ce qui va lui permettre de recruter des phosphatases telles que SHP2. La phosphatase SHP2 va cibler des effecteurs clé de la signalisation du TCR et du CD28 et va ainsi déphosphoryler ZAP70, VAV1 et LCK. Ces enzymes déphosphorylées vont perdre leur fonction et ne seront plus capables d'activer la cascade de signalisation activatrice du TCR et de CD28 qui passent par les voies MAPK, PI3K/Akt, JNK ou encore NFκB (Yokosuka et al., 2012) (**Figure 44**).



**Figure 44 : La signalisation de PD-1**

Lorsque PD-1 est stimulé par son ligand, il recrute à sa partie cytosolique la phosphatase SHP2. SHP2 va déphosphoryler des effecteurs des signalisations TCR et CD28 tels que LCK, ZAP70 ou VAV1. Il en résulte une inhibition des voies JNK, p38 MAPK, MAPK ou encore NFκB.

## ii. Expression de PD-L1

PD-L1 (« Programmed cell-Death Ligand 1 » ou CD274) est le principal ligand de PD-1, il est exprimé par une grande variété de cellules et notamment par les CPA. L'expression de PD-L1 est un mécanisme très complexe qui fait intervenir des régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles.

- **Régulation transcriptionnelle de PD-L1** : De manière tout à fait intéressante en ce qui nous concerne ici, plusieurs études ont démontré que la région promotrice du gène *CD274* qui code pour PD-L1 comporte plusieurs sites de fixation pour le facteur de transcription NFκB (Huang et al., 2013).
- **Régulation post-traductionnelle de PD-L1** : Dans sa forme native PD-L1 est une protéine de 37 kDa. Cependant, elle porte plusieurs sites de N-glycosylation dans sa région extracellulaire (N35, N192, N200 et N219). Les glycanes greffés sur ces sites peuvent être plus ou moins arborescents, et ainsi créer une glycoprotéine dont la taille est comprise entre 45 et 72 kDa. Enfin, il est démontré que cette glycosylation de PD-L1 va le stabiliser à la membrane plasmique et empêcher son internalisation. Il se

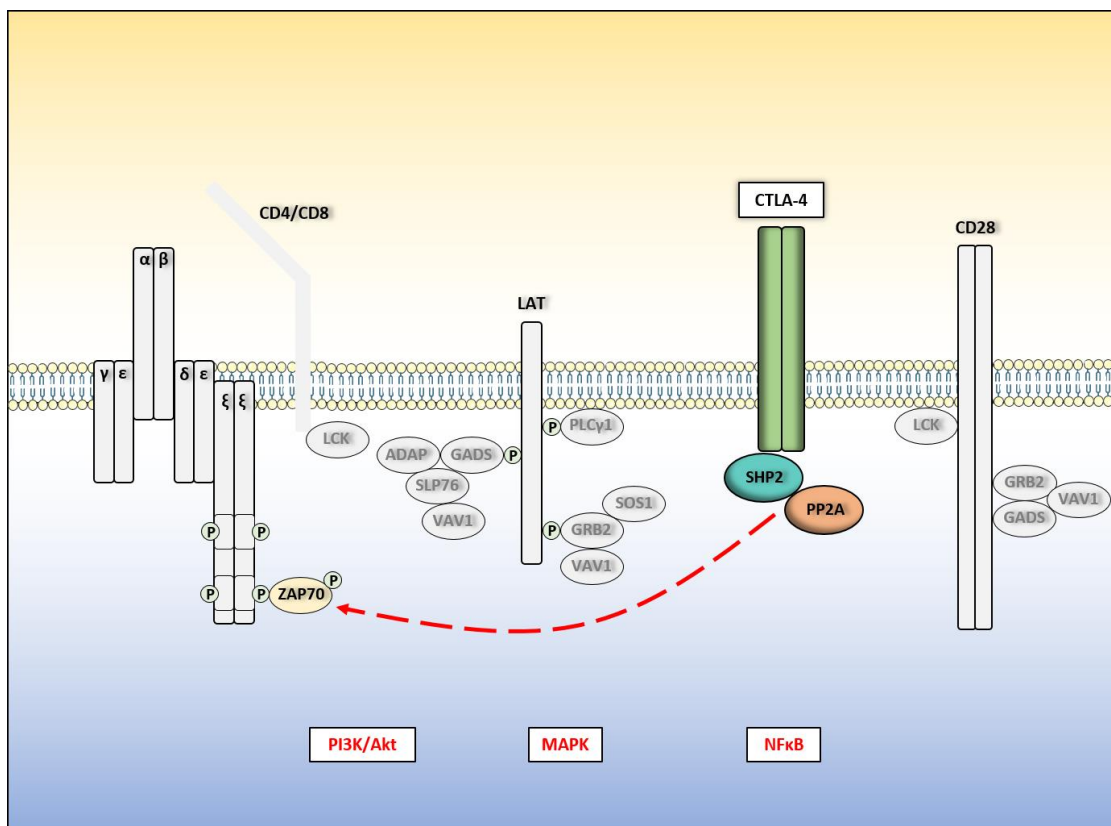
trouve que les formes glycosylées de PD-L1 ont largement été identifiées dans plusieurs types de cancers (C.-W. Li et al., 2016).

Quel que soit le mécanisme de régulation touché, il est connu que dans plusieurs types de cancers PD-L1 est surexprimé à la membrane. C'est par exemple le cas chez 25% des patients atteints de DLBCL (J. Godfrey et al., 2019). Ce phénomène a également été démontré dans le cas du lymphome de la zone marginale (Vincent-Fabert et al., 2019).

### b. Axe CTLA-4

Comme PD-1 et à l'instar de tous les récepteurs inhibiteurs, CTLA-4 est normalement exprimé lors de l'activation des lymphocytes T afin d'exercer un rétro-contrôle négatif sur ces derniers. La particularité de CTLA-4 est qu'il va fixer les ligands CD80 et CD86, qui sont également les ligands du signal de co-stimulation CD28. Cependant l'affinité de CTLA-4 pour CD80/86 étant bien supérieure à celle du CD28, son expression est normalement modérée afin de ne pas empêcher l'activation des LT (Peach et al., 1994). En revanche lorsque les LT sont épuisés ils expriment très fortement CTLA-4, ce qui conduit à leur inhibition.

Lorsqu'il est stimulé, CTLA-4 va recruter deux phosphatases : PP2A et SHP2. Ces phosphatases vont impacter la signalisation du TCR et celle du CD28 à plusieurs niveaux en déphosphorylant notamment ZAP70, ce qui a pour conséquence d'inhiber fortement les voies de signalisation NFκB, PI3K/Akt et MAPK (Fraser et al., 1999) (**Figure 45**)



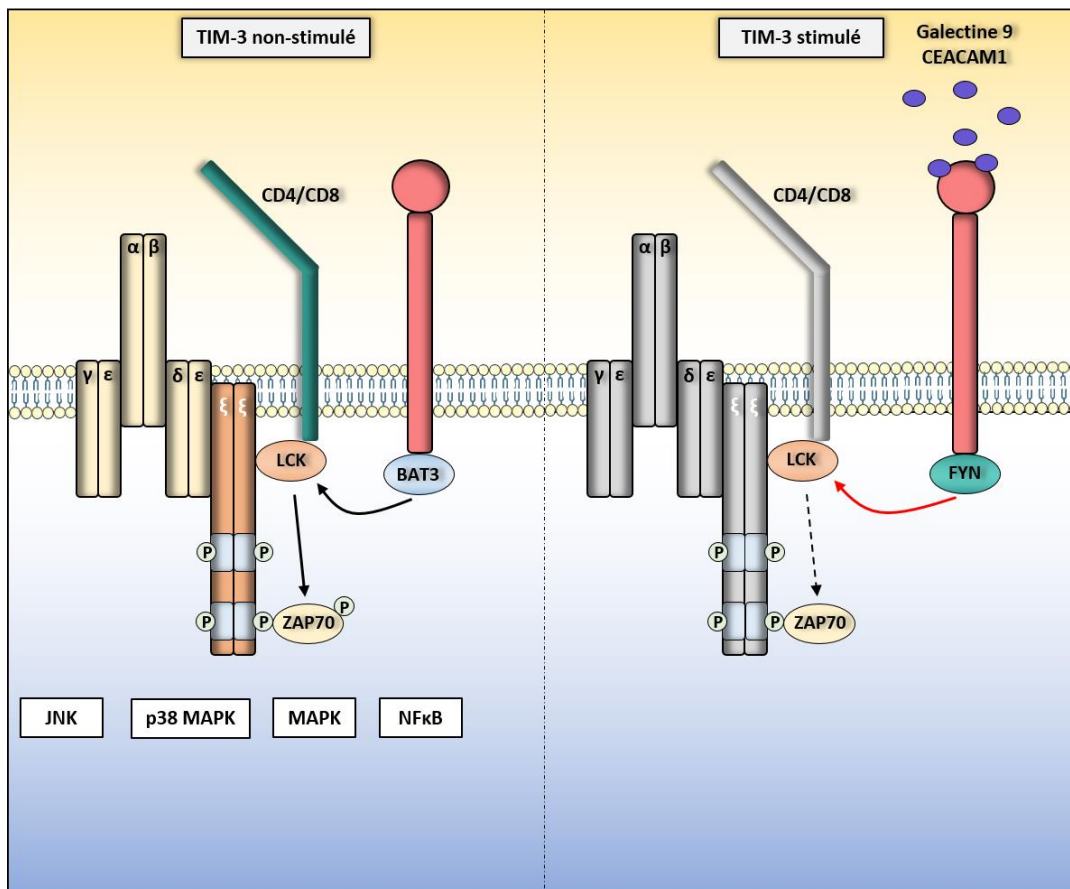
**Figure 45 : La signalisation de CTLA-4**

Une fois CTLA-4 stimulé par CD80/86, il recrute deux phosphatases PP2A et SHP2. Ces deux enzymes vont déphosphoryler ZAP70 et par conséquent inhiber les voies PI3K/AKT, MAPK et NFκB notamment.

### c. Axe TIM-3

TIM-3 est un autre point de contrôle immunitaire, mais contrairement aux deux premiers cités il va être exprimé de façon constitutive par les LT. Dans les premiers temps de l'activation des LT, TIM-3 est recruté au niveau de la synapse immunologique. En absence de ligand, la protéine adaptatrice BAT3 est liée à la partie cytosolique de TIM-3 et elle permet de recruter la forme active de LCK, ce qui renforce la signalisation du TCR.

Cependant lorsque TIM-3 fixe un de ses ligands GALECTINE 9 ou CEACAM1, un changement de conformation se propage jusqu'à sa partie C terminale et provoque le départ de BAT3. La protéine FYN va à présent pouvoir venir se fixer à TIM-3 et va recruter plusieurs phosphatases qui vont déphosphoryler LCK notamment, conduisant à une inhibition forte de la voie du TCR/CD28 en stoppant les voies de signalisation en aval (Wolf et al., 2020) (**Figure 46**).



**Figure 46 : La signalisation de TIM-3**

Lorsque la synapse immune se forme TIM-3 est recruté à proximité du TCR. Il fixe dans sa partie cytosolique BAT3, qui permet un meilleur recrutement de LCK au niveau du TCR et permet donc de renforcer sa signalisation. En revanche, lorsque TIM-3 fixe un de ses ligands CEACAM1 ou Galectine 9 un changement de conformation va induire le départ de BAT3 au profit de la phosphatase FYN, qui va inhiber l'activité de LCK. Il en résulte une inhibition générale de la signalisation activatrice du TCR qui passe par les voie JNK, p38 MAPK, MAPK ou encore NFkB.

#### **d. Axe LAG-3**

LAG-3 est un point de contrôle immunitaire qui est exprimé par les LT CD4 et CD8 lors de leur activation. Si nous sommes bien certains que LAG3 inhibe l'activité des LT en stoppant les voies de signalisation activées par le TCR/CD28, son mécanisme exact d'action n'est pas connu. Ce que nous savons actuellement, c'est que LAG-3 présente une homologie assez importante avec le CD4, et qu'il va fixer le même ligand à savoir le CMH-II. L'affinité de LAG-3 pour le CMH-II est même 100 fois supérieure à celle de CD4 (Huard et al., 1995). Aussi l'idée a été émise que LAG-3 exercerait son action inhibitrice en entrant en compétition avec le CD4 pour la fixation du CMH-II. Cependant il semblerait que LAG-3 inhibe l'interaction du CD4 avec le CMH-II seulement lorsque celui-ci n'est pas engagé par le TCR, ce qui aurait plutôt tendance à réfuter l'hypothèse (Huard et al., 1995).

Dans sa partie intracytosolique, LAG-3 comporte 3 domaines extrêmement conservés entre l'homme et la souris, ce qui suggère un rôle important bien qu'aucun mécanisme clair n'ait encore été mis à jour.

#### **e. La perte d'immunogénéicité**

Si l'épuisement des LT est provoqué de façon active par les cellules tumorales qui, d'une part, induisent une stimulation chronique à l'antigène et d'autre part surexpriment bien souvent les ligands des points de contrôles immunitaires ; il existe également un mécanisme plus passif au cours duquel les cellules tumorales vont réprimer l'expression des CMH classe I et/ou II à leur surface pour limiter l'activation des LT à leur rencontre (Fangazio et al., 2021). Ce phénomène appelé la perte d'immunogénéicité participe par conséquent à rendre les LT incapables de produire une réponse immunitaire efficace contre la tumeur.

## **2. Les lymphocytes T régulateurs**

De par leur activité naturelle d'inhibition des LT, il a très vite semblé probable qu'ils soient impliqués dans les phénomènes d'échappement tumoral. Pour cause, une augmentation du nombre de Tregs a été identifiée dans bon nombre de cancers et de lymphomes dans lesquels on retrouve justement un phénomène d'épuisement des LT. Cependant, malgré ces observations il ne semble pas y avoir de corrélation entre le taux d'infiltration par les Tregs et la sévérité de la maladie. Au contraire, pour des lymphomes tels que le lymphome folliculaire ou le DLBCL il est démontré qu'une augmentation des Tregs est corrélée à un meilleur pronostic (N.-R. Lee et al., 2008; Z.-Z. Yang et al., 2019). Par ailleurs dans les cas de FL qui évoluent en DLBCL on remarque une diminution du nombre de Tregs (Carreras et al., 2006).

Puisque le nombre de Tregs varie en fonction de l'évolution de la pathologie, il semble évident qu'ils y jouent un rôle bien que celui-ci soit moins évident que ce à quoi on s'attendait.

Cependant, de nouvelles études tendent à s'intéresser au phénotype des Tregs associés aux tumeurs plus qu'à leur nombre. C'est ainsi qu'il a été récemment observé que dans certains cancers, les Tregs surexpriment le récepteur de surface TIM-3 et que dans ce contexte là ce dernier va renforcer leur activation et potentialiser leur capacité à inhiber la réponse T anti-tumorale (Banerjee et al., 2021).

### **3. La transition des Macrophages**

Comme nous l'avons vu plus haut, les macrophages peuvent être polarisés soit en type M1 (pro-inflammatoires), soit en type M2 (anti-inflammatoires). Au niveau phénotypique, les macrophages M1 expriment CD80, CD86 et CD197 ; alors que les macrophages M2 expriment CD163 et CD206. Dans de nombreux types de lymphomes une dérégulation de la polarisation est mise en cause, à tel point que les macrophages associés à la tumeur (TAMs) représentent un paramètre pronostic à part entière. Par exemple, la sur-représentation des macrophages type M2 est de mauvais pronostic dans le DLBCL (Nam et al., 2018). De plus, il est observé que les TAMs surexpriment PD-L1 dans le lymphome de la zone marginale (Vincent-Fabert, et al., 2019).

Les TAMs participent donc activement à l'épuisement des LT, en exprimant PD-L1 mais également en sécrétant des cytokines inflammatoires (IL-6) et immunosuppressives (IL-10).

### **4. La dérégulation des cellules NK**

Etant des acteurs directs de la lutte contre le développement tumoral, les cellules NK vont également être impactées par des mécanismes d'échappement. Dans le cas du DLBCL par exemple, on observe une baisse significative de la quantité de cellules NK dans le sang associé à la surexpression de PD-1 à leur surface ; une fois stimulé par les cellules tumorales et les TAMs PD-1 conduit à l'épuisement des cellules NK (Vari et al., 2018).

### **5. Les cytokines immunosuppressives**

Dans le microenvironnement immun, la sécrétion de cytokines a un rôle prépondérant puisque ce sont ces cytokines qui vont activer/inhiber les effecteurs et qui vont leur permettre de se transmettre de l'information. Une dérégulation de cet environnement cytokinique est retrouvée dans de nombreux cancers soit via la baisse du niveau d'expression de cytokines activatrices, soit via l'augmentation de la quantité de cytokines immuno-modulatrices dans le milieu. Trois des principales cytokines immunosuppressives sont citées ici :

#### **➤ L'interleukine (IL-10) :**

L'IL-10 est reconnue comme la cytokine immunosuppressive majeure. Elle est principalement produite par les cellules de l'immunité innée (monocytes, macrophages, cellules dendritiques) et également par les lymphocytes B. Il est également démontré que les LT CD4 et CD8 sécrètent de l'IL-10 afin d'exercer un rétrocontrôle négatif de leur propre activité (O'Garra & Vieira, 2007). De plus, les LT régulateurs sécrètent également de l'IL-10 en quantité. L'IL-10 est par conséquent sécrétée par l'ensemble des acteurs du microenvironnement lorsqu'une réponse immune se met en place afin de limiter le risque d'emballement. En plus d'inhiber la prolifération des LT, l'IL-10 favorise l'activation des LB et la baisse d'expression des complexes CMH-I et II à la surface des monocytes (Cortes & Kurzrock, 1997).

#### **➤ L'interleukine 6 (IL-6) :**

La production d'IL-6 est activée par les voies NFκB et MAPK, les CPAs telles que les LB expriment donc de l'IL-6 lorsqu'elles sont activées. Dans le contexte du lymphome, l'IL-6 va promouvoir la survie et la prolifération des lymphoplasmocytes et plasmocytes et faciliter leur

dissémination (Burger, 2013). De plus, l'IL-6 est montrée comme étant une cytokine immunosuppressive car elle polarise la réponse T vers les Th17 et empêche une bonne activation des LT CD8 cytotoxiques (H. Tsukamoto et al., 2018).

➤ **Le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) :**

Enfin, le TNF $\alpha$  peut également être rangé dans la catégories des cytokines immunosuppressives. Comme la plupart des cytokines il est sécrété par un grand nombre de cellules présentes dans le microenvironnement tumoral lors de leur activation, et son expression peut être dérégulée dans certains cancers. Lorsque le TNF $\alpha$  est sécrété en grande quantité et de manière chronique, il est démontré que d'une part il favorise l'épuisement des LT, et que d'autre part il les rend insensibles à la signalisation du TCR (Bazzaz et al., 2014; Beyer et al., 2016).

## **6. Apport des modèles murins transgéniques à l'étude du microenvironnement immun dans les lymphomes B**

Les modèles murins représentent un outil formidable pour l'étude des mécanismes biologiques de manière générale. Au cours de cette thèse j'ai eu l'occasion de publier une revue qui recense plusieurs travaux menés sur des modèles transgéniques murins et ayant permis de mettre en évidence des mécanismes d'échappement immunitaire dans les lymphomes B non-Hodgkiniens.

Pour résumer, cette revue s'intéresse particulièrement à quatre mécanismes d'échappement immunitaire : la dérégulation de l'axe PD-1/PD-L1, la surexpression de CTLA-4 par les LT, la perte d'expression du CMH-II à la surface des cellules tumorales et enfin la dérégulation du récepteur NKG2D à la surface des cellules NK. Dans ce contexte, plusieurs travaux utilisant des modèles murins transgéniques pour l'étude de lymphomes non-Hodgkiniens B (DLBCL, lymphome de Burkitt, leucémie lymphoïde chronique, lymphome de la zone marginale) sont détaillés et discutés.



# Genetically Engineered Mouse Models Support a Major Role of Immune Checkpoint-Dependent Immunosurveillance Escape in B-Cell Lymphomas

Quentin Lemasson<sup>1,2</sup>, Hussein Akil<sup>1,2</sup>, Jean Feuillard<sup>1,2</sup> and Christelle Vincent-Fabert<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> UMR CNRS 7276/INSERM U1262 CRIBL, University of Limoges, Limoges, France, <sup>2</sup> Hematology Laboratory of Dupuytren Hospital University Center (CHU) of Limoges, Limoges, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Hermann Eibel,  
University of Freiburg Medical Center,  
Germany

### Reviewed by:

Christian Kosan,  
Friedrich Schiller University Jena,  
Germany  
Stéphane J. C. Mancini,  
INSERM U1068 Centre de Recherche  
en Cancérologie de Marseille (CRCM),  
France

### \*Correspondence:

Christelle Vincent-Fabert  
christelle.vincent-fabert@unilim.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
B Cell Biology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 19 February 2021

**Accepted:** 11 May 2021

**Published:** 25 May 2021

### Citation:

Lemasson Q, Akil H, Feuillard J and  
Vincent-Fabert C (2021) Genetically  
Engineered Mouse Models Support a  
Major Role of Immune Checkpoint-  
Dependent Immunosurveillance  
Escape in B-Cell Lymphomas.  
*Front. Immunol.* 12:669964.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.669964

These last 20 years, research on immune tumor microenvironment led to identify some critical recurrent mechanisms used in cancer to escape immune response. Through immune checkpoints, which are cell surface molecules involved in the immune system control, it is now established that tumor cells are able to shutdown the immune response. Due to the complexity and heterogeneity of Non Hodgkin B-cell Lymphomas (NHBLs), it is difficult to understand the precise mechanisms of immune escape and to explain the mitigated effect of immune checkpoints blockade for their treatment. Because genetically engineered mouse models are very reliable tools to improve our understanding of molecular mechanisms involved in B-cell transformation and, at the same time, can be useful preclinical models to predict immune response, we reviewed hereafter some of these models that highlight the immune escape mechanisms of NHBLs and open perspectives on future therapies.

**Keywords:** B-cell lymphoma, immune surveillance, PD-1/PD-L1, CTLA-4, MHC-II, NKG2D

## INTRODUCTION

Non Hodgkin B-cell Lymphomas (NHBLs) are malignant neoplasms characterized by an abnormal expansion of clonal B lymphocytes. Despite being subdivided in more than 50 entities (1), most of them can be ascribed as indolent (low grade) or aggressive forms (high grade). Immune escape, also called immunomodulation or immunoediting, is a way by which tumors neutralize and/or subvert the host's immune system to their advantage (2). The concept of host immune response against neoantigens has been demonstrated long time ago (3) and Tumor Infiltrated Lymphocytes (TILs) have been recognized very early as a biomarker of the immune response against cancer (4). However, tumor cells are able to evade immune response by developing an immunosuppressive microenvironment through the regulation of immune checkpoint protein expression, such proteins being essential in the negative control of activated immune cells. Various immunotherapy treatments aim to reactivate antitumor immune response by targeting specific immune-checkpoint proteins (5). Programmed cell-Death 1 (PD-1) and its ligand Programmed cell-Death Ligand 1 (PD-L1) are the most studied immune checkpoint proteins. If immune restoring therapies have given



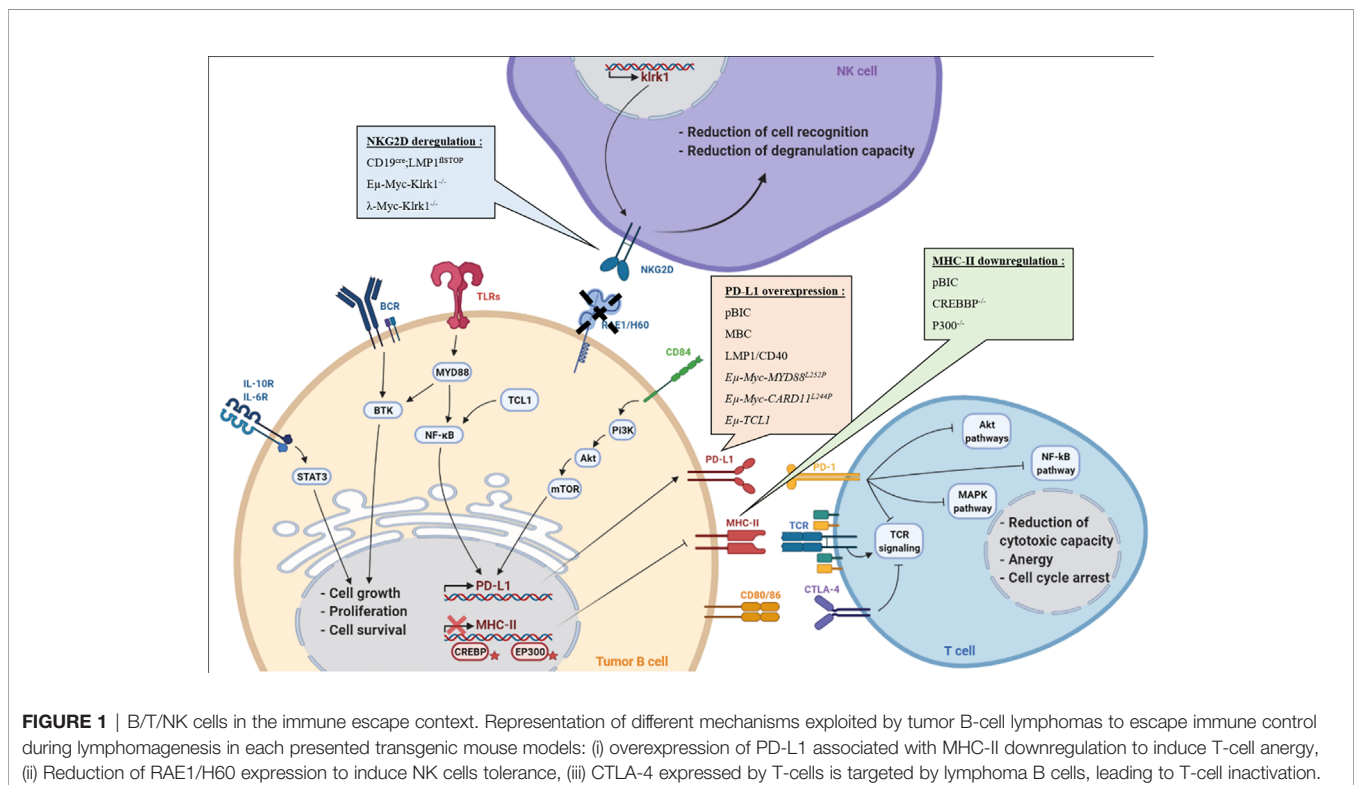
spectacular results in some solid cancers such as those of the lung, colon or melanoma, effects on B-cell lymphomas are mitigated (6). There is an urgent need to understand how tumor B cells escape immune surveillance. Thanks to genetic engineering, mouse models are globally useful for phenocopying human B-cell lymphomas and investigating the emergence and progression of transformed B cells as well as their concomitant immune escape and for researching new therapeutic strategies.

Here, we discuss different mouse models that have been used to study the B-cell immune surveillance (**Figure 1** and **Table 1**). The human relevance of these models is first presented, and then, the experimental results are summarized and discussed. A large part of studies presented hereafter investigated the PD-1/PD-L1 axis. However, other molecules such as CTLA-4, MHC-II or NKG2D are discussed. Strikingly, these models provide functional clues to genetic abnormalities as well as immune evasion occurring in B-cell lymphomas, and recurrently highlight the role of NF- $\kappa$ B. Indeed, as reviewed recently, NF- $\kappa$ B plays a major role in immune checkpoint controls and directly regulates PD-L1 expression (17).

## DEREGULATION OF PD-1/PD-L1 AXIS IN MOUSE MODELS OF B-CELL LYMPHOMAS

Discovered in the nineties, PD-1 and PD-L1 remain the most promising immune checkpoint targets for cancer immunotherapy

(18, 19). PD-L1 (B7-H1 or CD274) binds to its receptor PD-1 (CD279) on T cells (20). PD-L1 first promotes naïve T-cell expansion through IL-10 stimulation (19). Then, PD-1/PD-L1 signaling induces effective inhibition/exhaustion of T cells in the context of chronic antigen stimulation (20). Among effects, PD-1/PD-L1 interaction leads to a drastic inhibition of the T-cell receptor (TCR) signaling as well as AKT, ERK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. Essential for the immune response control, this mechanism is adopted by tumor cells to escape immune surveillance. PD-L1 expression by tumor B cells has been found in various lymphoma subtypes such as Diffuse Large B-Cell Lymphomas (DLBCL), associated or not with the Epstein Barr virus (EBV). This tumor phenotype is usually associated with an intratumoral infiltration of PD1<sup>+</sup> T-lymphocytes (PD1<sup>+</sup> TILs) (21, 22), thus exhibiting an inflamed phenotype according to classification of Chen (23). The selection pressure exerted by the immune surveillance is probably one of the drivers of the emergence of B-cell clones since chromosomal alterations in the 9p24.1 region which harbors the *PDL1* and *PDL2* loci are found in most classical Hodgkin lymphomas (HL) as well as in 27% of non Germinal Center B (GCB) DLBCLs, both B-cell cancers strongly associated with NF- $\kappa$ B activation (24). Anti-PD-1/PD-L1 therapy has given promising results in HL (25). PD-L1 expression is found in 26-75% (26) of patients with higher expression in Activated B-Cell (ABC) DLBCL, presumably due to the constitutively activated NF- $\kappa$ B as it is in Epstein Barr Virus (EBV)-positive DLBCL (27). However, correlation between PD-L1 expression and the response to PD-1/PD-L1 therapy in DLBCLs remains controversial (28).



**TABLE 1 |** Transgenic mouse models.

Model	Strategy	Expression/Induction	Phenocopy	Immune escape strategy	Reference
<b>CRE regulated expression</b>					
pBIC	NF- $\kappa$ B constitutive signaling <i>Blimp1</i> inactivation <i>p53</i> inactivation	GC-B cell compartment ( $C\gamma^{CRE}$ )	ABC-DLBCL	PD-L1 overexpression MHC-II downregulation	(7)
MBC	endogenous MYD88 <sup>L252P</sup> expression BCL2 overexpression	B-cell compartment ( $Cd19^{CRE}$ )	ABC-DLBCL	PD-L1 overexpression	(8)
CREBBP <sup>-/-</sup>	CREBBP inactivation	GC-B cell compartment ( $AID^{CRE}$ )	DLBCL	MHC-II deregulation	(9)
P300 <sup>-/-</sup>	p300 inactivation	GC-B cell compartment ( $AID^{CRE}$ )	DLBCL	MHC-II deregulation	(9)
CD19 <sup>cre</sup> ;LMP1 <sup>fSTOP</sup>	EBV's LMP1 expression	B-cell compartment ( $Cd19^{CRE}$ )	EBV driven lymphomas	NKG2D blocking	(10)
LMP1/CD40	CD40 constitutive signaling	B-cell compartment ( $Cd19^{CRE}$ )	SMZL	PD-L1 overexpression	(11)
<b>E<math>\mu</math>-Myc/<math>\lambda</math>Myc regulated expression</b>					
E $\mu$ -Myc-MYD88 <sup>L252P</sup>	transplantation of E $\mu$ -Myc-MYD88 <sup>L252P</sup>	B cell lineage	ABC-DLBCL	PD-L1/PD-L2 overexpression	(12)
E $\mu$ -Myc-CARD11 <sup>L244P</sup>	transplantation of E $\mu$ -Myc-CARD11 <sup>L244P</sup>	HSCs	ABC-DLBCL	PD-L1/PD-L2 overexpression	(12)
hCTLA4-Fc $\gamma$ R <sup>-/-</sup>	Human CTLA4 expression Fc $\gamma$ R inactivation	B cell lineage	CLL	CTLA4 deregulation	(13)
E $\mu$ -Myc-Klrk1 <sup>-/-</sup>	NKG2D inactivation	B cell lineage	MYC driven lymphomas	Absence of NKG2D	(14)
$\lambda$ -Myc-Klrk1 <sup>-/-</sup>	NKG2D inactivation	B cell lineage	BL	Absence of NKG2D	(15)
E $\mu$ -TCL1	TCL1 overexpression	B cell lineage	CLL	PD-L1/PD-L2 overexpression	(16)

(ABC-)DLBCL, (Activated B-Cell) Diffuse Large B-Cell Lymphoma; EBV, Epstein Barr Virus; SMZL, Splenic Marginal Zone Lymphoma; CLL, Chronic Lymphocytic Leukemia; BL, Burkitt Lymphoma.

Recently, two studies dealing with NF- $\kappa$ B associated DLBCLs showed similar results. The first one used the MBC model, developed by Knittel *et al.*, which develop aggressive DLBCL-like tumors (29). These mice harbor the MYD88<sup>L252P</sup> mutation and overexpress the anti-apoptotic factor BCL2, two features found in 29% and 40% of ABC-DLBCL cases respectively (30, 31). Flümman *et al.* found a striking resemblance of MBC tumors with human ABC-DLBCLs, with a similar gene expression profile (8). They also demonstrated overexpression of *Pd1l* on MBC lymphoma B cells associated with exhausted infiltrating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, highlighting the immune escape strategy used by tumor cells.

In the second study, Reimann *et al.* engineered an original ABC-DLBCL model based on the demonstrated cooperation between c-MYC and NF- $\kappa$ B (32). Hematopoietic Stem Cells (HSC) from E $\mu$ -Myc mice were stably transduced with naturally occurring NF- $\kappa$ B mutants, among them MYD88<sup>L252P</sup> or CARD11<sup>L244P</sup>. Transduced E $\mu$ -Myc cells were injected into lethally irradiated strain-matched C57BL/6 recipients. All these allograft models supported MYC-driven B-cell lymphomagenesis through increased protection against apoptosis, but only MYD88<sup>L252P</sup> or CARD11<sup>L244P</sup> E $\mu$ -Myc tumors resembled to human ABC-DLBCL, including expression of PD-L1 which was responsible for an exhausted T-cell phenotype (12).

In both studies, the authors treated their mouse model with anti-PD-1 antibodies, leading to a significant increase in overall mouse survival and inducing phenotypic changes in infiltrating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells with a restored proliferation potential. The combination of anti-PD-1 antibody and BCL2 inhibitor showed an additive effect in the MBC model. The anti-PD-1

treatment seems to be really effective regarding these models. But recent human clinical trial showed a completely different reality (6), raising the question of resistance to these therapies. Some clues may have been given by the pBIC model. This model associates *Tp53* deletion, enhanced NF- $\kappa$ B signaling due to an activated IKK2 mutant, and *Blimp1* inactivation that blocks plasma-cell differentiation. Pascual *et al.* showed that, in these mice, DLBCL-like tumors exhibited an ABC-DLBCL phenotype with FOXP1 dysregulation and overexpression of PD-L1 by tumor cells. This phenotype was associated with intra-tumor infiltration of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. Exhibiting an exhausted phenotype, these TILs also expressed other inhibitory molecules such as LAG-3 and 2B4 (7). In this model, anti-PD-1 treatment did not show any effect on mouse survival and anti-CD20 treatment alone had limited impact. But combining both antibodies markedly improved mouse survival and resulted in tumor regression with clearance of PD-1 TILs, strongly suggesting that therapies targeting the PD1/PD-L1 axis could be used in combination with other well established treatments in DLBCLs.

Taken together, these different mouse models for ABC-DLBCLs suggest that PD-1/PD-L1 immune checkpoint upregulation is one of the main mechanisms of immunosurveillance escape in ABC-DLBCL. It also indicates that, even when poorly effective alone, anti PD-1/PD-L1 therapies may very well be able to improve the effect of other molecules that directly target tumor B cells.

To our knowledge, only four mouse models of indolent B-cell lymphoma have been reported. One is related to Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) with *TCL1* (originally described in the former CD4 T-CLL, now called T-cell prolymphocytic leukemia) as a driver oncogene (33) and three others to marginal

zone lymphomas, involving *Traf3* deletion (34), *BCL10* deregulation (35) and CD40 signaling (11). The question of immune surveillance was addressed only in the *TCL1* and CD40 mouse models. First, Hofbauer *et al.* demonstrated that development of a CLL-like disease was associated with a shift from naïve to memory phenotypes of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in Eμ-*TCL1* transgenic mice (16). In the context of aging, McClanahan *et al.* described in this model a PD-1 overexpression on CD8<sup>+</sup> T cells with a defect in immune synapse formation, associated with specific PD-L1 overexpression on B cells (36). In the same model, Lewinsky *et al.* demonstrated the role of CD84, a member of the Signaling Lymphocyte Activating Molecule (SLAM) family known to bridge between CLL cells and their microenvironment (37). CD84 (SLAMF5) activation upregulates PD-L1 expression on CLL cells and stroma cells, through the AKT/mTOR pathway, and promotes PD-1 expression on T cells resulting in their exhaustion (38). In an adoptive transfer of Eμ-*TCL1* CLLs, PD-L1 blockade restored the antitumor immune response, in conjunction with an enhanced pro-inflammatory microenvironment (39). However, the question of the tumor microenvironment arises with this strategy. Adoptive transfer of Eμ-*TCL1* leukemic cells proves their ability to invade and proliferate in a healthy microenvironment by their own, but this development is independent of the tumor microenvironment, and consequently a real immune escape mechanism remains hard to identify here.

Being also associated with NF-κB activating mutations, splenic marginal zone lymphomas exhibit an inflamed phenotype (40, 41). In the model of Hömig-Hözel *et al.*, B-cell specific continuous CD40 signaling is due to specific B-cell expression of a chimeric LMP1/CD40 protein composed of the membrane moiety of the LMP1 protein of EBV and the intracytoplasmic transducing moiety of CD40 (11). LMP1/CD40 mice develop indolent lymphomas with clonal expansion of spleen marginal zone B cells. The indolent phenotype was shown to be associated with an overexpression of PD-L1 on B cells, such expression depending on NF-κB, STAT3 and BCR pathways (42). In this model, T-cell depletion resulted in progression toward an aggressive tumor, suggesting that some immune surveillance was still exerted on indolent B-cell lymphoma (43). Indeed, crossing the LMP1/CD40 and λ-*Myc* mice (in which *Myc* is under the control of the Ig lambda locus) led to the development of aggressive B-cell tumors with an immunoblast phenotype and further PD-L1 expression (32). This study suggests that the PD-1/PD-L1 axis is requested for emergence of an indolent lymphoma as well as for its progression towards an aggressive form. Concomitantly, our group demonstrated a beneficial effect of anti-PD-L1 therapy in the LMP1/CD40 model, resulting in tumor regression and T-cell reactivation. Interestingly, we also demonstrated that therapies targeting other pathways, such as NF-κB, JAK/STAT or BCR signaling, were also able to reduce PD-L1 surface expression of tumor B cells (42). Like in mouse DLBCL models, these results suggest that, as long as they are expressed, PD-1 and/or PD-L1 blockade in indolent B-cell lymphomas may synergize with other therapeutic molecules, for example, the specific inhibitors of JAK/STAT pathway, ruxolitinib, or, of BTK, ibrutinib.

In essence, these different transgenic mouse models highlight the major role of PD-1/PD-L1 axis deregulation in aggressive lymphomas development, but also showed the involvement of this immune checkpoint in the transformation of indolent lymphomas as long as they express PD-L1. They also indicate that the level of PD-L1 expression may be a critical parameter for immune evasion and tumor progression and point on the interest of combined therapies that include anti-tumor immune restoration.

## DEREGULATION OF OTHER IMMUNE CHECKPOINTS IN MOUSE MODELS OF B-CELL LYMPHOMAS

### CTLA-4

In Humans, a single nucleotide polymorphism located in the 3q13.33 region that harbors the CD80 and CD86 loci is associated with the risk of DLBCL, providing evidence for the role of immune function in the etiology of these lymphomas (44). The activating effects of CD80 and CD86 on CD28 are neutralized by the Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4). CTLA-4, normally expressed on the surface of activated and regulatory T cells as well as B cells, even if weakly, is the second major immune checkpoint molecule. As CTLA-4 has a higher affinity to CD28 than for CD80 or CD86, it downregulates primary T-cell responses by interaction with B7 family members expressed on Antigen Presenting Cells (APCs) (45). CTLA-4 was shown to be abnormally expressed on B-cell lymphomas, and is notably a part of the CLL signature (46).

In the Eμ-*TCL1* mouse model, CTLA-4, which is expressed on CLL-like B cells, seems to promote STAT3 activation pathway through its dimerization with surface CD86 followed by its internalization, and thus acting as a costimulatory signal (47). By using the adoptive transfer strategy, Do *et al.* showed that specific CTLA4 blockade on tumor cells could affect leukemic progression (13).

### MHC-II

Besides their direct role in antibody secretion, B cells express MHC-II and are also APCs. B-cells are able to improve T-cell activation and proliferation through a process called B/T-cell cooperation (48, 49). In B cell lymphomas, loss of MHC-II contributes to the immune evasion resulting in a decrease of T-cell activity. This loss of surface MHC-II may be due to genetic alterations of the *MHC-II* region, including homozygous deletions (50). Malignant B cells can also downregulate the expression of *MHC-II* by various mechanisms (7, 9, 51) such as the downregulation of the MHC-II transcriptional activators class II transactivator (*CIITA*). The consequence of *MHC-II* down-regulation in tumor B-cell escape has been exemplified in two KO models for the Histone Acetyl-Transferases (HAT) *Crebbp* or *Ep300* (which deletions are found in 50% of human DLBCLs). In these models, development of aggressive B-cell tumors was related to the fact that CD4<sup>+</sup> T cells were unable to interact with B cells because the latter had lost the expression of MHC-II which is normally up-regulated by these HAT (9).

In addition, loss of MHC-II was also demonstrated in the pBIC mouse lymphoma model, suggesting a cooperation with the PD-1/PD-L1 in immunosurveillance escape (7). If there is no current treatment allowing a direct restoration of MHC-II at the surface of tumor cells, McClanahan *et al.* showed a restoration of MHC-II surface expression after anti-PD-L1 treatment in the CLL model  $\text{E}\mu\text{-TCL1}$  (39).

Thereby, studies on pBIC and  $\text{E}\mu\text{-TCL1}$  models converge to show a striking correlation between PD-L1 and MHC-II deregulation in different types of lymphomas. Nevertheless, these findings deserve to be more closely investigated to improve the comprehension of immune checkpoints deregulation in lymphomas.

## NKG2D

In Humans, cells infected by the EBV are under powerful immune surveillance by T and NK cells. Compromising this immune surveillance such as in AIDS or after organ transplantation, results in aggressive EBV-related B-cell lymphoproliferations. NK-cell functions could strongly be altered in DLBCLs that can be associated with resistance to rituximab-based therapies (52). Mouse Natural Killer Group 2 member D (NKG2D) is a receptor expressed by all cytotoxic lymphocytes, notably NK cells, activated  $\text{CD8}^+$  T cells and activated macrophages (53). Two murine NKG2D ligands have been described (RAE-1 and H60) (53–56). Interaction between NKG2D and its ligands induces PI3K-AKT signaling, leading to an increase in target recognition, cytotoxic activity and a reduction in sensitivity to cell apoptosis (57). NKG2D ligands are normally expressed at the surface of any virally infected/tumorigenic cells. Both mouse and human studies suggest that tumor cells evade NKG2D recognition either by downregulating NKG2D ligands expression (14, 58) or by secreting massively circulating NKG2D ligands resulting in a downregulation of NKG2D expression on cytotoxic cells (59–61). The occurrence of B-cell lymphomas is accelerated in the absence of NKG2D. In mice, Guerra *et al.* showed, in 2008, that the deletion of *Klrk1*, the gene encoding NKG2D, in  $\text{E}\mu\text{-Myc}$  mice, accelerates the emergence of  $\text{E}\mu\text{-Myc}$ -induced lymphomas (14). A similar effect was shown on an EBV dependent mouse B-cell lymphoma (10), and also in a BL  $\lambda\text{-Myc-Klrk1}^{-/-}$  mouse model (15). Belting *et al.* completed this observation by demonstrating the role of NKG2D in the control of B-cell lymphoma growth and observed another escape mechanism developed by lymphomas cells through downregulating NKG2DL during the NK cell activation through downregulating NKG2DL (15).

All these different studies demonstrate the importance to escape the recognition of NKG2D receptor in B-cell lymphomagenesis and suggest its implication in the aggressive phenotype of these diseases.

## REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 Revision of the World Health Organization Classification of Lymphoid Neoplasms. *Blood* (2016) 127(20):2375–90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569

## CONCLUSION

The pressure of the immune surveillance is certainly one of the major driving forces in the emergence of B-cell lymphomas. Together, results reported in the articles reviewed here, support the fact that mouse models are useful to analytically understand the immune escape in both aggressive and indolent B-cell lymphomas. Beyond PD-1/PD-L1 axis, roles of CTLA-4, of antigen presentation and of NK-cells is also highlighted. These models functionally explain and resume the role of the different actors of the immune surveillance in B-cell lymphomas. Engineered mouse models will contribute to better understand tumor microenvironment in the aim to identify novel mechanisms of B-cell immune escape, which may be the keystone of future therapies. Mouse models are also useful for the preclinical study of these therapies, evidencing the interest of combinations that include treatments able to restore the anti-tumor immune response. All the models presented here point out the major role of NF- $\kappa$ B activation, suggesting that this pathway should also be targeted together with immune restoration therapies. Before trying such strategies in Humans, this is testable in genetically engineered mouse models. Providing a strong support for the issue of immune escape in B-cell lymphomas, these models deserve to be widely used.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the article and approved the submitted version. QL performed the literature review and prepared the figure and table. QL, HA, JF, and CVF wrote the manuscript.

## FUNDING

The group of JF is supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue), the Comité Orientation Recherche Cancer (CORC), the France Lymphome Espoir association, the Nouvelle Aquitaine Region and the Haute-Vienne and Corrèze committees of the Ligue Nationale Contre le Cancer. CVF was supported by the France Lymphome Espoir association of patients. QL was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, ECO202006011493).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Jeanne Cook Moreau (UMR CNRS 7276/INSERM 1262) for careful English editing.

2. Menter T, Tzankov A. Mechanisms of Immune Evasion and Immune Modulation by Lymphoma Cells. *Front Oncol* (2018) 8:54. doi: 10.3389/fonc.2018.00054
3. Wortzel RD, Philipps C, Schreiber H. Multiple Tumour-Specific Antigens Expressed on a Single Tumour Cell. *Nature* (1983) 304(5922):165–7. doi: 10.1038/304165a0

4. Vose BM, Moore M. Human Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Marker of Host Response. *Semin Hematol* (1985) 22(1):27–40.
5. Witkowska M, Smolewski P. Immune Checkpoint Inhibitors to Treat Malignant Lymphomas. *J Immunol Res* (2018) 2018:1982423. doi: 10.1155/2018/1982423
6. Ansell SM, Minnema MC, Johnson P, Timmerman JM, Armand P, Shipp MA, et al. Nivolumab for Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Patients Ineligible for or Having Failed Autologous Transplantation: A Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* (2019) 37(6):481–9. doi: 10.1200/JCO.18.00766
7. Pascual M, Mena-Varas M, Robles EF, Garcia-Barchino M-J, Panizo C, Hervas-Stubbs S, et al. PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint and p53 Loss Facilitate Tumor Progression in Activated B-cell Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Blood* (2019) 133(22):2401–12. doi: 10.1182/blood.2018889931
8. Flümman R, Rehkämper T, Nieper P, Pfeiffer P, Holzem A, Klein S, et al. An Autochthonous Mouse Model of Myd88- and BCL2-Driven Diffuse Large B-Cell Lymphoma Reveals Actionable Molecular Vulnerabilities. *Blood Cancer Discov* (2020) 2:70–91. doi: 10.1158/2643-3230.BCD-19-0059
9. Hashwah H, Schmid CA, Kasser S, Bertram K, Stelling A, Manz MG, et al. Inactivation of CREBBP Expands the Germinal Center B Cell Compartment, Down-Regulates MHCII Expression and Promotes DLBCL Growth. *Proc Natl Acad Sci USA* (2017) 114(36):9701–6. doi: 10.1073/pnas.1619555114
10. Zhang B, Kracker S, Yasuda T, Casola S, Vanneman M, Hömig-Hölzel C, et al. Immune Surveillance and Therapy of Lymphomas Driven by Epstein-Barr-Virus Protein LMP1 in a Mouse Model. *Cell* (2012) 148(4):739–51. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.031
11. Hömig-Hölzel C, Hojer C, Rastelli J, Casola S, Strobl LJ, Müller W, et al. Constitutive CD40 Signaling in B Cells Selectively Activates the Noncanonical NF- $\kappa$ B Pathway and Promotes Lymphomagenesis. *J Exp Med* (2008) 205(6):1317–29. doi: 10.1084/jem.20080238
12. Reimann M, Schrezenmeier JF, Richter-Pechanska P, Dolnik A, Hick TP, Schleich K, et al. Adaptive T-cell Immunity Controls Senescence-Prone MyD88- or CARD11-mutant B-Cell Lymphomas. *Blood* (2020). doi: 10.1182/blood.2020005244
13. Do P, Beckwith KA, Cheney C, Tran M, Beaver L, Griffin BG, et al. Leukemic B Cell CTLA-4 Suppresses Costimulation of T Cells. *J Immunol Baltim Md* (2019) 202(9):2806–16. doi: 10.4049/jimmunol.1801359
14. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, et al. NKG2D-Deficient Mice are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy. *Immunity* (2008) 28(4):571–80. doi: 10.1016/j.immuni.2008.02.016
15. Belting L, Hömberg N, Przewoznik M, Brenner C, Riedel T, Flatley A, et al. Critical Role of the NKG2D Receptor for NK Cell-Mediated Control and Immune Escape of B-Cell Lymphoma. *Eur J Immunol* (2015) 45(9):2593–601. doi: 10.1002/eji.201445375
16. Hofbauer JP, Heyder C, Denk U, Kocher T, Holler C, Trapin D, et al. Development of CLL in the TCL1 Transgenic Mouse Model Is Associated With Severe Skewing of the T-cell Compartment Homologous to Human CLL. *Leukemia* (2011) 25(9):1452–8. doi: 10.1038/leu.2011.111
17. Betzler AC, Theodoraki M-N, Schuler PJ, Döscher J, Laban S, Hoffmann TK, et al. NF- $\kappa$ B and Its Role in Checkpoint Control. *Int J Mol Sci* (2020) 21(11). doi: 10.3390/ijms21113949
18. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced Expression of PD-1, a Novel Member of the Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death. *EMBO J* (1992) 11(11):3887–95. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x
19. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, A Third Member of the B7 Family, Co-Stimulates T-Cell Proliferation and Interleukin-10 Secretion. *Nat Med* (1999) 5(12):1365–9. doi: 10.1038/70932
20. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* (2000) 192(7):1027–34. doi: 10.1084/jem.192.7.1027
21. Menter T, Bodmer-Haeckl A, Dirnhofer S, Tzankov A. Evaluation of the Diagnostic and Prognostic Value of PDL1 Expression in Hodgkin and B-Cell Lymphomas. *Hum Pathol* (2016) 54:17–24. doi: 10.1016/j.humphath.2016.03.005
22. Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, Sun HH, Roemer MGM, Xu ML, et al. PD-L1 Expression is Characteristic of a Subset of Aggressive B-Cell Lymphomas and Virus-Associated Malignancies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2013) 19(13):3462–73. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0855
23. Chen DS, Mellman I. Elements of Cancer Immunity and the Cancer-Immune Set Point. *Nature* (2017) 541(7637):321–30. doi: 10.1038/nature21349
24. Godfrey J, Tumulu S, Bao R, Leukam M, Venkataraman G, Phillip J, et al. PD-L1 Gene Alterations Identify a Subset of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Harboring a T-Cell-Inflamed Phenotype. *Blood* (2019) 133(21):2279–90. doi: 10.1182/blood-2018-10-879015
25. Ansell SM. Nivolumab in the Treatment of Hodgkin Lymphoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* (2017) 23(7):1623–6. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1387
26. Xu-Monette ZY, Zhou J, Young KH. PD-1 Expression and Clinical PD-1 Blockade in B-Cell Lymphomas. *Blood* (2018) 131(1):68–83. doi: 10.1182/blood-2017-07-740993
27. Auclair H, Ouk-Martin C, Roland L, Santa P, Al Mohamad H, Faumont N, et al. EBV Latency III-Transformed B Cells Are Inducers of Conventional and Unconventional Regulatory T Cells in a PD-L1-Dependent Manner. *J Immunol Baltim Md* 1950 (2019) 203(6):1665–74.
28. Zhang J, Medeiros LJ, Young KH. Cancer Immunotherapy in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Front Oncol* (2018) 8:351. doi: 10.3389/fonc.2018.00351
29. Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, Seeger JM, Al-Baldawi Y, Al-Maarri M, et al. B-Cell-Specific Conditional Expression of Myd88p.L252P Leads to the Development of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Mice. *Blood* (2016) 127(22):2732–41. doi: 10.1182/blood-2015-11-684183
30. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, et al. Oncogenically Active MYD88 Mutations in Human Lymphoma. *Nature* (2011) 470(7332):115–9. doi: 10.1038/nature09671
31. Lenz G, Wright GW, Emre NCT, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Arise by Distinct Genetic Pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105(36):13520–5. doi: 10.1073/pnas.0804295105
32. David A, Arnaud N, Fradet M, Lascaux H, Ouk-Martin C, Gachard N, et al. c-Myc Dysregulation is a Co-Transforming Event for Nuclear Factor- $\kappa$ B Activated B Cells. *Haematologica* (2017) 102(5):883–94. doi: 10.3324/haematol.2016.156281
33. Bichi R, Shinton SA, Martin ES, Koval A, Calin GA, Cesari R, et al. Human Chronic Lymphocytic Leukemia Modeled in Mouse by Targeted TCL1 Expression. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99(10):6955–60. doi: 10.1073/pnas.102181599
34. Moore CR, Liu Y, Shao C, Covey LR, Morse HC, Xie P. Specific Deletion of TRAF3 in B Lymphocytes Leads to B-Lymphoma Development in Mice. *Leukemia* (2012) 26(5):1122–7. doi: 10.1038/leu.2011.309
35. Li Z, Wang H, Xue L, Shin D-M, Roopenian D, Xu W, et al. E $\mu$ -BCL10 Mice Exhibit Constitutive Activation of Both Canonical and Noncanonical NF- $\kappa$ B Pathways Generating Marginal Zone (MZ) B-Cell Expansion as a Precursor to Splenic MZ Lymphoma. *Blood* (2009) 114(19):4158–68. doi: 10.1182/blood-2008-12-192583
36. McClanahan F, Riches JC, Miller S, Day WP, Kotsiou E, Neuberger D, et al. Mechanisms of PD-L1/PD-1-Mediated CD8 T-Cell Dysfunction in the Context of Aging-Related Immune Defects in the E $\mu$ -TCL1 CLL Mouse Model. *Blood* (2015) 126(2):212–21. doi: 10.1182/blood-2015-02-626754
37. Marom A, Barak AF, Kramer MP, Lewinsky H, Binsky-Ehrenreich I, Cohen S, et al. CD84 Mediates CLL-Microenvironment Interactions. *Oncogene* (2017) 36(5):628–38. doi: 10.1038/onc.2016.238
38. Lewinsky H, Barak AF, Huber V, Kramer MP, Radomir L, Sever L, et al. CD84 Regulates PD-1/PD-L1 Expression and Function in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Invest* (2018) 128(12):5465–78. doi: 10.1172/JCI96610
39. McClanahan F, Hanna B, Miller S, Clear AJ, Lichter P, Gribben JG, et al. PD-L1 Checkpoint Blockade Prevents Immune Dysfunction and Leukemia Development in a Mouse Model of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* (2015) 126(2):203–11. doi: 10.1182/blood-2015-01-622936
40. Vincent-Fabert C, Soubeyran I, Velasco V, Parrens M, Jeannot R, Lereclus E, et al. Inflamed Phenotype of Splenic Marginal Zone B-Cell Lymphomas With Expression of PD-L1 by Intratumoral Monocytes/Macrophages and Dendritic Cells. *Cell Mol Immunol* (2019) 16(6):621–4. doi: 10.1038/s41423-019-0228-y
41. Spina V, Rossi D. NF- $\kappa$ B Deregulation in Splenic Marginal Zone Lymphoma. *Semin Cancer Biol* (2016) 39:61–7. doi: 10.1016/j.semcancer.2016.08.002

42. Vincent-Fabert C, Roland L, Zimmer-Strobl U, Feuillard J, Faumont N. Pre-Clinical Blocking of PD-L1 Molecule, Which Expression Is Down Regulated by NF- $\kappa$ B, JAK1/JAK2 and BTK Inhibitors, Induces Regression of Activated B-Cell Lymphoma. *Cell Commun Signal CCS* (2019) 17(1):89. doi: 10.1186/s12964-019-0391-x
43. Vincent-Fabert C, Saintamand A, David A, Alizadeh M, Boyer F, Arnaud N, et al. Reproducing Indolent B-Cell Lymphoma Transformation With T-Cell Immunosuppression in LMP1/CD40-Expressing Mice. *Cell Mol Immunol* (2019) 16(4):412–4. doi: 10.1038/s41423-018-0197-6
44. Kleinstern G, Yan H, Hildebrandt MAT, Vijai J, Berndt SI, Ghesquière H, et al. Inherited Variants at 3q13.33 and 3p24.1 Are Associated With Risk of Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Implicate Immune Pathways. *Hum Mol Genet* (2020) 29(1):70–9. doi: 10.1093/hmg/ddz228
45. Khailaie S, Rowshanravan B, Robert PA, Waters E, Halliday N, Badillo Herrera JD, et al. Characterization of CTLA4 Trafficking and Implications for Its Function. *Biophys J* (2018) 115(7):1330–43. doi: 10.1016/j.bpj.2018.08.020
46. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The Lymph Node Microenvironment Promotes B-Cell Receptor Signaling, NF- $\kappa$ B Activation, and Tumor Proliferation in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* (2011) 117(2):563–74.
47. Herrmann A, Lahtz C, Nagao T, Song JY, Chan WC, Lee H, et al. CTLA4 Promotes Tyk2-STAT3-Dependent B-Cell Oncogenicity. *Cancer Res* (2017) 77(18):5118–28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0342
48. Biram A, Davidzohn N, Shulman Z. T Cell Interactions With B Cells During Germinal Center Formation, A Three-Step Model. *Immunol Rev* (2019) 288(1):37–48. doi: 10.1111/imr.12737
49. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4<sup>+</sup>T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol* (2012) 2012:925135. doi: 10.1155/2012/925135
50. Riemersma SA, Jordanova ES, Schop RF, Philippo K, Looijenga LH, Schuurin E, et al. Extensive Genetic Alterations of the HLA Region, Including Homozygous Deletions of HLA Class II Genes in B-Cell Lymphomas Arising in Immune-Privileged Sites. *Blood* (2000) 96(10):3569–77. doi: 10.1182/blood.V96.10.3569
51. Brown PJ, Wong KK, Felce SL, Lyne L, Spearman H, Soilleux EJ, et al. FOXP1 Suppresses Immune Response Signatures and MHC Class II Expression in Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Leukemia* (2016) 30(3):605–16. doi: 10.1038/leu.2015.299
52. Cox MC, Battella S, La Scaleia R, Pelliccia S, Di Napoli A, Porzia A, et al. Tumor-Associated and Immunochemotherapy-Dependent Long-Term Alterations of the Peripherical Blood NK Cell Compartment in DLBCL Patients. *Oncoimmunology* (2015) 4(3):e990773. doi: 10.4161/2162402X.2014.990773
53. Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. Ligands for the Murine NKG2D Receptor: Expression by Tumor Cells and Activation of NK Cells and Macrophages. *Nat Immunol* (2000) 1(2):119–26. doi: 10.1038/77793
54. Malarkannan S, Shih PP, Eden PA, Horng T, Zuberi AR, Christianson G, et al. The Molecular and Functional Characterization of a Dominant Minor H Antigen, H60. *J Immunol Baltim Md 1950* (1998) 161(7):3501–9.
55. Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, et al. Retinoic Acid Early Inducible Genes Define a Ligand Family for the Activating NKG2D Receptor in Mice. *Immunity* (2000) 12(6):721–7. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80222-8
56. Nomura M, Zou Z, Joh T, Takihara Y, Matsuda Y, Shimada K. Genomic Structures and Characterization of Rae1 Family Members Encoding GPI-Anchored Cell Surface Proteins and Expressed Predominantly in Embryonic Mouse Brain. *J Biochem (Tokyo)* (1996) 120(5):987–95. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021517
57. Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, et al. An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10. *Science* (1999) 285(5428):730–2. doi: 10.1126/science.285.5428.730
58. Brenner CD, King S, Przewoznik M, Wolters I, Adam C, Bornkamm GW, et al. Requirements for Control of B-Cell Lymphoma by NK Cells. *Eur J Immunol* (2010) 40(2):494–504. doi: 10.1002/eji.200939937
59. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee H-G, et al. Functional Expression and Release of Ligands for the Activating Immunoreceptor NKG2D in Leukemia. *Blood* (2003) 102(4):1389–96. doi: 10.1182/blood-2003-01-0019
60. Hilpert J, Grosse-Hovest L, Grünebach F, Buechele C, Nuebling T, Raum T, et al. Comprehensive Analysis of NKG2D Ligand Expression and Release in Leukemia: Implications for NKG2D-Mediated NK Cell Responses. *J Immunol Baltim Md 1950* (2012) 189(3):1360–71. doi: 10.4049/jimmunol.1200796
61. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumor-Derived Soluble MIC Ligands Impair Expression of NKG2D and T-Cell Activation. *Nature* (2002) 419(6908):734–8. doi: 10.1038/nature01112

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

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

## **7. Modification du microenvironnement immunitaire dans la MW**

Les mécanismes mis en place par les cellules tumorales pour éteindre le système immunitaire sont multiples. Pour cette raison l'échappement tumoral constitue durant cette dernière décennie un domaine d'étude plébiscité, car il a permis l'émergence de thérapies novatrices dont le but n'est non plus de cibler directement la tumeur mais de réactiver le système immunitaire. Cependant en ce qui concerne la MW, le rôle du microenvironnement immunitaire dans son développement reste encore mal connu.

En 2013, Grote D. *et al.* Montre pour la première fois que PD-L1 et PD-L2 sont surexprimés non seulement à la surface des cellules tumorales de la MW, mais également à la surface des cellules du microenvironnement tumoral (cellules dendritiques, monocytes et macrophages) favorisant leur prolifération (Grote et al., 2013).

En 2018, Jalali S. *et al.* Montre chez le patient que les cellules CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> de la MW surexpriment les ligands de PD-1 (PD-L1 et PD-L2) et qu'en plus de ça elles en sécrètent de grandes quantités retrouvées dans le sang et la moelle osseuse. De plus, ces travaux attestent que les lymphocytes cultivés en présence du sérum issu de patients atteints de la MW voient leur prolifération fortement compromise (Jalali et al., 2018).

La même année, Paludo J. *et al.* présente une étude dans laquelle il a étudié par cytométrie de masse la distribution des différents types cellulaires présents dans des aspirations médullaires de plusieurs patients atteints de MGUS IgM et de MW. Les cohortes étant très réduites et le travail ayant été réalisé sur des échantillons congelés il n'est pas possible de tirer de résultats clairs, en revanche ces travaux prouvent la faisabilité de la technique dans le cadre de la MW (Paludo et al., 2018).

Enfin en 2021 et 2022, deux travaux présentent des résultats concernant le microenvironnement immunitaire dans la MW. Dans le premier, Kaushal A. *et al.* Allie la cytométrie de masse avec la technique de CITE-seq pour démontrer qu'une réponse immunitaire T spécifique du clone tumoral se met en place très tôt lors de la phase MGUS, et que tout au long du développement de la maladie les lymphocytes T vont progressivement acquérir un phénotype épuisé avec perte du compartiment T naïfs et désensibilisation à l'IFN $\gamma$  (Kaushal et al., 2021).

Un peu plus tard, Sun H. *et al.* Effectue une étude haut débit du microenvironnement de la MW en analysant des échantillons de moelle osseuse en single cell RNAseq, et démontre une perte d'activité cytotoxique des cellules NK. De plus, il observe la présence de LT CD4 et CD8 épuisés avec perte du compartiment naïf et augmentation des Tregs (Sun et al., 2022).

Ces études récentes démontrent que l'échappement immunitaire sembleraient se mettre en place lors du développement de la MW, conduisant à l'épuisement et l'inactivité des LT. Ces travaux sont prometteurs si on considère la perspective thérapeutique qui en découle, mais ils restent cependant à confirmer et ils posent également la question de savoir quels sont les mécanismes exactement mis en jeu.

# Matériel et Méthodes

---



## Chapitre I. Le modèle d'étude

---

### **A. Construction du modèle murin et génération des animaux**

Le modèle murin utilisé lors de ces travaux est le modèle *Myd88<sup>L252P</sup>-Cd19<sup>cre</sup>* développé par le laboratoire (Ouk et al., 2021), **Annexe 1**. Le transgène *LoxP-STOP-LoxP-Myd88<sup>L252P</sup>-IRES-Yfp* est inséré entre les exons 1 et 2 du locus *Rosa26*. Afin que le transgène soit exprimé, les animaux *Myd88<sup>L252P tg/tg</sup>* (Fond génétique C57Bl6/J) sont croisés avec des souris *Cd19<sup>cre</sup> tg/tg* (Fond Balb/c). L'expression du transgène est conditionnée par l'élimination de la cassette STOP en amont de la construction après action de la Cre recombinase. Celle-ci étant ici exprimée sous dépendance du locus *Cd19* on ne retrouve par conséquent l'expression du transgène que dans les LB. Les animaux utilisés dans cette étude sont donc *Myd88<sup>L252P tg/+</sup> - Cd19<sup>cre tg/+</sup>*.

### **B. Suivi des animaux et euthanasie**

A partir de 6 mois, un prélèvement sanguin mensuel est réalisé sur les animaux afin de suivre l'évolution du pic d'Ig par électrophorèse des protéines sériques. Le prélèvement sanguin est réalisé en région rétro-orbitale sous anesthésie gazeuse (3% Isoflurane pendant environ 5 minutes), et récolté sur tube préalablement hépariné.

Lorsque les animaux présentent un pic monoclonal d'Ig sérique, ils sont euthanasiés pour analyse. Avant sacrifice le maximum de sang est prélevé en région rétro-orbitale sur tube contenant 20 µL d'EDTA 0,8M. L'euthanasie est réalisée par dislocation cervicale sous anesthésie (Isoflurane 3% pendant environ 5 minutes). Toutes les procédures sont effectuées en respect des réglementations Européennes et référencées au numéro d'agrément APAFIS#14581-2018041009469362 v3.

### **C. Préparation des organes**

Après le sacrifice, plusieurs organes sont prélevés pour analyse :

- La rate, dont une partie est incluse un PFA 4% et transmise au service d'anatomopathologie du CHU de Limoges pour inclusion en paraffine et coloration HES/marquage mouse Ig ; Une autre partie est congelée à -80°C en colle OCT en prévision des marquages en immunofluorescence. Le reste est broyé sur tamis 70 µm pour dissocier les cellules.
- Le rein qui est coupé dans le sens longitudinal, une moitié est incluse en PFA 4% et l'autre moitié congelée en colle OCT à -80°C.
- Un morceau de foie est prélevé et inclus en PFA 4%.

Une fois dissociées, les cellules de la rate sont incubées 10 min à température ambiante à l'obscurité dans 5 à 20 mL de Versalyse (#IM3648, Beckman Coulter) pour une lyse des globules rouges. Les cellules sont ensuite rincées\* puis centrifugées\*\*.

Les cellules sont reprises dans 5 à 25 mL de tampon\*, puis numérotées (#16842556 Countess 3®, Invitrogen®). Les échantillons sont conservés sur glace jusqu'à utilisation.

Le sang prélevé en EDTA est centrifugé 5 min 13000 rpm pour récupérer le plasma, puis ce dernier est congelé à -80°C.

## Chapitre II. Cytométrie en flux

### A. Protocole de marquage membranaire

Pour chaque marquage membranaire, 1 million de cellules sont déposées dans un tube à hémolyse puis marquées avec le mix d'anticorps correspondant pendant 30 min à 4°C. Les cellules sont rincées avec 1 mL de tampon\* puis centrifugées\*\*. Le surnageant est jeté, les cellules sont reprises dans 200 µL de tampon\* et passées au cytomètre (Cytoflex LX, Beckman Coulter®). Le détail des panels d'anticorps utilisés est détaillé en **Table 2**.

**Tableau 2 : Liste des panels d'anticorps utilisés pour les marquages de surface**

Marqueur	Fluorochrome	Clone	Fournisseur
<b>Panel B activés</b>			
CD80	BV421	16-10A1	Biologend
CD86	PE Vio770	REA1190	Miltenyi
CD19	BV510	1D3	BD
IgD	PerCP Cy5.5	11-26c.2A	BD
IgM	PE	R6-60.2	BD
B220	BV785	RA3-6B2	Biologend
Viakrome 808		/	Beckman Coulter
<b>Panel PD-L1 / CMH-II</b>			
B220	BV421	RA3-6B2	Biologend
PD-L1	PE	10F.9G2	Biologend
CMH-II	Viogreen	REA813	Miltenyi
Viakrome 808		/	Beckman Coulter
<b>Panels CD4/CD8 activés</b>			
CD4/CD8	PE Dazzle 594	RM4.5/53-6.7	Biologend
CD134	APC	OX86	Tonbo Bioscience
CD137	PE	17B5	Biologend
Viakrome 808		/	Beckman Coulter
<b>Panel sous-populations T</b>			
CD4	PE Dazzle 594	RM4.5	Biologend
CD8	APC	53-6.7	Biologend
CD44	PE	IM7	Biologend
CD62L	BV421	MEL14	Biologend
Viakrome 808		/	Beckman Coulter
<b>Panel T épuisés</b>			
CD4	Vioblue	REA604	Miltenyi
CD8	APC Vio770	REA601	Miltenyi
CD3	PE Vio770	REA641	Miltenyi
CD45	PerCP Vio700	REA737	Miltenyi
PD-1	PE	REA802	Miltenyi
CTLA-4	PE Vio615	REA984	Miltenyi
TIM-3	APC	REA602	Miltenyi
LAG-3	BV711	C9B7W	Biologend
Viakrome 808		/	Beckman Coulter

## **B. Protocole de marquage des Tregs**

Pour le marquage des Tregs, le kit « Mouse Tregs detection kit » (#130-120-674, Miltenyi®) est utilisé. Un marquage membranaire (CD4 2µL + CD25 2µL, 20 min à 4°C) est réalisé sur 1 million de cellules, puis les cellules sont fixées-perméabilisées (30 min à 4°C) avant marquage intracellulaire de FoxP3 (30 min à 4°C). Les échantillons sont ensuite passés au cytomètre pour analyse (Cytoflex LX, Beckman Coulter®).

## **C. Protocole de marquage des cytokines intra-cellulaires**

L'analyse du taux de sécrétion des cytokines est réalisée en cytométrie en flux. 2 millions de cellules sont reprises dans 1,5 mL de milieu RPMI complet\*\*\* en plaque 24 puits. Dans chaque puits, 4µL de cocktail contenant PMA/ionomycine + Brefeldine A (#423303, Biolegend®) sont ajoutés, ainsi que 2 µL de Monensine (#420701, Biolegend®). Les cellules sont cultivées pendant 6 heures à 37°C 5% de CO<sub>2</sub>. Après incubation, les cellules sont transférées en tube à hémolyse, rincées avec 2 mL de tampon\* et centrifugées\*\*. Les marquages membranaires sont réalisés à 4°C pendant 20 min. Les cellules sont à nouveau rincées\* et centrifugées\*\* puis soumises à fixation perméabilisation pendant 30 min à 4°C (Cytofix/Cytoperm® #554714, BD®). Les cellules sont rincées\* et centrifugées\*\*, puis les marquages de cytokines intracellulaires sont réalisés à 4°C pendant 30 min. Les cellules sont rincées\* et centrifugées\*\* une dernière fois avant d'être reprises dans 200 µL de tampon\* pour être analysées au cytomètre (Cytoflex LX, Beckman Coulter®). Le détail des panels utilisés pour le marquage des cytokines intracellulaires est détaillé en **Tableau 3**.

**Tableau 3 : Liste des panels d'anticorps utilisés pour l'analyse des cytokines**

<b>Marqueur</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Fournisseur</b>
<b>Panel cytokines lymphocytes B</b>			
CD19	BV510	1D3	BD
IL-10	BV421	JES5-16E3	Biolegend
TNFα	APC Cy7	MP6-XT22	Biolegend
IL-6	APC	REA1034	Miltenyi
IFNγ	BV711	XMG1.2	Biolegend
<b>Panel cytokines lymphocytes T</b>			
CD4	PE Dazzle 594	RM4.5	Biolegend
CD8	APC	53-6.7	Biolegend
Granzyme B	FITC	GB11	Biolegend
IL-2	PE	JES6-5H4	Biolegend
TNFα	APC Cy7	MP6-XT22	Biolegend
IL-10	BV421	JES5-16E3	Biolegend
IFNγ	BV711	XMG1.2	Biolegend
<b>Panel cytokines Tregs</b>			
CD4	FITC	RM4.5	Biolegend
CD3	PE Vio770	REA641	Miltenyi
FoxP3	PE	REA768	Biolegend
TIM-3	BV711	B8.2C12	Biolegend
IL-10	BV421	JES5-16E3	Biolegend
IL-6	APC	REA1034	Biolegend

## Chapitre III. Tests de traitements

---

### A. Traitements ex vivo Ibrutinib®, Ibrutinib®+anti-PD-1, anti-IL-6R et anti-IL-10R

#### 1. Conditions de culture

Ces quatre traitements sont réalisés en parallèle sur splénocytes de 5 souris *Myd88<sup>L252P</sup>* remis en culture en RPMI complet\*\*\* à 5M de cellules / mL. Les concentrations suivantes sont respectivement utilisées : Ibrutinib® : 40 µM ; anti-PD-1 : 20 µg/mL ; anti-IL-6R : 50 µg/mL ; anti-IL-10R : 20 µg/mL. Les cultures sont réalisées sur 72h en plaques 12 puits.

#### 2. Incorporation de l'EdU

L'EdU est rajouté dans chaque puit la veille des marquages (concentration finale de 50 µM). Les marquages suivants sont réalisés :

- Un marquage membranaire révélant l'expression de PD-L1 chez les cellules du lignage B est réalisé sur 1 million de cellules de chaque condition.
- Un marquage des marqueurs d'épuisement PD-1, CTLA-4, TIM-3 et LAG-3 est réalisé sur 1 million de cellules pour révéler l'expression de ces marqueurs à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.
- Les marquages membranaires CD19, CD4 et CD8 sont effectués en premier, puis l'incorporation de l'EdU est révélée grâce au kit « *In vivo* EdU BC647-IV-FC-S, Merck®.

L'ensemble des panels d'anticorps utilisés est détaillé en **Table 4**.

### B. Traitement in vivo Ibrutinib®

#### 1. Préparation de la solution d'Ibrutinib®

Ce traitement est réalisé sur une cohorte de 10 souris *Myd88<sup>L252P</sup>* et 6 souris *Cd19<sup>cre</sup>* pendant 42 jours. L'Ibrutinib® est administré dans l'eau de boisson, les biberons sont changés 2 fois par semaine est la solution d'Ibrutinib® est préparée comme suit : une gélule d'Ibrutinib® (140 mg) est vidée dans 80 mL de solution de 2-hydroxypropyl-β cyclodextrine 10X tamponnée à pH=1,6, le tout est mis sous agitation pendant 1h. Après incubation, le pH de la solution est remonté à environ 7, elle constitue la solution stock 10X. Chaque biberon de 100 mL contient 10 mL de solution 10X d'Ibrutinib® + 10 mL de solution de glucose 10% (préparée à partir de D-glucose 45% #G8769, Sigma®) + 80 mL H<sub>2</sub>O utrapure.

#### 2. Suivi de la taille des rates

La taille des rates de nos animaux est suivie au cours du traitement. Une mesure est réalisée avant le début du traitement, et une seconde est réalisée à J26. Pour mesurer les rates, 100 µL de produit de contraste (Exitron Nano 12000, Miltenyi®) sont injectés en intraveineux à chaque animal. Après 10 minutes d'incubation, les animaux sont anesthésiés à l'Isoflurane 3% pendant environ 5 minutes puis une acquisition est réalisée au scanner CT

du pôle animalerie de la plateforme Biscem de Limoges. Les images sont analysées grâce au logiciel pi.MOD.

### C. Traitements anti-PD-L1 *in vivo*

Un traitement anti-PD-L1 est réalisé sur une cohorte de 3 souris *Myd88<sup>L252P</sup>* + 2 souris *Cd19<sup>cre</sup>*. 200 µg d'anti-PD-L1 (#BE0101, InVivoMab®) sont injectés en intra-péritonéal à chaque animal, tous les 4 jours sur une durée totale de 20 jours. 2 souris *Myd88<sup>L252P</sup>* sont injectées de la même manière avec le contrôle isotopique rat IgG2b (#BE0090, InVivoMab®) en guise de contrôles. La taille des rates est mesurée *in vivo* avant et après le traitement en scanner CT.

**Tableau 4 : Liste des panels d'anticorps utilisés pour l'analyse des traitements *ex vivo***

Marqueur	Fluorochrome	Clone	Fournisseur
<b>Panel PD-L1 Différenciation B</b>			
B220	BV785	RA3-6B2	Biologend
CD19	BV510	1D3	BD
CD138	APC R700	281-2	BD
PD-L1	PE	10F.9G2	Biologend
Viakrome 808		/	Beckman Coulter
<b>Panel T épuisés</b>			
CD4	Vioblue	REA604	Miltenyi
CD8	APC Vio770	REA601	Miltenyi
CD3	PE Vio770	REA641	Miltenyi
CD45	PerCP Vio700	REA737	Miltenyi
PD-1	PE	REA802	Miltenyi
CTLA-4	PE Vio615	REA984	Miltenyi
TIM-3	APC	REA602	Miltenyi
LAG-3	BV711	C9B7W	Biologend
Viakrome 808		/	Beckman Coulter
<b>Panel EdU</b>			
EdU	APC	/	Merck
CD4	Vioblue	REA604	Miltenyi
CD19	BV510	1D3	BD
CD8	Viogreen	53-6.7	Miltenyi

## Chapitre IV. Etude de l'expression de PD-L1 par les exosomes circulants

---

### **A. Isolation des microvésicules circulantes**

Le kit « total exosomes isolation kit » (#4484450, Invitrogen®) est utilisé pour extraire les exosomes à partir de 200 µL de plasma récupéré avant sacrifice des animaux sur tube EDTA. Les plasmas sont centrifugés 20 min à 2000g puis 20 min à 10 000g, puis 0,5 volumes de PBS 1% sont ajoutés. Après ajout de 0,2 volumes de réactif de précipitation, les échantillons sont incubés 10 min à TA. Les tubes sont centrifugés 5 min à 10 000g, le surnageant est éliminé et le culot contenant les microvésicules est repris dans 100 µL de PBS filtré.

La concentration et la taille des particules est évaluée grâce à la technologie Nanosight (Malven Panalytical®).

### **B. Western Blot sur vésicules isolées**

Un Western Blot est réalisé sur les microvésicules extraites du plasma de 5 souris *Myd88<sup>L252P</sup>* et 5 souris *Cd19<sup>cre</sup>*. Pour chaque échantillon,  $10 \cdot 10^9$  particules sont lysées en tampon RIPA 1X final sur glace pendant 15 minutes (à partir de tampon RIPA 10X #9806, Cell Signaling). Les échantillons sont migrés en gel d'acrylamide 12% puis transférés sur membrane. Les anticorps primaires anti-Alix (Ac monoclonal de lapin #92880, Cell Signaling®) et -anti PD-L1 (Ac monoclonal de lapin #ab213480, Abcam®) sont dilués respectivement au 1/1000<sup>ème</sup> en BSA 3% et incubés sur la nuit à 4°C. les anticorps secondaires GAR « Goat Anti Rabbit » sont dilués au 1/5000<sup>ème</sup> et incubés 1 heure à TA. Les marquages sont quantifiés grâce à la technologie « Stain free » de Biorad®.

## Chapitre V. Techniques d'imagerie

---

### A. Immunohistochimie

Les marquages immunohistochimiques sont réalisés sur coupes de tissus inclus en paraffine. L'inclusion des tissus, les coupes, les colorations HES et les marquages Mouse Ig sont réalisés par le service d'anatomopathologie du CHU de Limoges.

Pour les marquages anti-CD3, le kit de marquage « Zytochem Plus HRP-DAB kit Rabbit » (#HRP008 DAB-RAB, Zytomed®) est utilisé. Les lames sont déparaffinées et réhydratées en bains successifs de xylène et d'éthanol, les antigènes sont révélés en chauffant 4 x 5min40 en tampon citrate pH6 et l'anticorps primaire anti-CD3 murin (#ab16669, Abcam®) dilué au 1/200<sup>ème</sup> est incubé 1h à TA dans le noir. Les peroxydes endogènes sont bloqués pendant 15 min, puis l'anticorps secondaire est incubé à TA dans le noir pendant 30 min. Le substrat de la HRP (DiaminoBenzydine, DAB) est ajouté pour révéler le marquage puis les lames sont contre-colorées à l'hématoxyline, déshydratées, montées et scannées au Nanozoomer®. Les marquages sont analysés et quantifiés grâce au logiciel QPath.

### B. Immunofluorescence

Les marquages immunofluorescents sont réalisés sur coupes de tissus de 8 µm réalisées au cryostat à partir de bloc congelés en OCT. Les lames sont fixées à l'acétone froid (-20°C) pendant 20 minutes, puis les coupes sont saturées en PBS 3% BSA pendant 45 minutes. Le mix de marquage contient les anticorps B220-FITC (REA755, Miltenyi®) et CD3-PE (REA641, Miltenyi®) dilués respectivement au 1/100<sup>ème</sup> et 1/167<sup>ème</sup> ; il est incubé toute la nuit à 4°C dans le noir. Le lendemain, le marquage DAPI est réalisé à partir de solution 1000X (#564907, BD®) par incubation de 5 min par lame. Les lames sont montées puis scannées au microscope à épifluorescence (Nikon NiE, Nikon®). Les marquages sont analysés et quantifiés grâce au logiciel QPath.

### Tests statistiques

Les tests statistiques sont calculés grâce au logiciel Graphpad Prism version 9.0. Les tests réalisés ici sont des tests non-appariés non paramétriques dits de Mann et Whitney. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p < 0.0001$ .

\* Les lavages sont tous réalisés en MACS buffer (Miltenyi®).

\*\* Sauf mention spéciale, les centrifugations sont réalisées pendant 5 minutes à 1200 rpm.

\*\*\* Le milieu de culture complet est un milieu RPMI 1640 ,10% SVF décomplémenté, 1% acides aminés non-essentiels, 1% pyruvate, 1% vitamines, 1% pénicilline/streptomycine, 1% glutamine et 0,001% β-mercaptoéthanol.



# Résultats

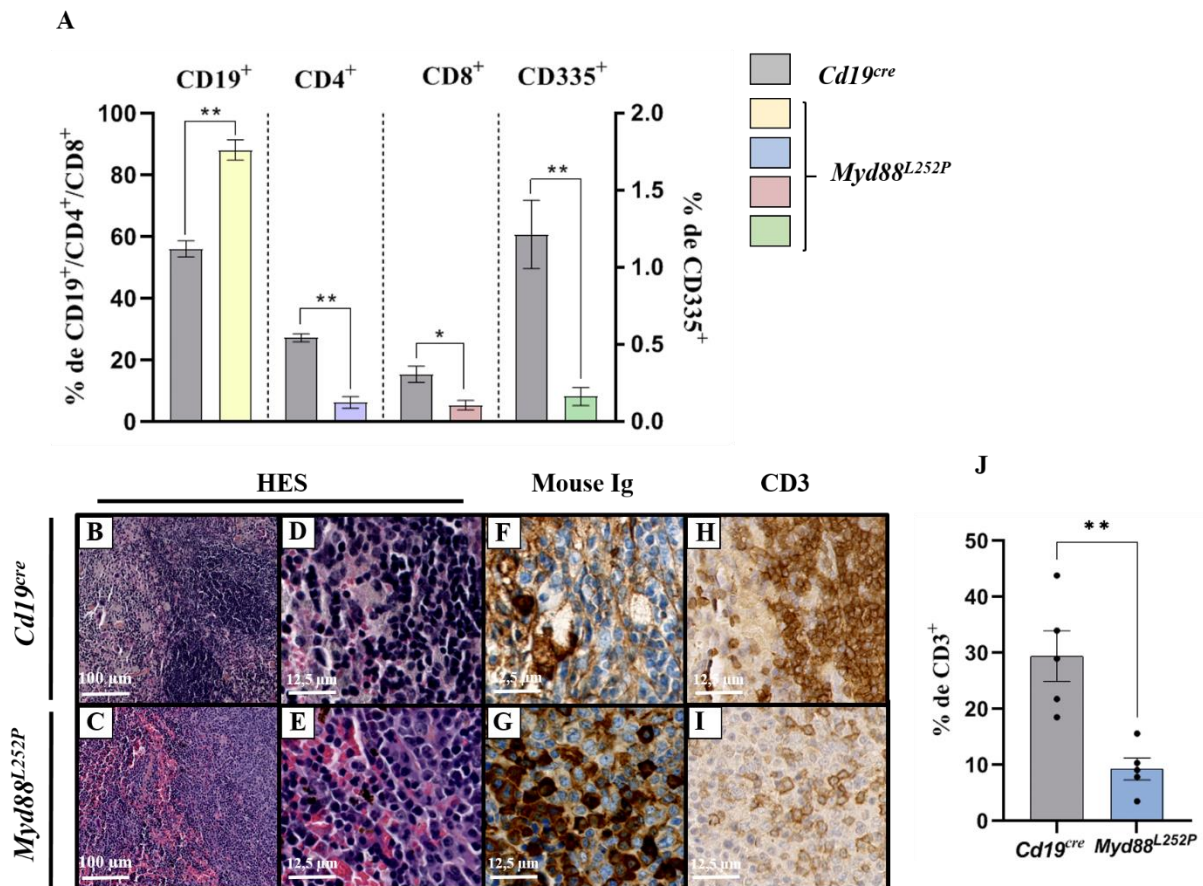
---

## Chapitre I. Echappement immunitaire et maladie de Waldenström

### A. Dérégulation des populations lymphocytaires

Afin d'étudier le micro-environnement immunitaire tumoral, nous avons, dans un premier temps, regardé par cytométrie en flux les proportions de lymphocytes B, lymphocytes T et cellules NK dans les rates de souris *Myd88<sup>L252P</sup>* âgées de 9 à 10 mois. Comparativement aux animaux contrôles (*Cd19<sup>cre</sup>*), nous confirmons dans les tumeurs une augmentation de la proportion des LB CD19<sup>+</sup> qui représentent 90% des lymphocytes de la rate contre 60% en temps normal. Associé à ce phénomène nous observons une forte diminution des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> d'un facteur 5 environ, accompagnée d'une disparition quasi complète des cellules NK CD335<sup>+</sup> (Figure 47A).

En immunohisto-chimie, la coloration HES (Hématoxyline, Eosine, Safran) associée au marquage des immunoglobulines murines (Mouse Ig) confirme ce qui avait été démontré préalablement par C. Ouk *et al.*, lors de la caractérisation du modèle, à savoir une



**Figure 47 : Dérégulation des populations lymphocytaires spléniques**

**A** : Par cytométrie en flux, les proportions spléniques de LB (CD19<sup>+</sup>) LT CD4 (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) CD8 (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) et NK (CD335<sup>+</sup>) sont comparées entre tumeurs de souris *Myd88<sup>L252P</sup>* et rates saines.

**B – E** : coloration HES sur coupe de rate incluse en paraffine. **F et G** : marquage des immunoglobulines murines sur coupe de rate incluse en paraffine. **H et I** : marquage anti-CD3 sur coupes de rates incluses en paraffine. **J** : comparaison statistique des proportions de marquage CD3<sup>+</sup> positif entre rates contrôles et tumorales. n = 5.

destruction de la rate associée à une augmentation du nombre de lymphoplasmocytes (**Figure 47 B-G**). A présent, nous confirmons, avec le marquage des LT via un anticorps anti-CD3, la diminution de cette population qui ne représente plus que 10% des cellules de la rate, en accord avec les résultats obtenus en cytométrie en flux (**Figure 47 H-J**).

La forte augmentation des lymphoplasmocytes associée à la diminution des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> nous pousse à étudier plus précisément ces populations lymphocytaires du point de vue de la réponse immune anti-tumorale.

## **B. Les LB tumoraux ont un phénotype immunomodulateur**

L'analyse des cellules B tumorales montre une activité anormale de celles-ci puisqu'elles surexpriment les marqueurs d'activation CD80 et CD86 (**Figure 48 A et B**). De plus, nous avons analysé par cytométrie en flux l'expression de deux molécules fortement impliquées dans le contrôle de la réponse immune anti-tumorale : le point de contrôle immunitaire bien connu PD-L1 ; ainsi que le complexe CMH classe II qui permet la présentation de l'antigène aux LT.

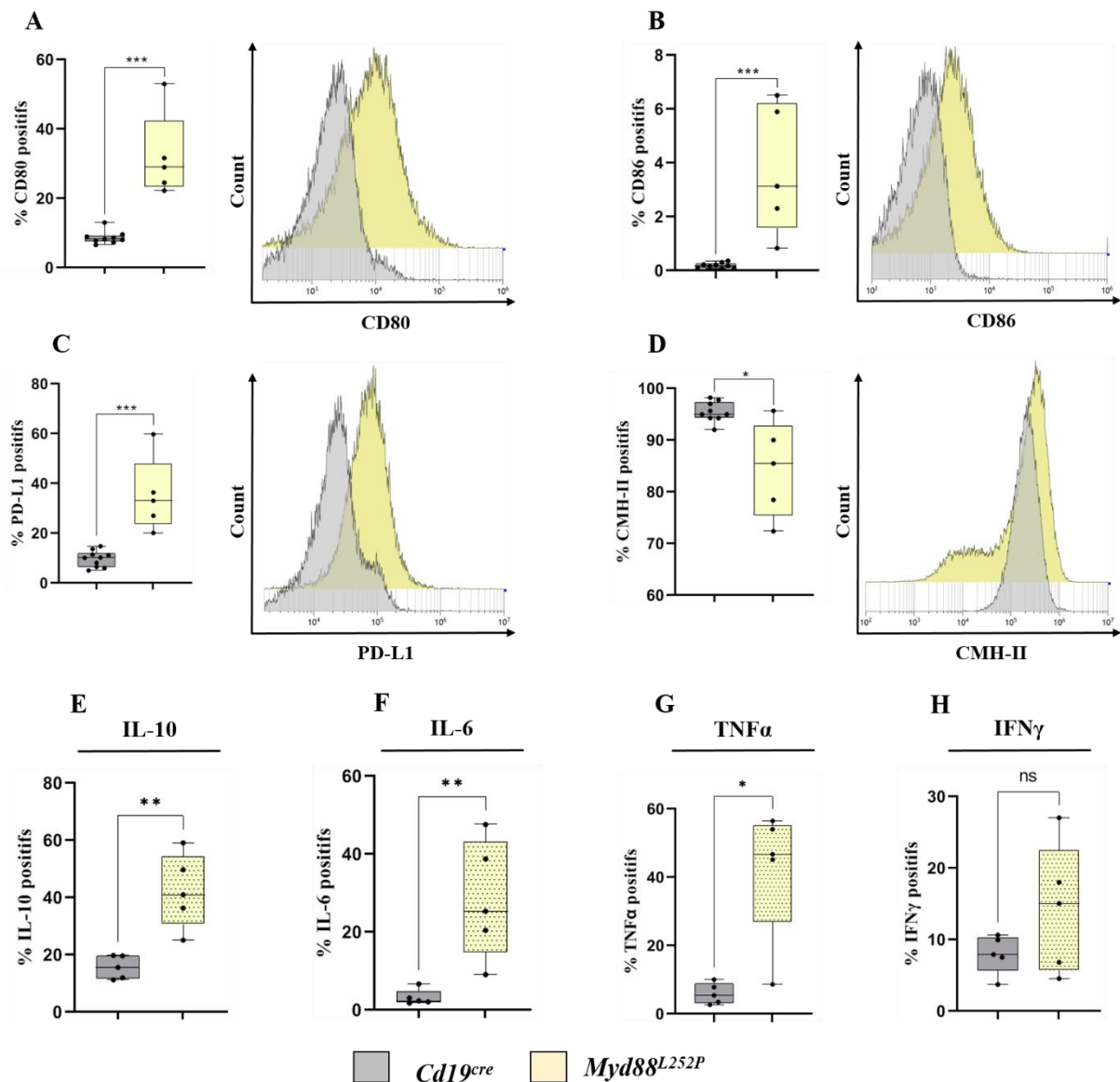
Il en résulte que les LB tumoraux surexpriment PD-L1, puisque 40% d'entre eux l'expriment en moyenne contre 10 pour des LB normaux (**Figure 48 C**). Cette surexpression de PD-L1 est confirmée en IHC et en Western Blot (**Annexe 3**). Ce Western blot réalisé sur LB triés montre plusieurs formes de PD-L1 : une forme à 35 kDa et une forme à 55 kDa. La forme à 55 kDa correspond à la protéine PD-L1 glycosylée. La glycosylation de PD-L1 permet en effet de stabiliser la protéine à la membrane. De plus, les LB porteurs de la mutation *L252P* de *MYD88* perdent partiellement l'expression du CMH classe II (**Figure 48 D**).

Enfin, nous avons également caractérisé la sécrétion cytokinique de ces cellules par cytométrie en flux. Il en résulte que nous retrouvons une sécrétion accrue d'IL-10, IL-6 et TNF $\alpha$ , ce qui vient bien démontrer que les LB spléniques porteurs de la mutation *L252P* de *MYD88* ont un phénotype immunosuppresseur et inflammatoire. En revanche nous avons constaté une augmentation de sécrétion d'IFN $\gamma$  mais celle-ci n'est pas significative par rapport aux contrôles *Cd19<sup>Cre</sup>*. (**Figure 48 E-H**).

## **C. Une réponse T anti-tumorale a bien été initiée**

Puisque les cellules B tumorales ont un phénotype immunosuppresseur, nous avons émis l'hypothèse que cela pouvait avoir un impact sur la réponse immune T anti-tumorale dans nos souris. Dans un premier temps nous avons analysé par immunofluorescence la distribution spatiale des LT et des LB dans la rate en comparant les tumeurs de souris *Myd88<sup>L252P</sup>* à des rates normales. Les LB sont révélés en vert par le marquage B220-FITC et les LT en rouge avec le marquage CD3-PE. En contexte normal, on remarque que les LB et LT se situent dans des zones très proches mais distinctes, ils ne se mélangent pour ainsi dire pas (**Figure 49 B-D**). Dans les tumeurs en revanche, la distribution des cellules B et T est désorganisée laissant supposer une migration des LT vers la zone tumorale. (**Figure 49 F-H**).

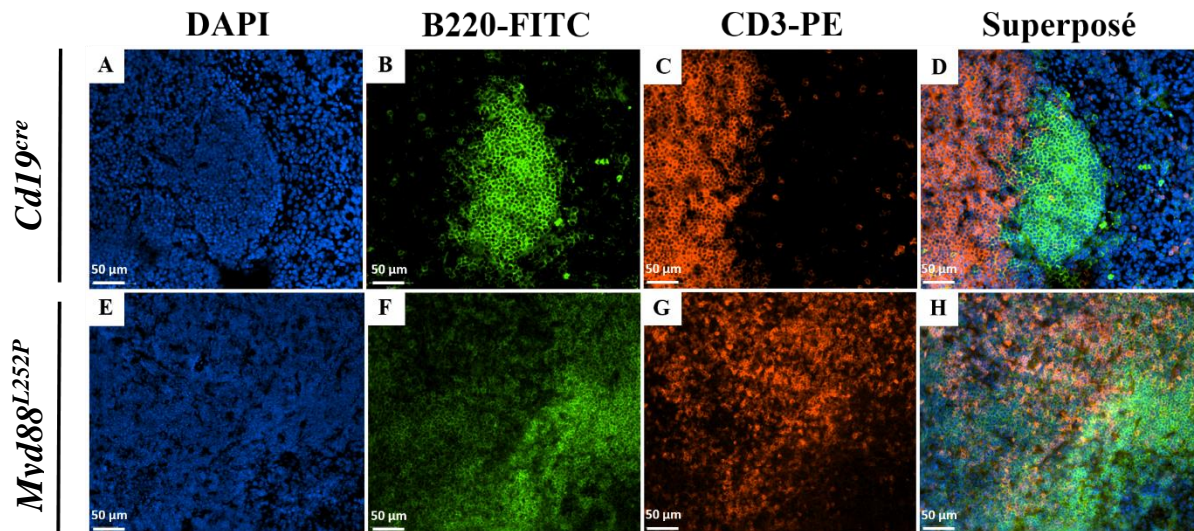
Etant donné la proximité entre les LT et les cellules tumorales, nous avons caractérisé plus précisément les populations T CD4 et CD8 par cytométrie en flux. Le double marquage CD44-CD62L réalisé sur les LT CD4 et CD8 permet de distinguer 3 sous-populations : les LT naïfs (CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>), les LT mémoires (CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>) et les LT effecteurs (CD62L<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup>). Dans



### Figure 48 : Phénotype immunosuppresseur des lymphocytes B tumoraux

**A :** Expression de surface du marqueur CD80 (% de cellules positives et MFI). **B :** Expression de surface du marqueur CD86 (% de cellules positives et MFI). **C :** Expression de surface du marqueur PD-L1 (% de cellules positives et MFI). **D :** Expression de surface du marqueur MHC-II (% de cellules positives et MFI). **E à H :** Analyse du taux de LB sécrétant les cytokines IL-10, IL-6, TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$ . Les cellules sont cultivées *ex vivo* en présence de PMA/Ionomycine + Brefeldine A + Monensine pendant 6 heures puis un marquage intra-cellulaire des cytokines est analysé en cytométrie de flux. *Cd19<sup>cre</sup>* n = 10 ; *Myd88<sup>L252P</sup>* n = 5.

les tumeurs, nous remarquons aussi bien pour les LT CD4<sup>+</sup> que CD8<sup>+</sup> une diminution des populations de LT naïfs et mémoires au profit des effecteurs qui augmentent fortement (**Figure 50 A et B**). Cette augmentation des LT effecteurs est associée à une activation des populations CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, révélée par l'augmentation de l'expression des marqueurs CD134 et CD137 (**Figure 50 C**).



**Figure 49 : Distribution spatiale des lymphocytes B et T dans la rate**

Marquage immunofluorescent réalisé sur coupes de rates congelés en OCT. **A et E** : Contre-coloration des noyaux cellulaires au DAPI. **B et F** : Marquage B220-FITC. **C et G** : Marquage CD3-PE. **D et H** : Superposition des 3 canaux (DAPI + FITC + PE).

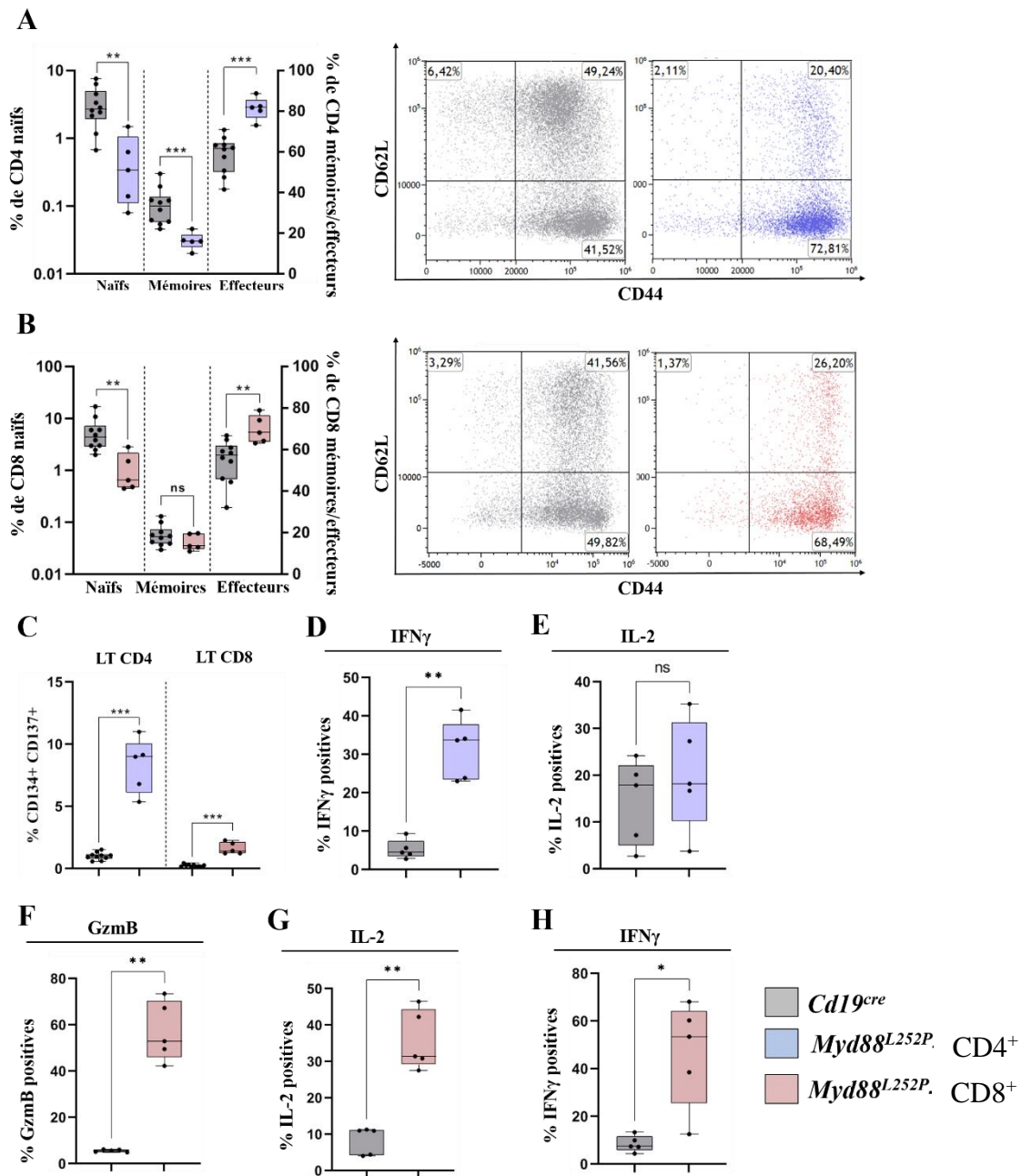
Enfin au niveau fonctionnel, la forte augmentation de la sécrétion d'IFN $\gamma$  des LT CD4<sup>+</sup> indique une polarisation Th1, sans qu'ils ne semblent exprimer pour autant plus de cytokine activatrice IL-2 (**Figure 50 D et E**). Pour ce qui est des LT CD8<sup>+</sup>, ils expriment quant à eux d'importantes quantités d'IL-2 et d'IFN $\gamma$  et ils produisent également plus de molécules cytotoxiques de type granzyme B (**Figure 50 F-H**).

Ces résultats montrent qu'une réponse T anti-tumorale a bien été initiée à un moment donné, puisque les LT CD4<sup>+</sup> comme CD8<sup>+</sup> présentent des signes d'activation telles que l'augmentation des sous-population effectrices, la polarisation Th1 ou encore la sécrétion de cytokines activatrices (IL-2) et cytotoxiques (granzyme B).

#### **D. Les lymphocytes T possèdent un phénotype épuisé**

Dans notre modèle de développement de la MW, nous avons jusqu'à présent montré que la réponse immune anti-tumorale a été initiée au regard du niveau d'activation des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Pourtant, on retrouve une chute importante de la proportion de LT dans les tumeurs qui quant à elles continuent de se développer. Tout ceci suggère que la réponse immune mise en place est stoppée et qu'un épuisement des LT pourrait expliquer cet échec de réponse. Afin d'identifier ce phénomène, l'expression de surface des quatre principaux marqueurs d'épuisement connus des LT (PD-1, CTLA-4, TIM-3 et LAG-3) est analysée.

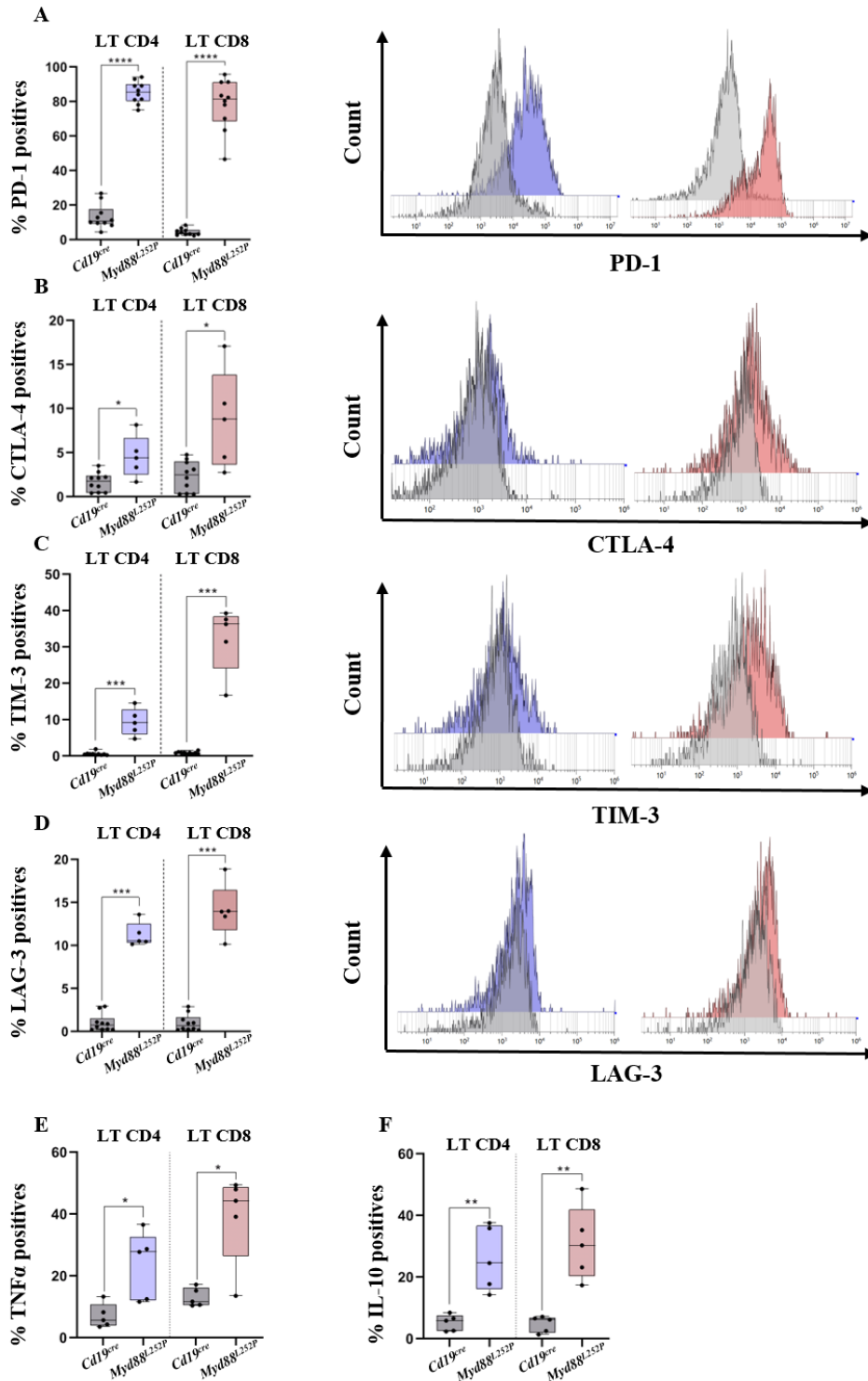
La surexpression de PD-1 est très flagrante à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> puisque, dans les tumeurs, 90% des cellules l'expriment contre 15% et 5% pour les CD4<sup>+</sup> et les CD8<sup>+</sup> de souris *Cd19<sup>cre</sup>*. L'expression de CTLA-4 est plus hétérogène mais on retrouve malgré tout une surexpression aussi bien à la surface des CD4<sup>+</sup> que des CD8<sup>+</sup>. Enfin, les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont



**Figure 50 : Caractérisation de la réponse T anti-tumorale au niveau cellulaire**

**A** : Distribution des sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> naïves (CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>), mémoires (CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>) et effectrices (CD62L<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup>) en cytométrie de flux. **B** : idem pour les LT CD8<sup>+</sup>. **C** : Niveau d'activation des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> via analyse de l'expression des marqueurs CD134 et CD137 en cytométrie de flux. **D-H** : Analyse de l'expression de différentes cytokines (IFN $\gamma$ , IL-2 et GzmB) en cytométrie de flux. Les splénocytes sont cultivés en présence de PMA/Ionomycine + Brefeldine A + Monensine avant analyse. *Cd19<sup>cre</sup>* n = 10 ; *Myd88<sup>L252P</sup>* n = 5.

bien plus nombreux à exprimer TIM-3 et LAG-3 dans la tumeur que dans le tissu sain où ils ne sont par ailleurs pratiquement pas exprimés (**Figure 51 A-D**).



**Figure 51 : Caractérisation du phénotype épuisé des lymphocytes T**

**A** : Expression de surface de PD-1 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. **B** : Expression de surface de CTLA-4 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. **C** : Expression de surface de TIM-3 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. **D** : Expression de surface de LAG-3 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. **E et F** : Analyse du taux de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sécrétant les cytokines TNFα et IL-10. Les cellules sont cultivées *ex vivo* en présence de PMA/Ionomycine + Brefeldine A + Monensine pendant 6 heures puis un marquage intracellulaire des cytokines est analysé en cytométrie de flux. *Cd19<sup>cre</sup>* n = 10 ; *Myd88<sup>L252P</sup>* n = 5.

Qui plus est, l'analyse de la sécrétion de cytokines nous a permis de mettre en évidence une surexpression de TNF $\alpha$  (**Figure 51 E**) et d'IL-10 (**Figure 51 F**) de la part des LT aussi bien CD4 $^+$  que CD8 $^+$ .

Ces résultats montrent la présence d'un phénomène d'épuisement des lymphocytes T CD4 $^+$  et CD8 $^+$  dans notre modèle de maladie de Waldenström. Cet épuisement empêche le bon fonctionnement de la réponse immune anti-tumorale et semble être pour partie provoqué par les cellules tumorales elles-mêmes qui présentent un phénotype immunosuppresseur.

### **E. Dérégulations de la population des lymphocytes T régulateurs**

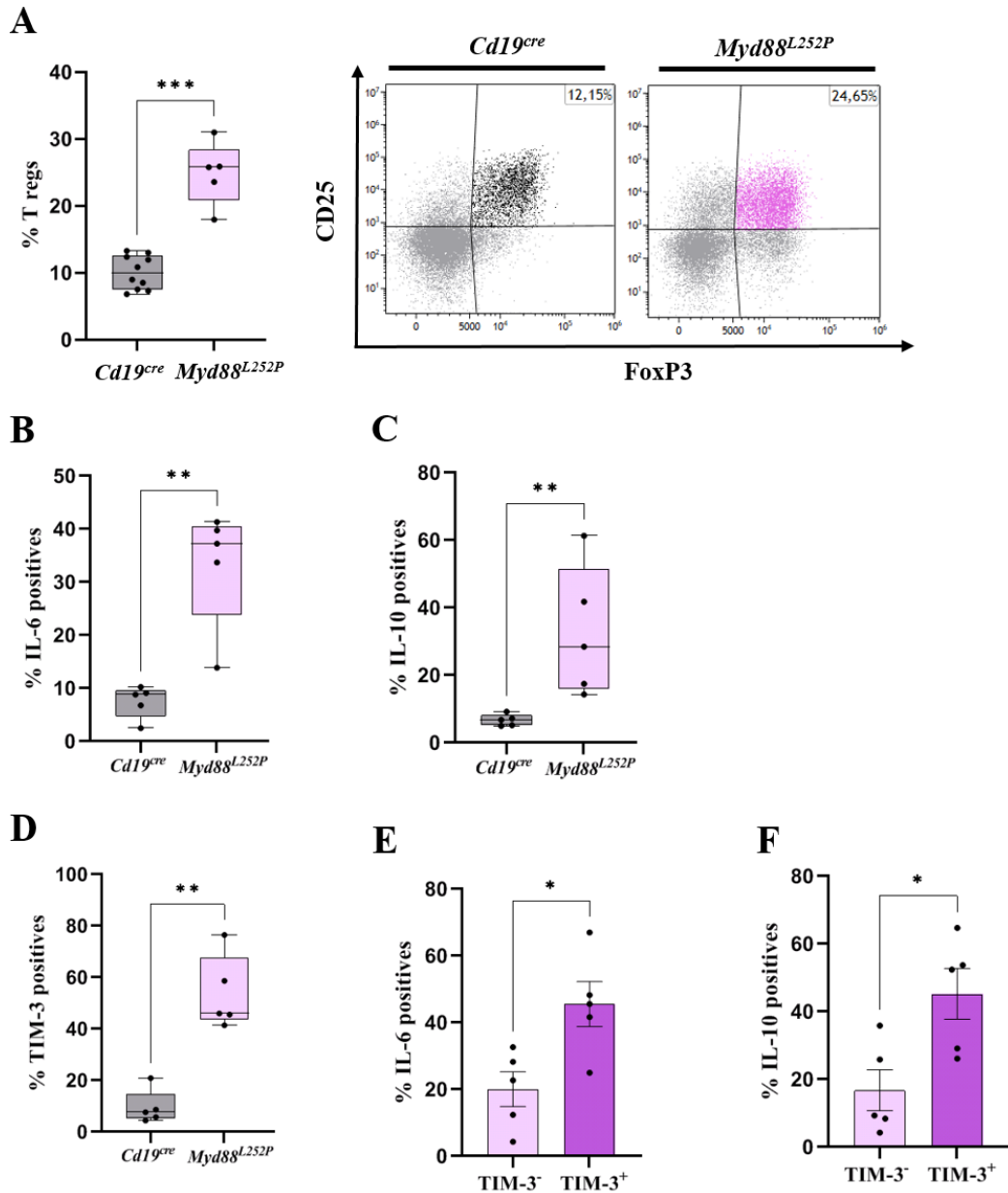
Etant connus comme étant des médiateurs puissants de l'inhibition de la réponse immune T, nous nous sommes à présent intéressés à la question de la présence ou non de lymphocytes T régulateurs dans les tumeurs de nos animaux. Les Tregs murins sont caractérisés par l'expression simultanée des marqueurs CD4, CD25 et FoxP3. Les cellules triples positives sont donc analysées par cytométrie de flux. Il en résulte que dans les tumeurs, nous retrouvons une proportion de lymphocytes Tregs supérieure à la normale (25% de Tregs parmi les CD4 $^+$  contre 10% pour une rate saine, **Figure 52 A**).

La population des Tregs étant augmentée, nous avons ensuite cherché à les caractériser plus précisément, toujours en cytométrie de flux. Le rôle premier des Tregs est d'inhiber la réponse immune T notamment en sécrétant des cytokines immunosuppressives. Ainsi, si les Tregs sécrètent en temps normal de l'IL-6 et de l'IL-10, nous démontrons que dans les tumeurs spléniques du modèle les Tregs surexpriment ces deux cytokines (**Figure 52 B et C**).

Enfin, nos résultats montrent que la proportion de Tregs qui expriment le marqueur TIM-3 est augmentée d'un facteur 5 à 6 dans les tumeurs, comparé à un tissu splénique normal (**Figure D**). De plus, les Tregs TIM-3 positifs sécrètent plus d'IL-6 et d'IL-10 que les Tregs TIM-3 négatifs (**Figure 52 E et F**).

A noter que ces travaux font l'objet d'une publication préliminaire dans BioRxiv (voir **Annexe 2**). Pour finaliser la caractérisation du microenvironnement, un RNAseq sur LB et LT CD4 $^+$  et CD8 $^+$  triés est en cours d'analyse.





**Figure 52 : Caractérisation des lymphocytes T régulateurs**

**A** : Pourcentage du nombre de Tregs CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> parmi les CD4 positifs. **B et C** : Analyse du taux de Tregs sécrétant les cytokines IL-6 et IL-10. Les cellules sont cultivées *ex vivo* en présence de PMA/Ionomycine + Brefeldine A + Monensine pendant 6 heures puis un marquage intra-cellulaire des cytokines est analysé en cytométrie de flux. **D** : Analyse du taux de Tregs exprimants le marqueur TIM-3. **E et F** : Comparaison du taux d'expression d'IL-6 et IL-10 entre Tregs TIM-3<sup>+</sup> et TIM-3<sup>-</sup> de souris *Myd88<sup>L252P</sup>*. *Cd19<sup>cre</sup>* n = 10 ; *Myd88<sup>L252P</sup>* n = 5.

## Chapitre II. Perspectives thérapeutiques liées à l'échappement immunitaire dans la maladie de Waldenström

### A. Traitement à l'Ibrutinib® *in vivo*

L'Ibrutinib® est un inhibiteur des lymphocytes B qui cible la protéine BTK. Son activité spécifique sur les LB en fait une des principales thérapies utilisées dans le traitement de la MW. Si l'effet direct de l'Ibrutinib® sur les tumeurs B n'est plus à prouver, nous avons également identifié des mécanismes anti-tumoraux indirects qui influent sur le micro-environnement immun tumoral.

#### 1. Protocole expérimental

Une cohorte de 10 animaux *Myd88<sup>L252P</sup>* et 6 animaux contrôles *Cd19<sup>cre</sup>* a été traitée à l'Ibrutinib® pendant 42 jours dans l'eau de boisson. Les animaux transgéniques traités présentaient tous une hypergammaglobulinémie monoclonale associée à une splénomégalie et étaient âgés de 9 à 11 mois.

A l'issue des 42 jours de traitement, parmi les 10 animaux traités on a pu distinguer 2 sous-groupes : un groupe qui semblait répondre favorablement à l'Ibrutinib®, alors que ce n'était pas le cas pour l'autre. Les critères de réponse/non-réponse sont précisés en **Tableau 5**.

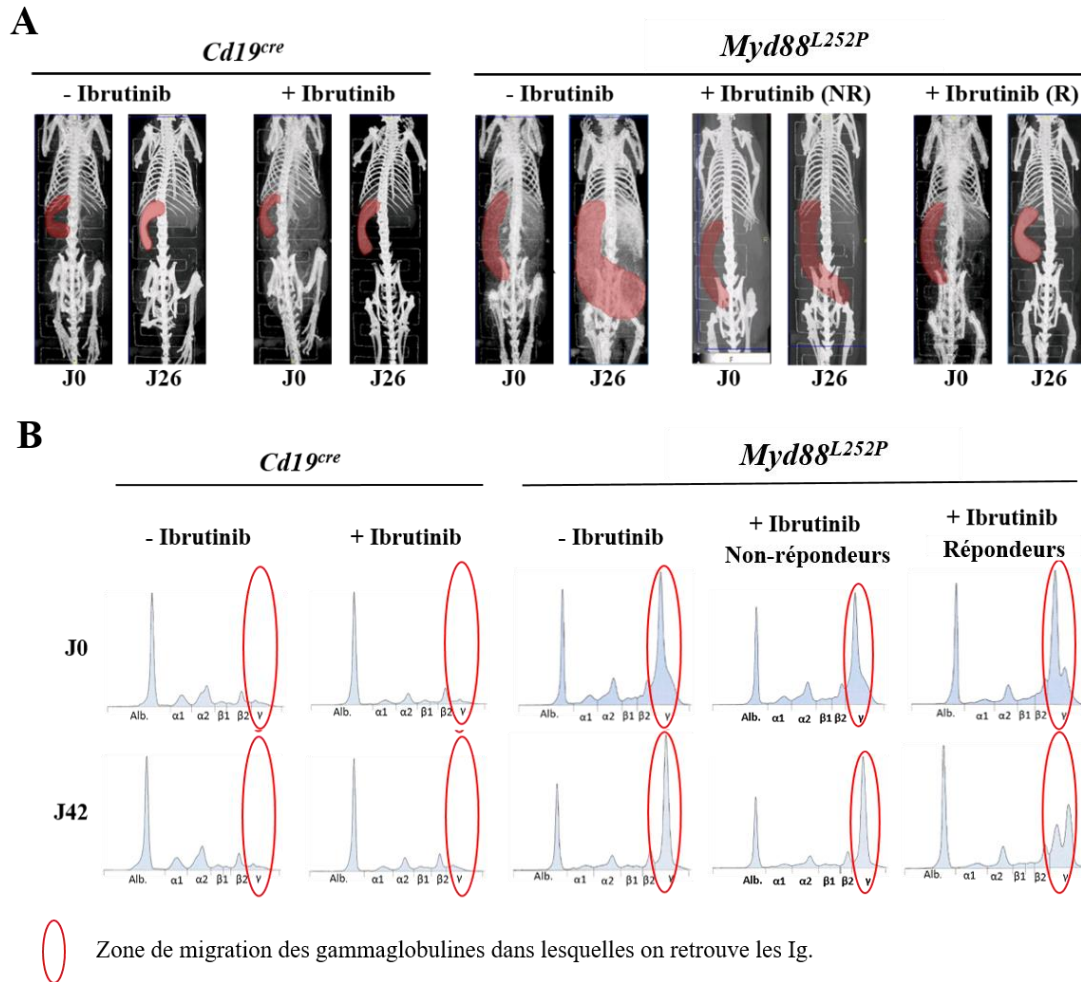
**Tableau 5 : Critères de réponse/non-réponse au traitement Ibrutinib®**

	Réponse favorable	Non-réponse
Taille de la rate	Réduction de plus de 10%	Augmentation ou réduction non significative (moins de 10%)
Pic d'Ig monoclonal	Augmentation du ratio A/G	Diminution ou ratio A/G équivalent
Survie au cours du traitement	Oui	Non

La taille des rates est mesurée avant et après traitement par imagerie CT, et le ratio Albumine/Gammaglobulines (A/G) est mesuré dans le sérum par électrophorèse des protéines sériques et comparé avant et après traitement (**Figure 53 A et B**). Les deux groupes répondeurs et non-répondeurs à l'Ibrutinib® sont composés chacun de 5 animaux, et seront distingués dans la suite de ce travail.

#### 2. Impact du traitement sur les lymphocytes B

Dans un premier temps, l'impact de l'Ibrutinib® sur les lymphocytes B tumoraux a été analysé. Nous confirmons que les tumeurs sont enrichies en LB IgM<sup>+</sup> comparés aux contrôles (46,15% contre 10,69%). Qui plus est, suite au traitement Ibrutinib® nous avons remarqué que la proportion de LB IgM<sup>+</sup> était augmentée, et que cette augmentation était d'autant plus prononcée chez les souris non-répondeuses au traitement vis-à-vis de celles qui y répondent (86,62% et 69,95% respectivement) (**Figure 54 A**).



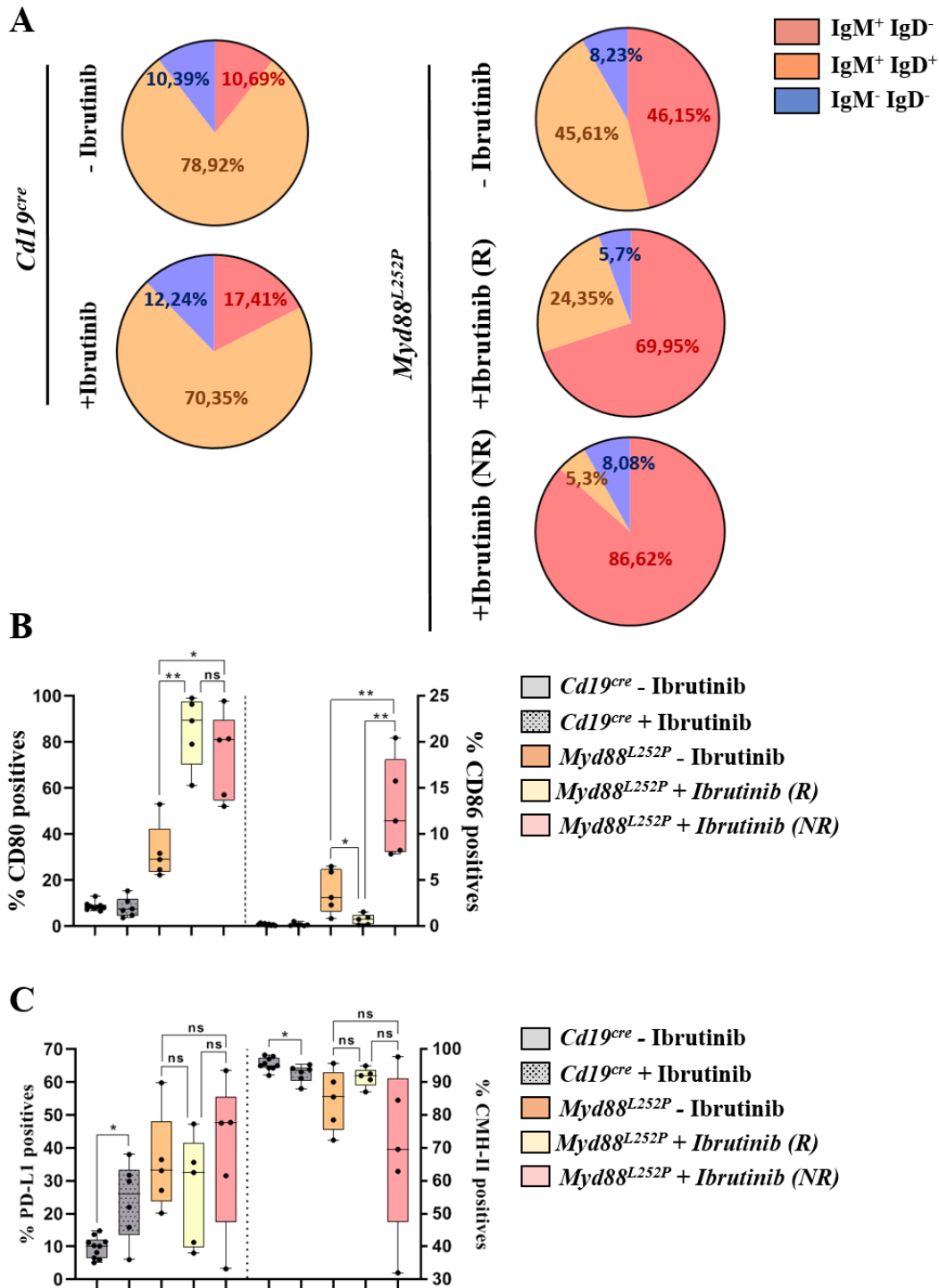
### Figure 53 : Techniques d'évaluation des critères de réponse/non-réponse à l'Ibrutinib®

**A** : La mesure de taille des rates a été réalisée sur animaux vivants. Sous anesthésie après injection d'un traceur non-radioactif les rates sont visualisées et mesurées par imagerie CT. **B** : Le ratio A/G est mesuré dans le sérum par électrophorèse des protéines sériques.

L'analyse du niveau d'activation de ces cellules nous démontre d'une part que l'expression de surface du CD80 est augmentée suite au traitement Ibrutinib® quel que soit le niveau de réponse ; et d'autre part, nous observons une chute de l'expression du CD86 dans le groupe répondeur alors qu'elle augmente sensiblement dans le groupe non-répondeur, comparé à la condition non-traitée (**Figure 54 B**). En revanche, l'Ibrutinib® n'apporte aucun effet bénéfique significatif sur la surexpression de PD-L1 ni la perte d'expression du CMH-II, quelle que soit la condition. A noter toutefois que traiter des animaux sains à l'Ibrutinib® entraîne la surexpression de PD-L1 et la perte d'expression du CMH-II à la surface des LB (**Figure 54 C**).

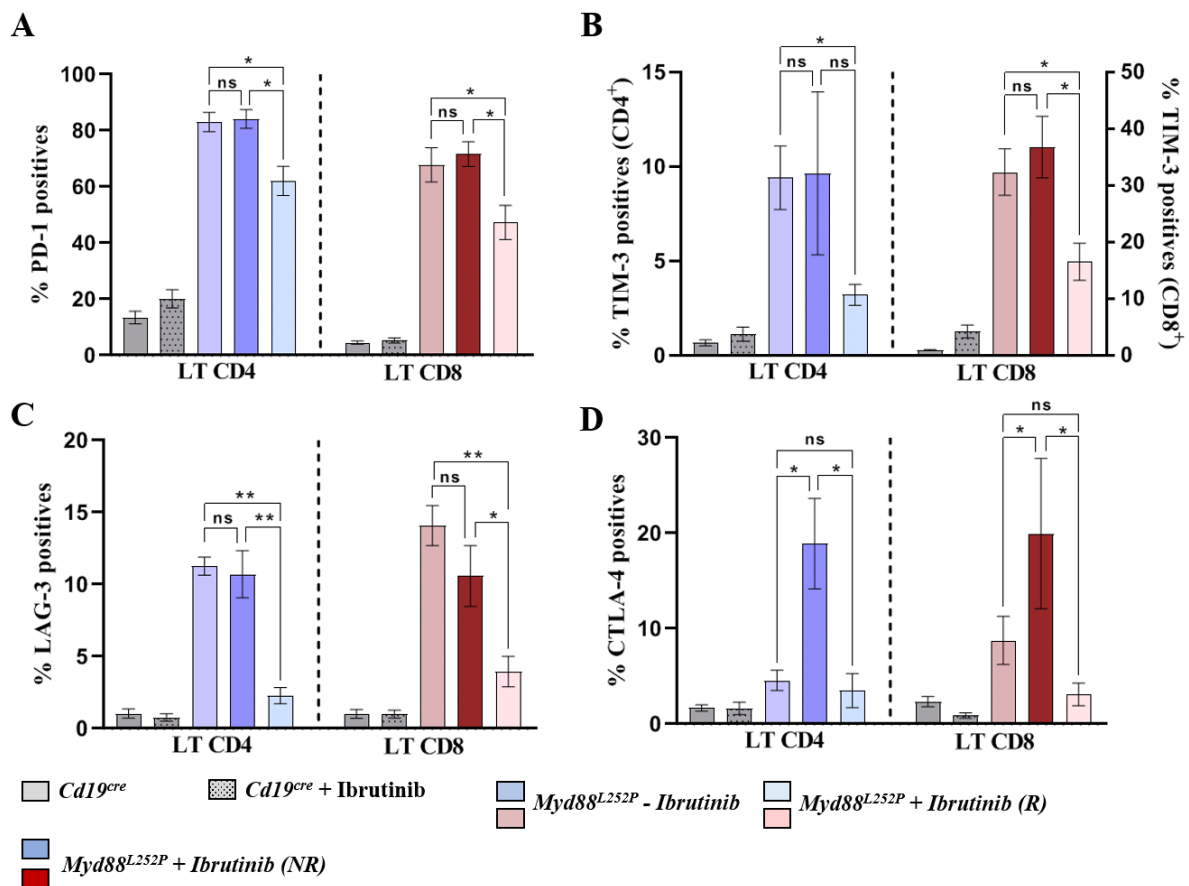
### 3. Impact du traitement sur l'épuisement des lymphocytes T

Dans un second temps, nous avons regardé l'impact éventuel du traitement à l'Ibrutinib® sur l'épuisement des LT. Il en ressort que l'Ibrutinib® induit une réduction de cet épuisement *in vivo*, avec, uniquement chez le groupe répondeur, une réduction de l'expression de surface des marqueurs PD-1, TIM-3 et LAG-3 au niveau des CD4<sup>+</sup> et des CD8<sup>+</sup> (**Figure 55 A-C**). De



manière intéressante, le traitement n'influence pas l'expression de surface de CTLA-4 chez les souris du groupe répondeur, alors que, chez le groupe non-répondeur, elle est fortement augmentée, aussi bien pour les CD4<sup>+</sup> que les CD8<sup>+</sup> (d'un facteur 4 et 2 respectivement) (**Figure 55 D**).

D'après ces résultats, l'Ibrutinib® semble être capable de restaurer du moins partiellement le phénomène d'épuisement des LT en réduisant l'expression des marqueurs PD-1, TIM-3 et LAG-3.



**Figure 55 : Effet de l'Ibrutinib® sur l'épuisement des lymphocytes T**

**A** : Taux d'expression de PD-1 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en fonction des différentes conditions. **B** : Taux d'expression de TIM-3 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en fonction des différentes conditions. **C** : Taux d'expression de LAG-3 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en fonction des différentes conditions. **D** : Taux d'expression de CTLA-4 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> en fonction des différentes conditions.  $Cd19^{cre}$  n = 10 ;  $Cd19^{cre} + Ibru$  n = 6 ;  $Myd88^{L252P}$ , R et NR n = 5.

### **B. Test d'une combinaison thérapeutique Ibrutinib® + anti-PD-1 ex vivo**

Etant donné la capacité de l'Ibrutinib® à reverser l'expression des marqueurs d'épuisement à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, nous avons souhaité tester *ex vivo* une combinaison associant l'Ibrutinib® à un anticorps ciblant un des marqueurs d'épuisement. TIM-3 et LAG-3 étant plus diminués et affectés par l'Ibrutinib®, nous avons supposé que les cibler aurait moins d'impact que d'inhiber PD-1 qui reste fortement exprimé malgré le

traitement à l'Ibrutinib®. Ainsi, afin de voir si l'effet de l'immunothérapie anti-PD-1 était capable de potentialiser l'efficacité de l'Ibrutinib®, des splénocytes de 5 souris *Myd88<sup>L252P</sup>* sont cultivés pendant 72h selon 3 conditions : non-traitées ; traitées à l'Ibrutinib® ou traitées avec la combinaison Ibrutinib® + anti-PD-1.

## **1. Effet de la combinaison thérapeutique sur les lymphocytes B**

La prolifération des lymphocytes B a d'abord été comparée entre les trois conditions non traitée, traitée à l'Ibrutinib® et traitée à la combinaison Ibrutinib® + anti-PD-1. Pour se faire, le contenu en ADN (marqueur 7AAD) et l'intégration du marqueur de prolifération EdU sont analysés. On peut d'abord remarquer que le taux de lymphocytes B en phase de synthèse de l'ADN (phase S du cycle cellulaire) chute fortement lorsque les cellules sont cultivées en présence d'Ibrutinib®. De plus la combinaison thérapeutique ne semble pas apporter d'effet supplémentaire. Le taux de cellules en phase G0/G1 et G2/M quant à lui ne varie pas quelle que soit la condition (**Figure 56 A-D**).

Le taux de lymphocytes B exprimant PD-L1 est également analysé en fonction des 3 conditions afin de déterminer l'impact que peuvent avoir ces traitements *ex vivo* sur l'expression de surface de la molécule. Un marquage ciblant les molécules B220 et CD138 permet de discriminer les lymphocytes B (B220<sup>+</sup> CD138<sup>-</sup>) des plasmablastes (B220<sup>+</sup> CD138<sup>+</sup>) et des plasmocytes (B220<sup>-</sup> CD138<sup>+</sup>) à partir d'une population CD19<sup>+</sup>.

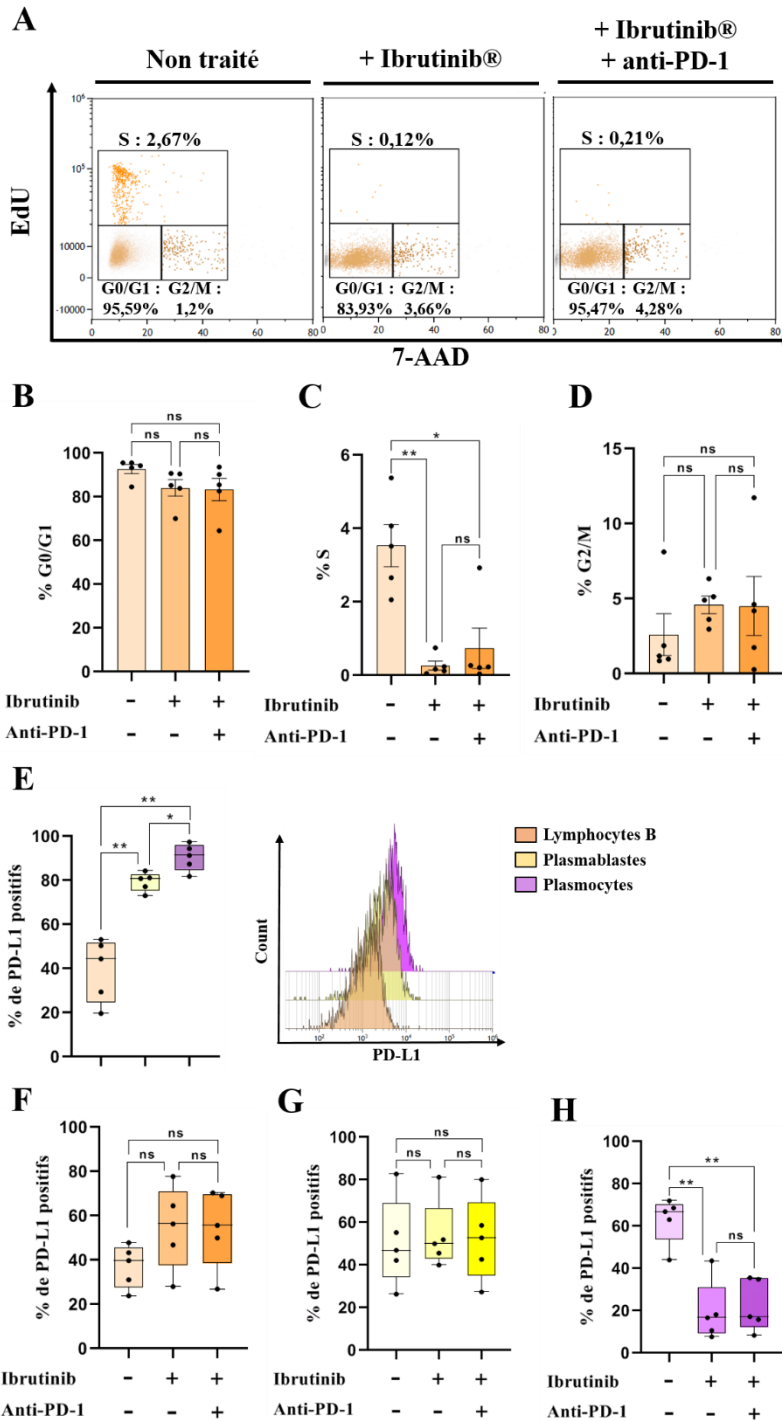
Ce que nous remarquons dans un premier temps, c'est que l'expression de PD-L1 semble d'autant plus accrue que les cellules sont avancées dans le processus de différenciation B. Ainsi en moyenne 50% des LB expriment PD-L1, alors que 80% des plasmablastes et 90% des plasmocytes l'expriment à leur surface (**Figure 56 E**).

Dans un second temps si nous comparons l'expression de PD-L1 de chacune de ces populations indépendamment en fonction des trois conditions de traitements, on peut observer que l'expression de PD-L1 ne varie pas à la surface des LB et des plasmablastes qu'ils soient en présence de molécules thérapeutiques ou non (**Figure 56 F et G**). En revanche, pour les conditions Ibrutinib® et Ibrutinib® + anti-PD-1 on observe une diminution d'un facteur 3 du taux de plasmocytes exprimant PD-L1, bien qu'il ne semble pas y avoir de différence notable d'expression entre ces deux conditions (**Figure 56 H**).

Durant les 72h de traitement *ex vivo* nous avons pu mettre en évidence une diminution du taux de prolifération des lymphocytes B d'une part, et d'autre part nous avons démontré que parmi la population lymphoplasmocytaire ce sont majoritairement les plasmocytes qui surexpriment PD-L1. De plus, ce sont les seules cellules dont l'expression de PD-L1 est sensible aux traitements. Nous ne remarquons toutefois pas d'apport particulier de l'anti-PD-1 par rapport à l'Ibrutinib® seul.

## **2. Effet de la combinaison thérapeutique sur les lymphocytes T**

Après avoir regardé ce qu'il se passait au niveau des LB lors de traitement Ibrutinib® + anti-PD-1, nous nous sommes à présent intéressés aux lymphocytes T. En ce qui concerne les LT CD4<sup>+</sup>, nous remarquons que le nombre de cellules en cours de prolifération est extrêmement faible dans les tumeurs de souris *Myd88<sup>L252P</sup>* puisque seuls 0,3% et 2% sont respectivement retrouvées en phase S et G2/M du cycle cellulaire. Cependant, il est



**Figure 56 : Effet de la combinaison Ibrutinib®+anti-PD-1 sur les lymphocytes B ex vivo**

**A** : Exemple de marquage EdU/7AAD sur les lymphocytes B CD19<sup>+</sup>, selon les 3 conditions Myd88<sup>L252P</sup> non traités, traités Ibrutinib® et traitées Ibrutinib®+anti-PD-1. **B** : Taux de lymphocytes B en phase G0/G1 (EdU-7AAD<sup>-</sup>). **C** : Taux de lymphocytes B en phase S (EdU+7AAD<sup>+/+</sup>). **D** : Taux de lymphocytes B en phase G2/M (EdU-7AAD<sup>+</sup>). **E** : Taux de cellules exprimant PD-L1 comparé entre lymphocytes B (CD19<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> CD138<sup>-</sup>), plasmablastes (CD19<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> CD138<sup>+</sup>) et plasmocytes (CD19<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> CD138<sup>+</sup>). **F** : Taux de lymphocytes B exprimant PD-L1 en fonction des 3 conditions traitées ou non. **G** : Taux de plasmablastes exprimant PD-L1 en fonction des 3 conditions traitées ou non. **H** : Taux de plasmocytes exprimant PD-L1 en fonction des 3 conditions traitées ou non. n = 5.

notable que les traitements Ibrutinib® seul ou combiné à l'anti-PD-1 réactivent la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> car on retrouve une diminution du taux de cellules en phase de cycle G0/G1 associée à une augmentation pouvant en moyenne atteindre 10% de cellules en phase G2/M ; sans pour autant qu'il y ait de bénéfice particulier de l'anti-PD-1 par rapport à l'Ibrutinib® seul (**Figure 57 A-D**).

En regardant le taux d'expression des marqueurs d'épuisement PD-1, CTLA-4, TIM-3 et LAG-3, nous avons remarqué que l'expression de PD-1 était perdue par pratiquement tous les LT CD4 en présence d'anti-PD-1 uniquement (environ 5% de cellules positives dans cette condition contre 90% sans traitement), l'Ibrutinib® seul n'ayant quant à lui aucun effet sur l'expression de PD-1 sur les 72h de traitement (**Figure 57 E**). De plus, il semblerait que si le niveau d'expression de CTLA-4 ne varie pas de manière significative en présence d'Ibrutinib® seul (en accord avec les résultats *in vivo*), l'ajout de l'anti-PD-1 permet de faire chuter son taux d'expression de 25% à 5% parmi les LT CD4<sup>+</sup> (**Figure 57 F**). En ce qui concerne les marqueurs TIM-3 et LAG-3 et contrairement à ce qui a pu être observé lors du traitement *in vivo*, leur niveau d'expression ne semble pas varier quelle que soit la condition lors de ces traitements *ex vivo* de 72h (**Figure 57 G et H**).

Les résultats sont assez similaires sur les LT CD8<sup>+</sup>. On observe une reprise de l'activité proliférative avec une diminution du nombre de cellules en phase G0/G1 au profit d'une augmentation de 8% du nombre de cellules en phase G2/M aussi bien en présence d'Ibrutinib® seul que couplé à l'anti-PD-1 (**Figure 58 A-D**). Au niveau des marqueurs d'épuisement, on retrouve une nouvelle fois une quasi annihilation du taux de cellules exprimant PD-1 (**Figure 58 E**). de plus l'expression de CTLA-4 est réduite uniquement lorsque l'anti-PD-1 est présent (**Figure 58 F**). On n'observe cependant aucun changement concernant le taux d'expression de TIM-3 et LAG-3 à la surface des LT CD8<sup>+</sup>, quel que soit la condition (**Figure 58 G et H**).

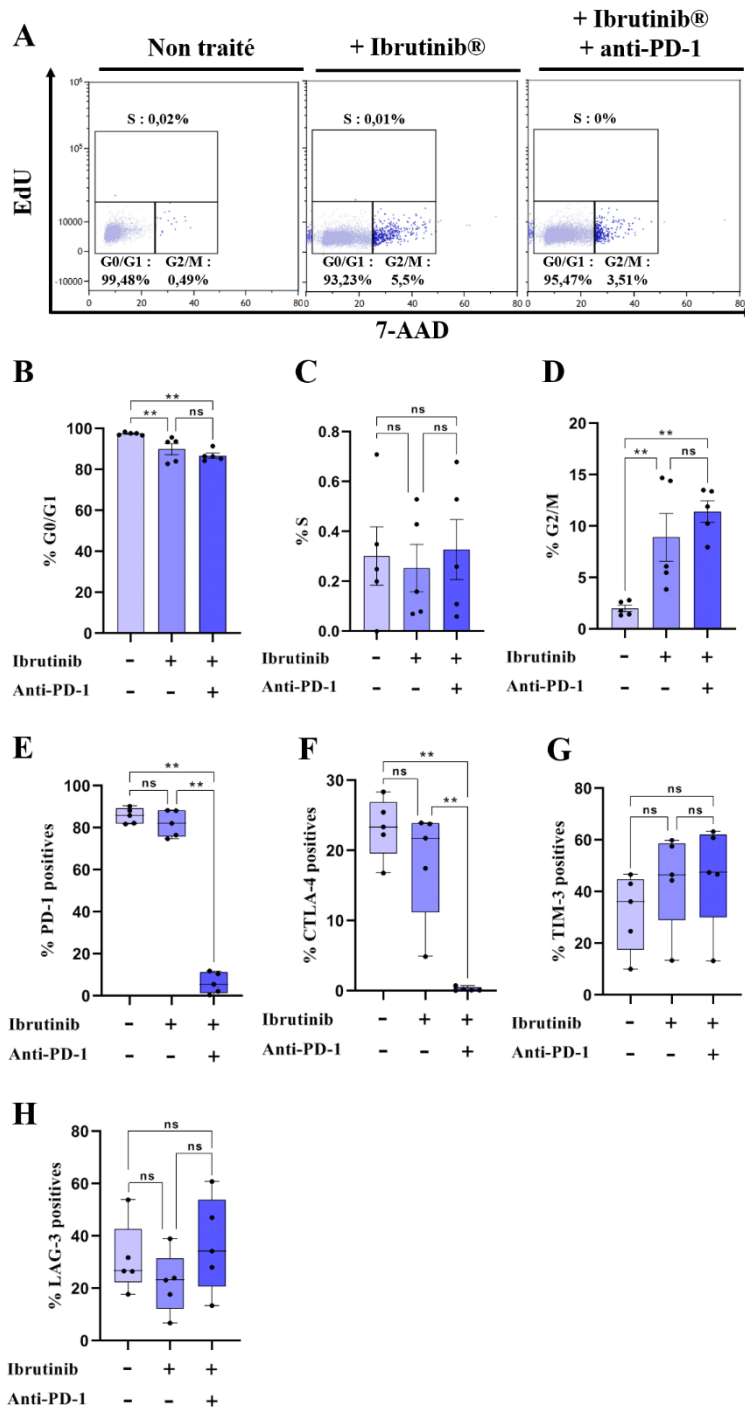
Il semblerait donc que dans le temps imparti de traitement *ex vivo* (72h), l'anti-PD-1 couplé à l'Ibrutinib® apporte un effet bénéfique dans le sens où il permet une meilleure restauration des marqueurs d'épuisement PD-1 et CTLA-4, bien que le taux de LT proliférant reste inchangé dans ces conditions.

### **C. Traitement anti-PD-L1 *in vivo***

Etant donné le rôle important que semble avoir le micro-environnement immunitaire dans le développement du lymphome de notre modèle murin, nous avons souhaité tester l'efficacité d'un anticorps thérapeutique ciblant PD-L1 puisque ce dernier est fortement surexprimé par les cellules tumorales.

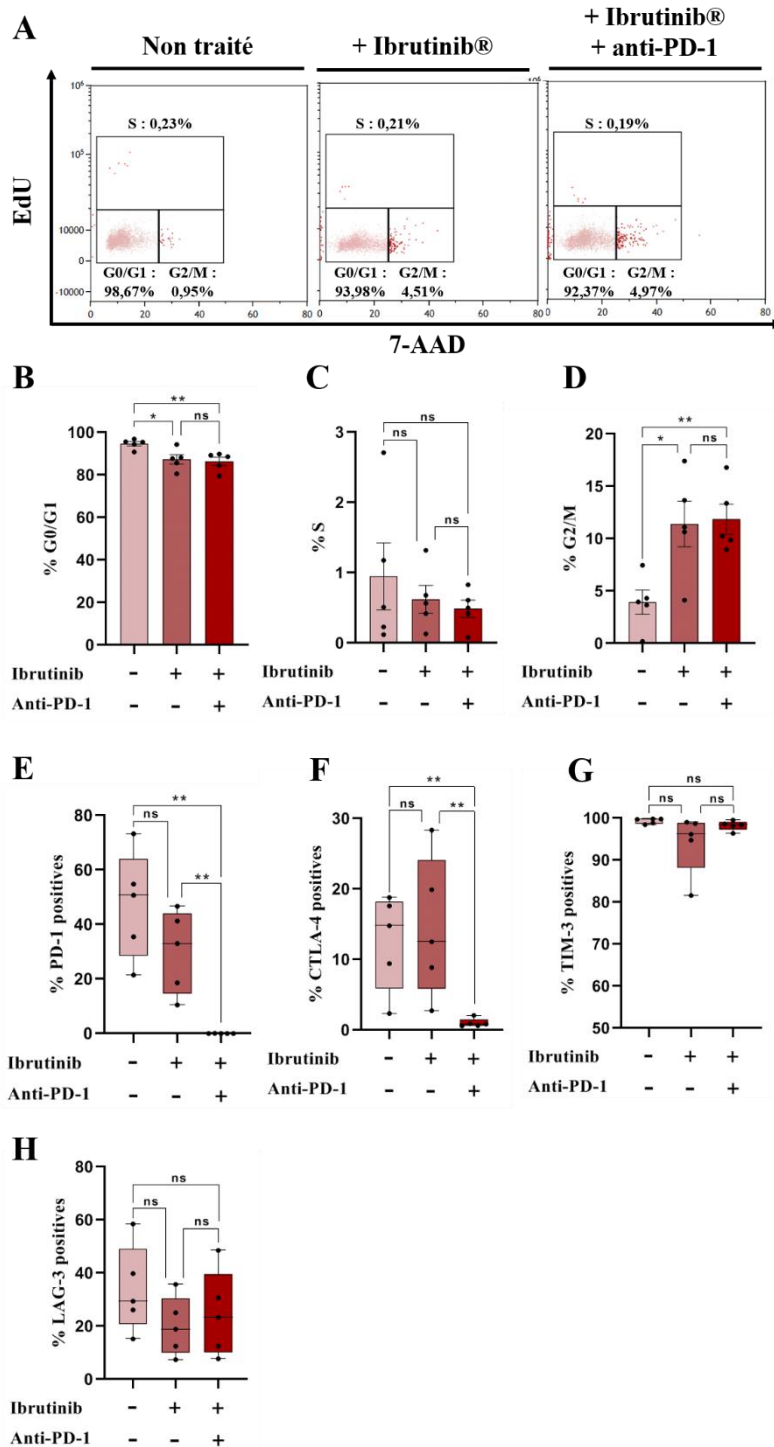
Le traitement s'est déroulé sur 25 jours durant lesquels 200 µg d'anti-PD-L1 ont été injectés en intra-péritonéal à intervalles de 4 jours, sur une cohorte de 3 souris *Myd88<sup>L252P</sup>* âgées de 9 à 11 mois et présentant un pic monoclonal de gammaglobulines sériques en EPS. 2 souris de même génotype ont été traitées en parallèle avec un contrôle isotypique. La taille de la rate des animaux a été mesurée avant le début du traitement et à la fin de ce dernier par imagerie CT (**Figure 59 A**). Etant donné la forte augmentation de la taille de la rate chez les animaux traités qui évolue de presque 1 cm en 25 jours, on peut d'ores et déjà statuer sur le fait que ce traitement anti-PD-L1 ne fonctionne pas en tant qu'agent anti-tumoral (**Figure 59 B**).





**Figure 57 : Effet de la combinaison Ibrutinib®+anti-PD-1 sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ex vivo**

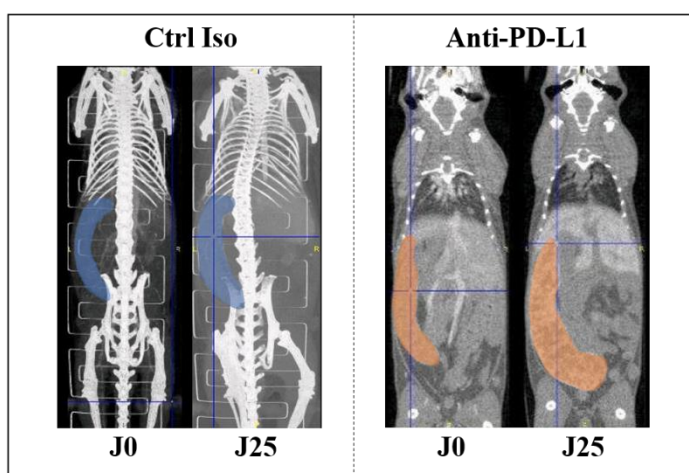
**A** : Exemple de marquage EdU/7AAD sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, selon les 3 conditions Myd88<sup>L252P</sup> non traités, traités Ibrutinib® et traitées Ibrutinib®+anti-PD-1. **B** : Taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en phase G0/G1 (EdU-7AAD<sup>-</sup>). **C** : Taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en phase S (EdU+7AAD<sup>+</sup>). **D** : Taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en phase G2/M (EdU-7AAD<sup>+</sup>). **E** : Taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant PD-1 en fonction des 3 conditions traitées ou non. **F** : Taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant CTLA-4 en fonction des 3 conditions traitées ou non. **G** : Taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant TIM-3 en fonction des 3 conditions traitées ou non. **H** : Taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant LAG-3 en fonction des 3 conditions traitées ou non. n = 5.



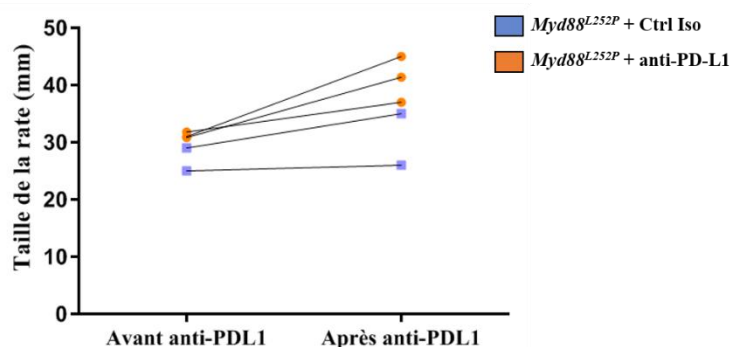
**Figure 58 : Effet de la combinaison Ibrutinib®+anti-PD-1 sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ex vivo**

**A** : Exemple de marquage EdU/7AAD sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, selon les 3 conditions Myd88<sup>L252P</sup> non traités, traités Ibrutinib® et traitées Ibrutinib®+anti-PD-1. **B** : Taux de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en phase G0/G1 (EdU-7AAD). **C** : Taux de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en phase S (EdU+7AAD<sup>+/+</sup>). **D** : Taux de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en phase G2/M (EdU-7AAD<sup>+</sup>). **E** : Taux de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> exprimant PD-1 en fonction des 3 conditions traitées ou non. **F** : Taux de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> exprimant CTLA-4 en fonction des 3 conditions traitées ou non. **G** : Taux de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> exprimant TIM-3 en fonction des 3 conditions traitées ou non. **H** : Taux de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> exprimant LAG-3 en fonction des 3 conditions traitées ou non. n = 5.

A



B



### Figure 59 : Suivi de la croissance tumorale par imagerie CT lors du traitement anti-PD-L1

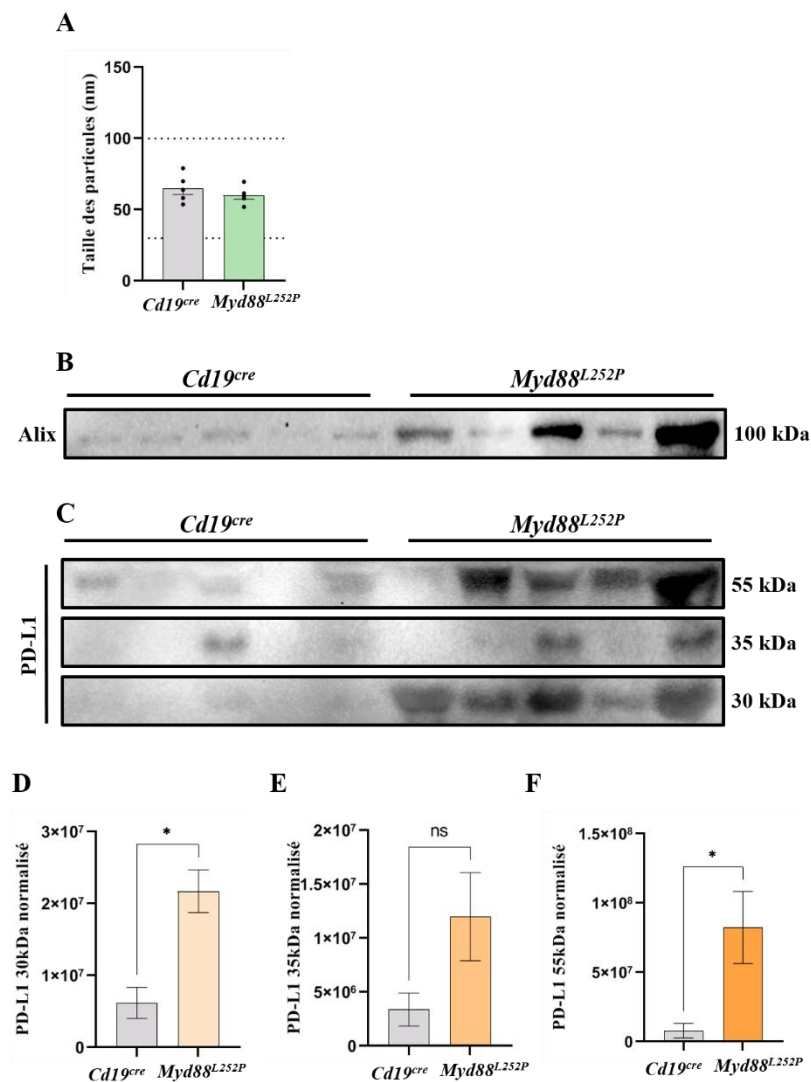
A : La taille des tumeurs est mesurée par imagerie CT à J0 (avant traitement) puis à nouveau à J25 (après traitement). B : Evolution de la taille de la tumeur entre J0 et J25 pour chaque souris. *Myd88<sup>L252P</sup>* traitées anti-PD-L1 n = 3 ; *Myd88<sup>L252P</sup>* traitées contrôle isotypique n = 2.

Alors même que l'axe PD-1/PD-L1 semble pourtant être une cible thérapeutique judicieuse si on considère les résultats obtenus avec la combinaison Ibrutinib®+anti-PD-1 *ex vivo*, l'hypothèse que nous proposons pour expliquer l'échec total du traitement anti-PD-L1 est que les cellules tumorales sécrèteraient des vésicules extra-cellulaires elles-mêmes chargées en PD-L1 de surface ; et qui joueraient un rôle de leurre vis-à-vis de l'anticorps thérapeutique. Cette étude a été réalisée par Mina Chabaud, étudiante de Master 2 que j'ai encadré lors de ma thèse.

Nous avons extrait les microvésicules du sérum de 5 souris *Cd19<sup>cre</sup>* et 5 souris *Myd88<sup>L252P</sup>* afin de comparer le niveau d'expression de PD-L1 exosomal entre ces deux groupes.

Tout d'abord, nous avons caractérisé le matériel obtenu afin de démontrer qu'il s'agit bien de microvésicules : la taille des particules a été mesurée grâce à la technologie Nanosight®, qui démontre que les particules obtenues sont comprises entre 30 et 100 nm et peuvent donc

correspondre à des exosomes (**Figure 60 A**). Qui plus est, nous confirmons par Western Blot dans chacun de nos échantillons la présence de la protéine ALIX, qui est spécifique de la voie endosomale et est un marqueur exosomal (**Figure 60 B**). Par Western Blot, nous démontrons la coexistence de 3 formes de PD-L1 : une forme à 30 kDa, 35 kDa et 55 kDa (**Figure 60 C**). Qui plus est, la quantification de ce Western Blot nous apprend que la forme 30 kDa de PD-L1 est surexprimée d'un facteur 3 dans les exosomes de souris *Myd88<sup>L252P</sup>* (**Figure 60 D**) ; La forme à 35 kDa présente une tendance à la surexpression non significative (**Figure 60 E**), tandis que la forme à 55 kDa est, quant à elle, surexprimée d'un facteur 10 (**Figure 60 F**).



**Figure 60 : caractérisation des microvésicules extraites du sérum de souris**

**A** : La taille des vésicules obtenues à partir de sérum murin sest mesurée au Nanosight®. Pour chacun des deux groupes *Cd19<sup>cre</sup>* et *Myd88<sup>L252P</sup>*, la taille des microvésicules est comprise entre 30 et 100 nm. **B** : La présence de la protéine ALIX est contrôlée par Western Blot réalisé à partir de 10.10<sup>9</sup> particules de chaque échantillon. **C** : Un marquage de PD-L1 en Western Blot révèle la présence de la protéine à 3 tailles différentes : 30, 33 et 55 kDa. **D** : La quantification de PD-L1 30 kDa est réalisée à partir de la quantité totale de protéine et comparée entre les deux groupes. **E** : La quantification de PD-L1 35 kDa est réalisée à partir de la quantité totale de protéine et comparée entre les deux groupes. **F** : La quantification de PD-L1 55 kDa est réalisée à partir de la quantité totale de protéine et comparée entre les deux groupes. n = 5.

Ces résultats démontrent une surexpression de PD-L1 au niveau des microvésicules sériques des animaux porteurs de la mutation *MYD88<sup>L252P</sup>*. De plus nous avons pu identifier 3 formes différentes de PD-L1 dans ces vésicules, dont au moins deux sont surexprimées. Les formes les plus lourdes de PD-L1 correspondent à un haut niveau de glycosylation, qui est connue pour stabiliser PD-L1 à la membrane et qui est également retrouvé à la surface des LB (**Annexe 3**).

#### **D. Traitements anti-IL-6R et anti-IL-10R ex vivo**

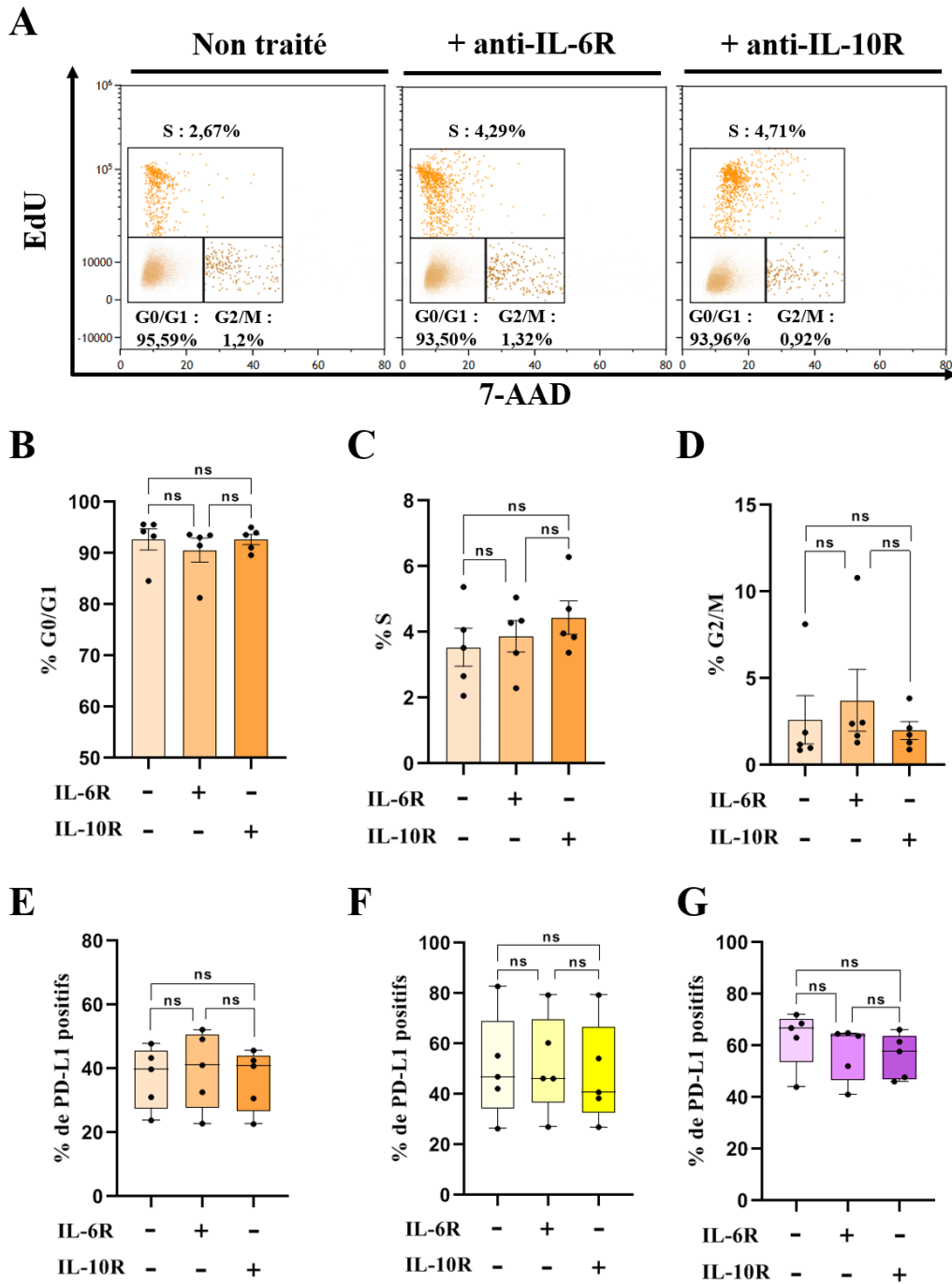
Au regard des résultats obtenus qui montrent que dans notre modèle *Myd88<sup>L252P</sup>* il y a une sécrétion accrue d'IL-6 et d'IL-10 (via les LB, LT CD4<sup>+</sup>/8<sup>+</sup> et les Tregs) et en considérant le rôle immunosuppresseur et inflammatoire de ces cytokines qui a été décrit en introduction de ce travail ; nous avons étudié l'effet de deux anticorps thérapeutiques ciblant respectivement l'IL-6R et l'IL-10R lors d'un traitement *ex vivo* de 72h sur des splénocytes totaux.

Les traitements à l'anti-IL6R et à l'anti-IL-10R ne semblent avoir aucun effet particulier sur les LB : on ne remarque aucune modification de l'activité proliférative au regard des proportions de cellules engagées en phase G0/G1, S et G2/M du cycle cellulaire. On retrouve en effet environ 92% de LB en phase G0/G1, 4% de LB en phase S et 2,5 à 3% de LB en phase G2/M ; ces valeurs ne varient pas quel que soit l'anticorps thérapeutique utilisé (**Figure 61 A-D**). Au niveau de l'expression de PD-L1, on ne remarque également aucune modification du taux de cellules l'exprimant, que ce soit chez les LB (40% de positivité), les plasmablastes (45-50% de positivité) ou les plasmocytes (60-70% de positivité). Aucun des deux anticorps ne semble avoir d'impact sur l'expression de PD-L1 (**Figure 61 E-G**).

En ce qui concerne les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, on ne distingue aucune différence en terme de prolifération que ce soit avec l'anti-IL-6R ou l'anti-IL-10R (**Figure 62 A**). Les taux de cellules en phase G0/G1, S et G2/M (97%, 0,2-0,3% et 2% respectivement) restent les mêmes que dans le cas où les cellules ne sont pas traitées (**Figure 62 B-D**). Vis-à-vis du taux de LT CD4<sup>+</sup> qui expriment les marqueurs d'épuisement PD-1, CTLA-4, TIM-3 et LAG-3, la seule différence qui semble ressortir est une diminution de CTLA-4 lorsque les cellules sont traitées à l'anti-IL-10R. L'anti-IL-6R quant à lui n'induit aucun changement chez ces cellules (**Figure 62 E-H**).

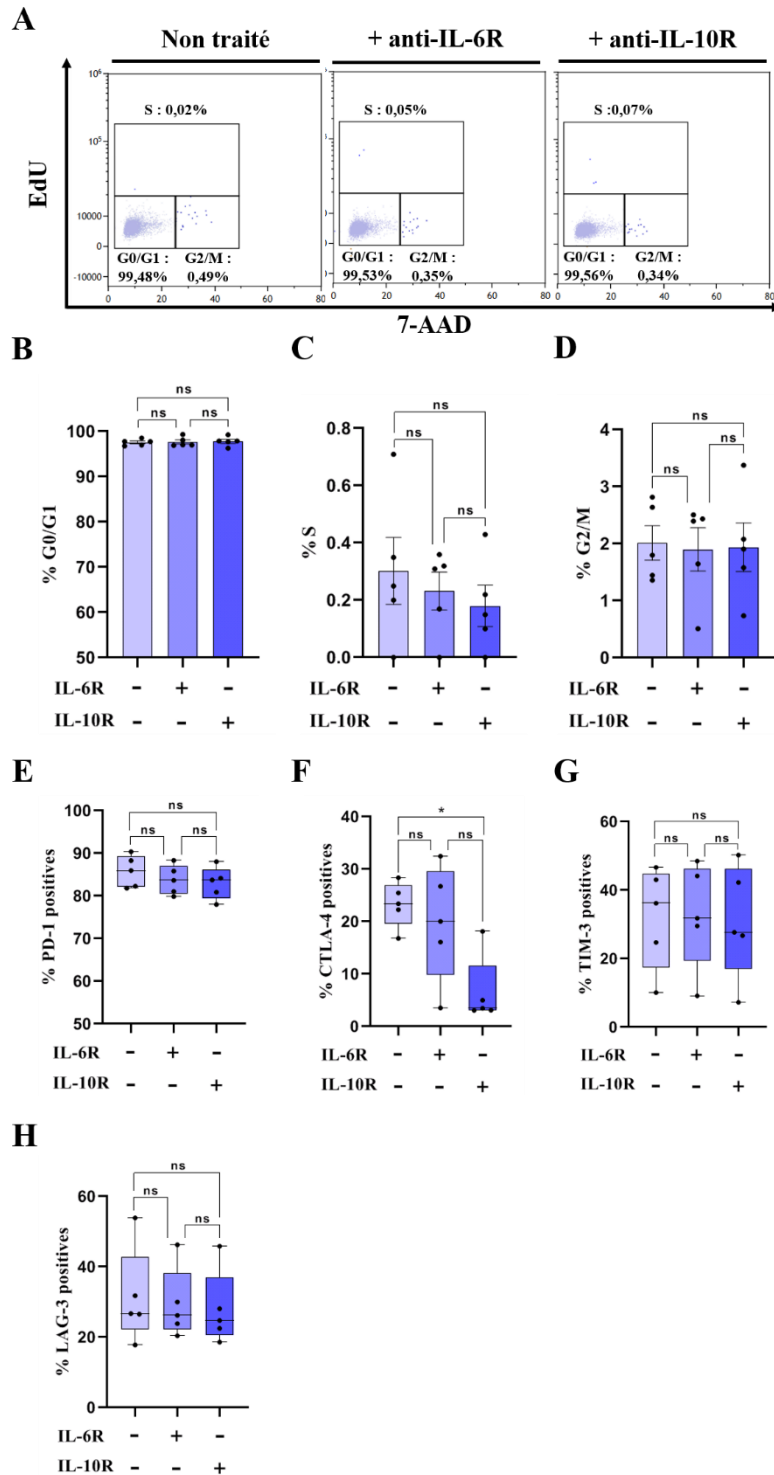
Enfin pour ce qui est des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, on ne remarque aucun effet prolifératif de l'anti-IL-6R, en présence duquel les taux de LT CD8<sup>+</sup> en phase G0/G1, S, G2/M restent similaires à ceux des cellules non-traitées (environ 95%, 0,5-1% et environ 10% respectivement). En revanche, on observe une stimulation de la prolifération induite par l'IL-10R, qui permet une sortie des LT CD8<sup>+</sup> de la phase G0/G1 (80% contre 95% sans traitement) et une augmentation des cellules proliférantes en phase G2/M (20% contre 5% sans traitement, **Figure 63 A-D**). En terme d'épuisement, on observe de façon plus nette que pour les LT CD4<sup>+</sup> une forte diminution du taux de LT CD8<sup>+</sup> qui expriment CTLA-4 en présence d'anti-IL-10R, alors qu'aucun changement n'est observable avec le traitement à l'IL-6R. Pour les trois autres marqueurs d'épuisement PD-1, TIM-3 et LAG-3, leur expression semble inchangée à la surface des LT CD8<sup>+</sup> que ces derniers soient traités ou non (**Figure 63 E-F**).

Il semblerait que l'anti-IL-10R induise une restauration partielle de l'épuisement des LT CD8<sup>+</sup>, car il permet la perte d'expression du CTLA-4 et stimule la prolifération.



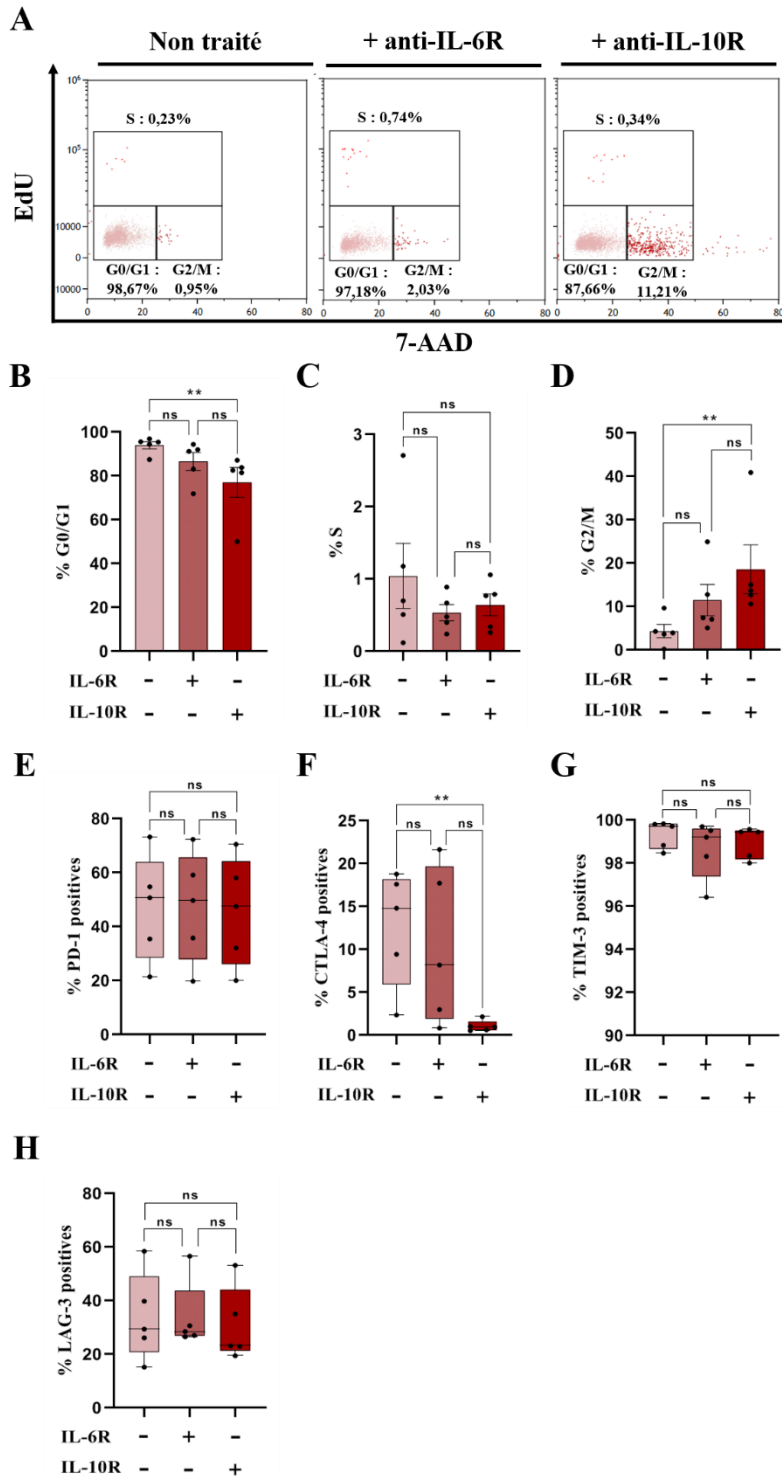
**Figure 61 : Effet des thérapies anti-IL-6R et anti-IL-10R sur les lymphocytes B ex vivo**

**A** : Exemple de marquage EdU/7AAD sur les lymphocytes B CD19<sup>+</sup>, selon les 3 conditions Myd88<sup>L252P</sup> non traités, traités anti-IL-6R et traités anti-IL-10R. **B** : Taux de lymphocytes B en phase G0/G1 (EdU<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>). **C** : Taux de lymphocytes B en phase S (EdU<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>). **D** : Taux de lymphocytes B en phase G2/M (EdU<sup>+</sup>7AAD<sup>+</sup>). **E** : Taux de lymphocytes B exprimant PD-L1 en fonction des 3 conditions traitées ou non. **F** : Taux de plasmablastes exprimant PD-L1 en fonction des 3 conditions traitées ou non. **G** : Taux de plasmocytes exprimant PD-L1 en fonction des 3 conditions traitées ou non. n = 5.



**Figure 62 : Effet des thérapies anti-IL-6R et anti-IL-10R sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ex vivo**

**A** : Exemple de marquage EdU/7AAD sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, selon les 3 conditions Myd88<sup>L252P</sup> non traités, traités anti-IL-6R et traitées anti-IL-10R. **B** : Taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en phase G0/G1 (EdU-7AAD<sup>-</sup>). **C** : Taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en phase S (EdU+7AAD<sup>+/+</sup>). **D** : Taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en phase G2/M (EdU-7AAD<sup>+</sup>). **E** : Taux de cellules exprimant PD-1. **F** : Taux de cellules exprimant CTLA-4. **G** : Taux de cellules exprimant TIM-3. **H** : Taux de cellules exprimant LAG-3. n = 5.



**Figure 63 : Effet des thérapies anti-IL-6R et anti-IL-10R sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ex vivo**

**A** : Exemple de marquage EdU/7AAD sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, selon les 3 conditions Myd88<sup>L252P</sup> non traités, traités anti-IL-6R et traitées anti-IL-10R. **B** : Taux de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en phase G0/G1 (EdU-7AAD<sup>-</sup>). **C** : Taux de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en phase S (EdU+7AAD<sup>+</sup>). **D** : Taux de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en phase G2/M (EdU-7AAD<sup>+</sup>). **E** : Taux de cellules exprimant PD-1. **F** : Taux de cellules exprimant CTLA-4. **G** : Taux de cellules exprimant TIM-3. **H** : Taux de cellules exprimant LAG-3. n = 5.

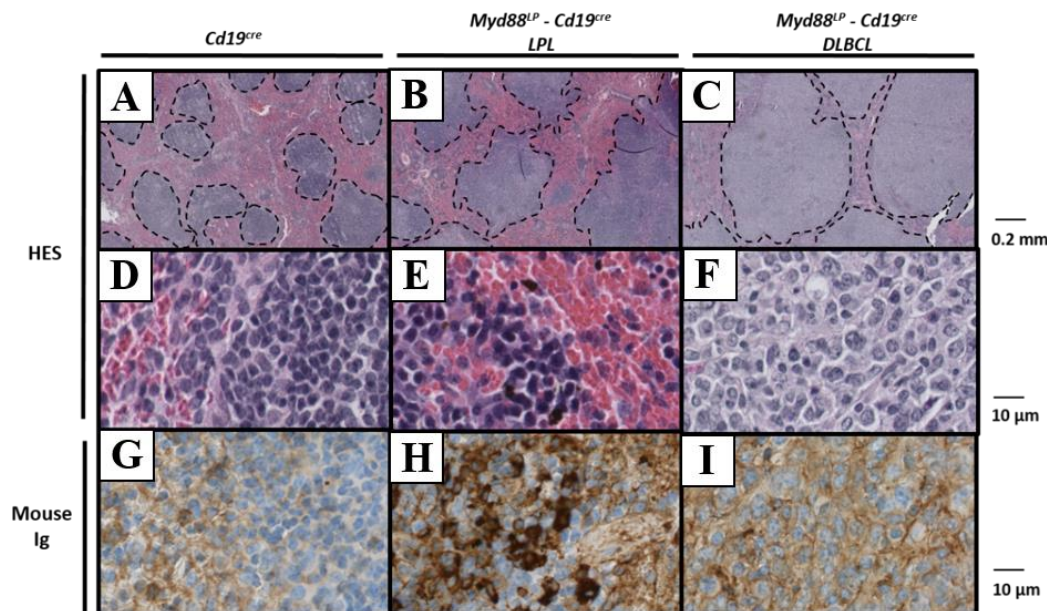


### Chapitre III. Rôle du microenvironnement immun dans la transformation de la maladie de Waldenström

Dans notre modèle murin *Myd88<sup>L252P</sup>* qui développe un lymphome lymphoplasmocytaire (LPL) ressemblant à la maladie de Waldenström, nous avons pu observer que chez les animaux plus âgés (âge supérieur à 12 mois), on retrouvait en réalité dans environ 40% des cas un autre type de pathologie qui ressemble beaucoup plus à un lymphome agressif de type DLBCL (C. Ouk *et al.* 2021). La classification de ces deux différents phénotypes a été réalisée par Cassandra Jadeau, stagiaire de master 2. Dans la suite de ce travail, le groupe d'animaux *Myd88<sup>L252P</sup>* présentant des tumeurs de type LPL seront nommés « LPL-like » ; alors que les animaux présentant un DLBCL seront nommés « DLBCL-like ».

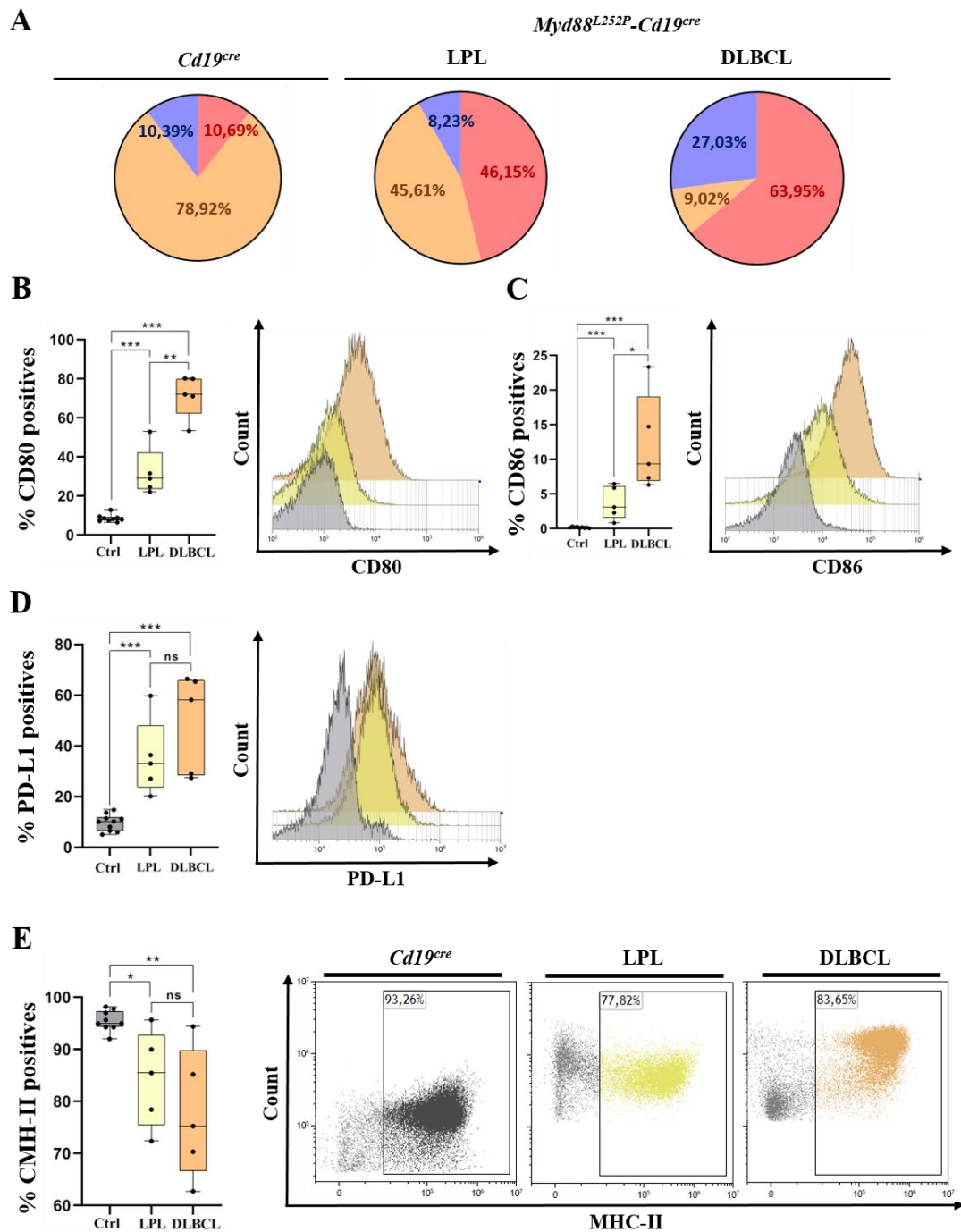
Dans les tumeurs LPL-like on retrouve des follicules élargis composés de petites cellules foncées dont le noyau occupe tout le cytoplasme, associées à une surpopulation lymphoplasmocytaires marquée par l'anticorps anti-Ig de souris (Mouse Ig). Dans les tumeurs DLBCL-like en revanche, on retrouve des grandes cellules claires, dont la coloration du noyau est hétérogène et qui sont associées à la disparition complète des populations lymphoplasmocytaires (**Figure 64**).

Après avoir mis en évidence plusieurs mécanismes d'échappement immunitaire qui semblent participer au développement du LPL dans notre modèle *Myd88<sup>L252P</sup>*, nous avons émis l'hypothèse que d'une part les phénotypes tumoraux DLBCL-like observés chez certains animaux étaient en fait issus de la transformation d'un LPL pré-existant ; et que d'autre part les mécanismes d'échappement immunitaire pouvaient jouer un rôle favorisant cette transformation.



**Figure 64 : Histologie de rate comparative entre les différents phénotypes Ctrl, LPL et DLBCL**

**A-C :** Coloration HES (Hématoxyline, Eosine, Safran) permettant de distinguer les pulpes rouges et blanches spléniques. **D-E :** Coloration HES (Hématoxyline, Eosine, Safran) permettant d'apprécier l'aspect des cellules qui composent le tissu. **G-I :** Marquage des immunoglobulines murines (= Mouse Ig) révélant la présence de lymphoplasmocytes dans le tissu. Adapté d'après C. Ouk *et al.* 2021.



**Figure 65 : Comparaison phénotypique entre LB issus de LPL et de DLBCL**

**A** : Proportion de LB CD19<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> exprimant les isotypes IgM, IgM-IgD ou bien switchés (IgM<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup>) en fonction du phénotype tumoral. **B** : Expression de surface du marqueur CD80 (% de cellules positives et MFI). **C** : Expression de surface du marqueur CD86 (% de cellules positives et MFI). **D** : Expression de surface du marqueur PD-L1 (% de cellules positives et MFI). **E** : Expression de surface du marqueur MHC-II (% de cellules positives et MFI). *Cd19<sup>cre</sup>* n = 10 ; LPL-like n = 5, DLBCL-like n = 5.

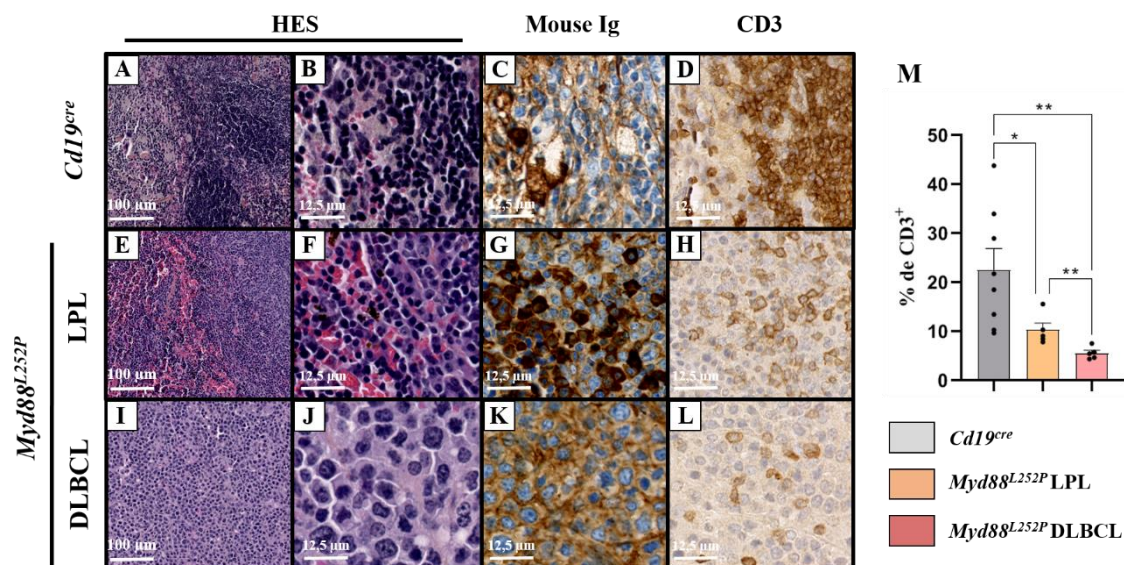
## A. Caractéristiques des lymphocytes B comparées entre phénotypes LPL et DLBCL

Comme lors des travaux précédents, nous avons commencé notre étude par le phénotype des lymphocytes B. Tout d'abord, nous avons caractérisé les proportions isotypiques de chaque phénotype contrôle *Cd19<sup>cre</sup>*, LPL-like et DLBCL-like. Il semblerait que dans les LPL, on retrouve une sur-représentation des LB IgM<sup>+</sup> (46,15% contre 10,69%) au détriment des LB IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> qui se voient diminués (45,61% contre 78,92%) ; alors que les LB switchés IgM<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> ne varient pas sensiblement (environ 10%). Dans les DLBCL et comparé aux LPL, on observe une augmentation du nombre de LB IgM<sup>+</sup> (63,95% contre 46,15%), une forte diminution des LB IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> (9,02% contre 45,61%) et enfin une proportion de LB switchés accrue, avec 27,03% pour les DLBCL vs 8,23% pour les LPL (**Figure 65 A**).

En terme d'expression de marqueurs de surface, la cytométrie en flux nous apprend que les LB issus de DLBCL expriment encore plus fortement le CD80 (75% vs 35%) et le CD86 (10% vs 3%) que ceux issus de LPL (**Figure 65 B et C**). Enfin, les LB de DLBCL ne semblent pas surexprimer de façon plus importante PD-L1 ni plus sous-exprimer le CMH classe II que ne le font déjà les LB issus de LPL (**Figure 65 D et E**).

## B. Caractéristiques des lymphocytes T dans les DLBCL

Ce qui était précédemment démontré en immunofluorescence est ici retrouvé en immunohistochimie. Grâce à la combinaison des marquages Mouse Ig et anti-CD3 sur coupes sériées de rates incluses en paraffine, on confirme bien qu'il y a dans les tumeurs LPL-like un



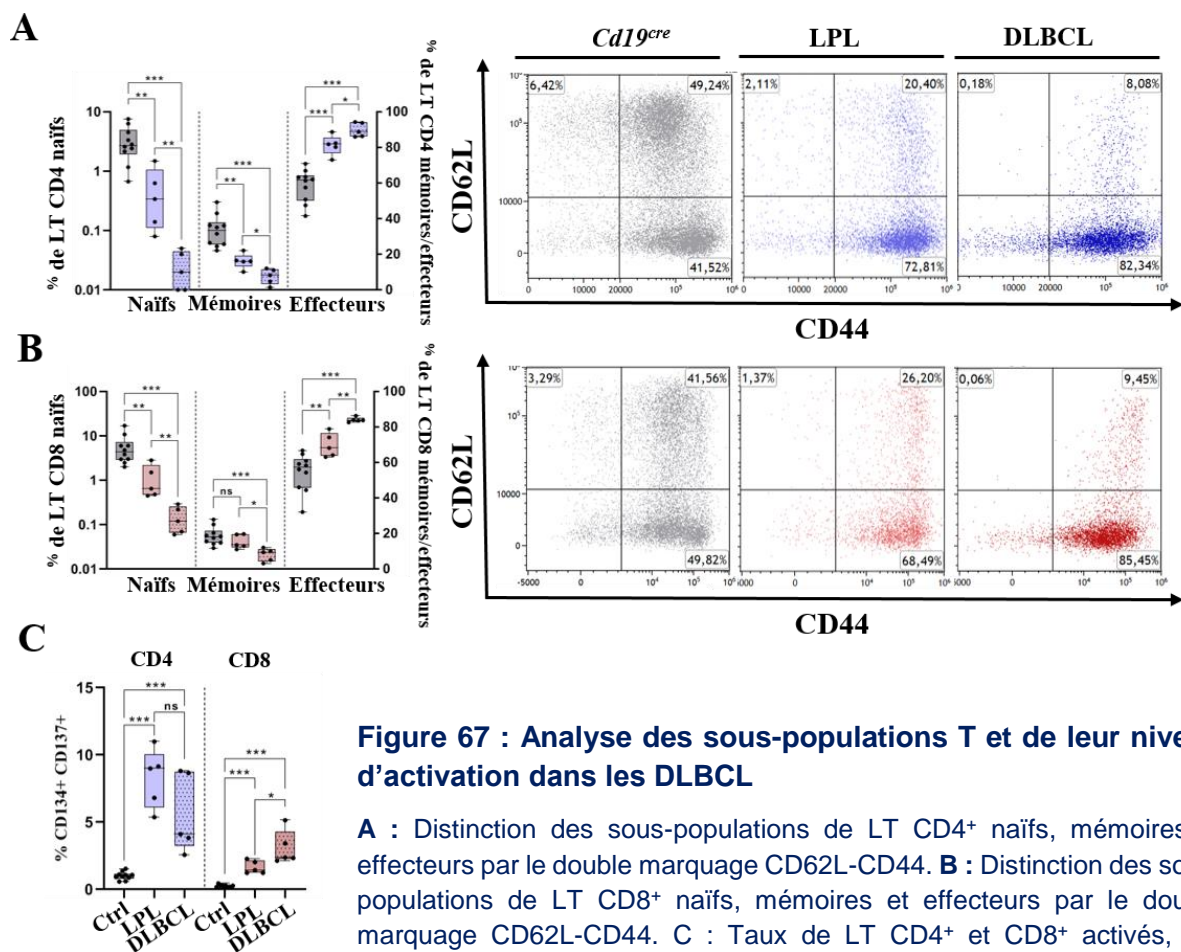
**Figure 66 : Comparaison du nombre de lymphocytes T entre les différents phénotypes *Cd19<sup>cre</sup>*, LPL et DLBCL**

**A, E, I :** Coloration HES (Hématoxyline, Eosine, Safran) permettant de distinguer les pulpes rouges et blanches spléniques. **B, F, J :** Coloration HES (Hématoxyline, Eosine, Safran) permettant d'apprécier l'aspect des cellules qui composent le tissu. **C-G-K :** Marquage des immunoglobulines murines (= Mouse Ig) révélant la présence de lymphoplasmocytes dans le tissu. **D-H-L :** Marquage anti-CD3 murin révélant les lymphocytes T. **M :** quantification du nombre de LT ramené au nombre de cellules totales sur la coupe. n = 5 pour chacun des 3 groupes.

déplacement des LT vers les LB tumoraux, alors que ces deux populations se situent dans des zones distinctes dans une rate normale (**Figure 66 C, D, G, H**). Pour ce qui est des DLBCL-like, on observe également un mélange de types cellulaires avec une dissémination des LT parmi les LB. En revanche, on remarque également un nombre très réduit de LT présents dans les tumeurs DLBCL-like (**Figure 66 K et L**). Ceci est confirmé par la cytométrie en flux avec une baisse importante du nombre LT CD3<sup>+</sup> dans les rates DLBCL-like comparé aux LPL-like et aux contrôles (*Cd19<sup>cre</sup>* : 25%, LPL-like : 10%, DLBCL-like : 5%, **Figure 66 M**).

En analysant les sous-groupes de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> grâce au double marquage CD62L-CD44 (LT naïfs, mémoires et effecteurs), on observe plusieurs choses. Premièrement en ce qui concerne les LT CD4<sup>+</sup>, le phénomène préalablement observé chez les LPL-like consistant en une diminution des LT naïfs et mémoires au profit des effecteurs est encore plus exacerbé chez les cellules issues de tumeurs DLBCL-like. En effet, en comparaison des LPL-like la proportion de LT CD4<sup>+</sup> naïfs CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup> est diminuée (0,05% vs 0,25%) ; la proportion de LT CD4<sup>+</sup> mémoires CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> est également diminuée (10% vs 20%), et la proportion de LT CD4<sup>+</sup> effecteurs CD62L<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup> est quant à elle augmentée (90% vs 80%, **Figure 67 A**).

Deuxièmement, un phénomène similaire est observé chez les LT CD8<sup>+</sup>, pour lesquels la diminution de LT naïfs est supérieure chez les DLBCL-like comparé aux LPL-like (0,1% vs 1%), et l'augmentation de LT effecteurs est accrue (85% vs 75%). En ce qui concerne les LT CD8<sup>+</sup> mémoires, on n'observe pas de différence au niveau de cette population si on compare

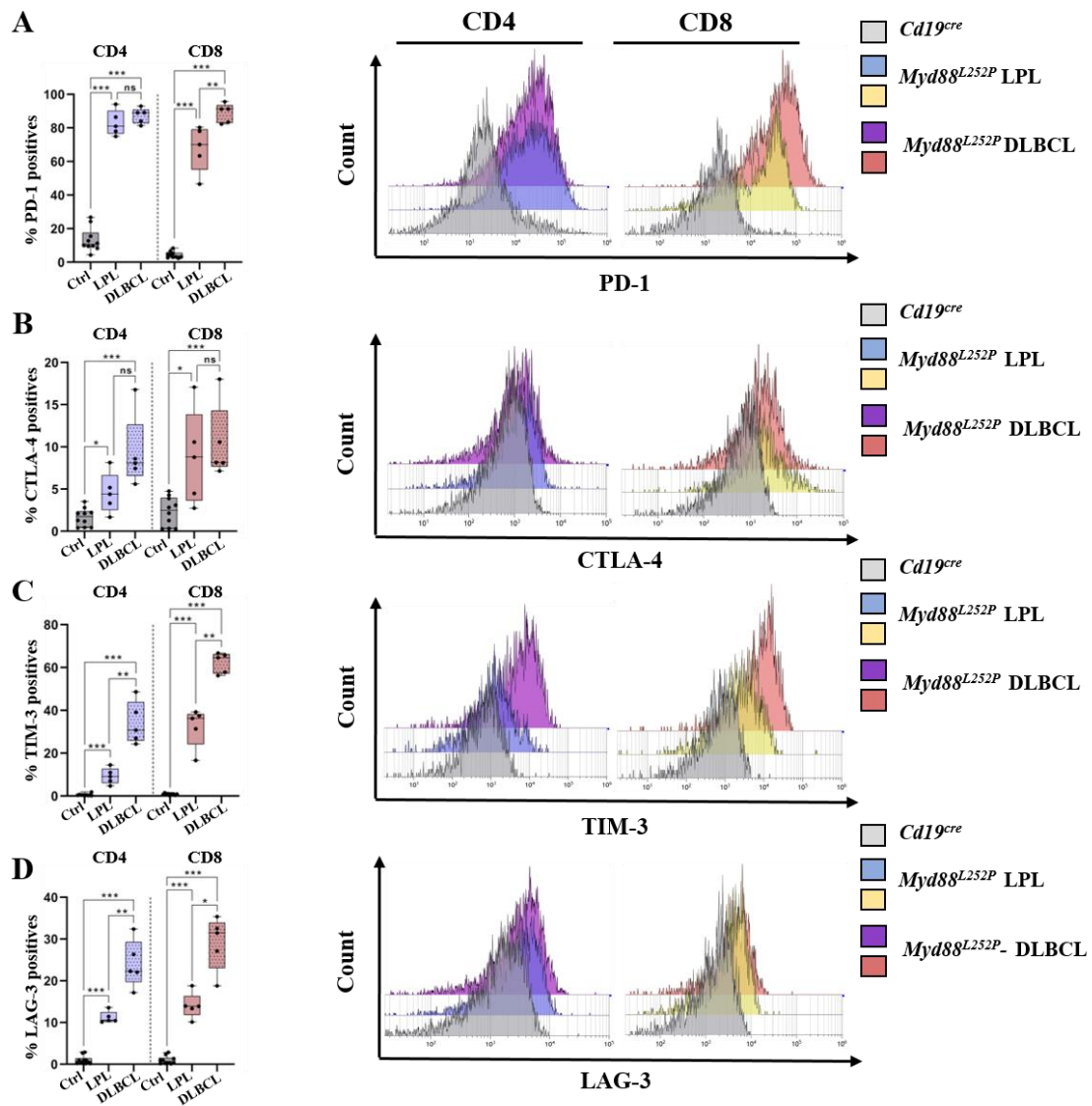


**Figure 67 : Analyse des sous-populations T et de leur niveau d'activation dans les DLBCL**

**A** : Distinction des sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> naïfs, mémoires et effecteurs par le double marquage CD62L-CD44. **B** : Distinction des sous-populations de LT CD8<sup>+</sup> naïfs, mémoires et effecteurs par le double marquage CD62L-CD44. **C** : Taux de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> activés, co-exprimants les marqueurs CD134 et CD137. *Cd19<sup>cre</sup>* n = 10, LPL-like n = 5, DLBCL-like n = 5.

une tumeur LPL-like et une rate normale. En revanche, la proportion de ces cellules est fortement diminuée dans les tumeurs DLBCL-like (5% vs 10%, **Figure 67 B**).

Enfin en terme d'activation cellulaire qui est visualisée par la double positivité aux marqueurs CD134 et CD137, aucune différence n'a été observée dans les DLBCL-like par rapport aux LPL-like en ce qui concerne les LT CD4<sup>+</sup>. En revanche, l'activation des LT CD8<sup>+</sup> issues de DLBCL-like est supérieure à celle des LPL-like (**Figure 67 C**).



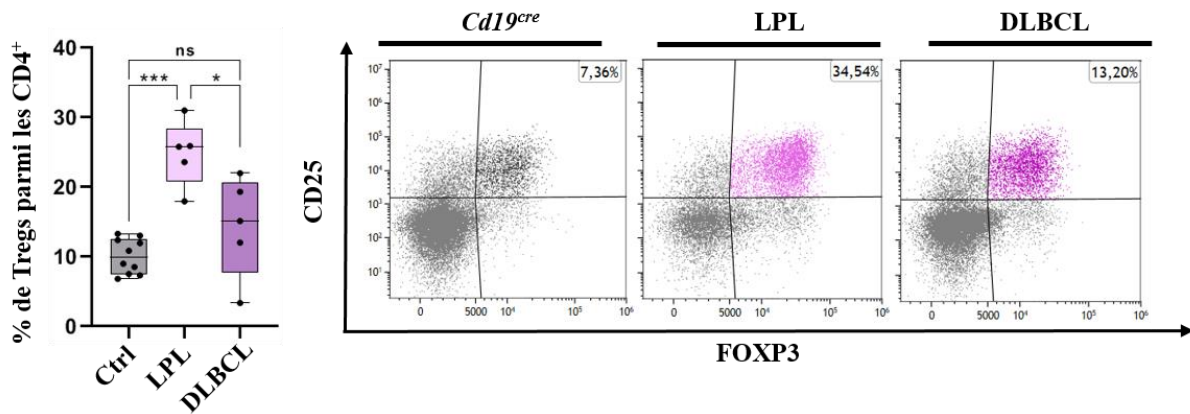
**Figure 68 : Analyse des marqueurs d'épuisement T dans les DLBCL**

**A** : Taux de LT CD4 et CD8 positifs au marqueur PD-1 comparés entre les groupes *Cd19<sup>cre</sup>*, LPL et DLBCL. Comparaison du niveau d'expression (histogrammes) pour chaque groupe. **B** : Taux de LT CD4 et CD8 positifs au marqueur CTLA-4 comparés entre les groupes *Cd19<sup>cre</sup>*, LPL et DLBCL. Comparaison du niveau d'expression (histogrammes) pour chaque groupe. **C** : Taux de LT CD4 et CD8 positifs au marqueur TIM-3 comparés entre les groupes *Cd19<sup>cre</sup>*, LPL et DLBCL. **D** : Taux de LT CD4 et CD8 positifs au marqueur LAG-3 comparés entre les groupes *Cd19<sup>cre</sup>*, LPL et DLBCL. Comparaison du niveau d'expression (histogrammes) pour chaque groupe. *Cd19<sup>cre</sup>* n = 10, LPL-like n = 5, DLBCL-like n = 5.

Nous avons par suite logique comparé le niveau d'expression des marqueurs d'épuisement PD-1, CTLA-4, TIM-3 et LAG-3 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> issus de tumeurs LPL et DLBCL. Le taux de LT CD4<sup>+</sup> exprimant PD-1 ne varie pas entre les groupes LPL-like et DLBCL-like (environ 85%). Pour les LT CD8<sup>+</sup> en revanche, on remarque un taux d'expression accru dans les DLBCL-like vis-à-vis des LPL-like (85% vs 70%, **Figure 68 A**). Pour le marqueur CTLA-4, son niveau d'expression ne varie pas entre les groupes LPL-like et DLBCL-like que ce soit pour les LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (**Figure 68 B**). En ce qui concerne l'expression de TIM-3, elle est accrue chez les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> issus de DLBCL- comparé au LPL (30% vs 10% pour les CD4 ; 65% vs 35% pour les CD8<sup>+</sup>. **Figure 68 C**). Enfin, le taux d'expression de LAG-3 est également accru chez LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> du groupe DLBCL-like versus LPL-like (25% vs 12% pour les CD4 ; 30% vs 18% pour les CD8<sup>+</sup>. **Figure 68 D**).

Pour finir, nous sommes partis du constat établi concernant la forte infiltration de Tregs dans les tumeurs LPL-like afin de déterminer leur possible implication dans le phénomène de transformation. Cependant, il semblerait que le taux de Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> diminue dans les tumeurs DLBCL-like comparé aux LPL-like (15% vs 27%). Ainsi, il ne semblerait pas y avoir plus de Tregs dans les tumeurs DLBCL-like que dans les tissus sains, alors que dans les LPL-like le taux de Tregs est augmenté (**Figure 69**).

Bien que le caractère immunosuppresseur des cellules tumorales ne change pas, il semblerait pourtant que le micro-environnement tumoral soit modifié entre les phénotype LPL-like et DLBCL-like retrouvés chez notre modèle murin. Cela suggère une implication de ce microenvironnement tumoral dans le processus de transformation.



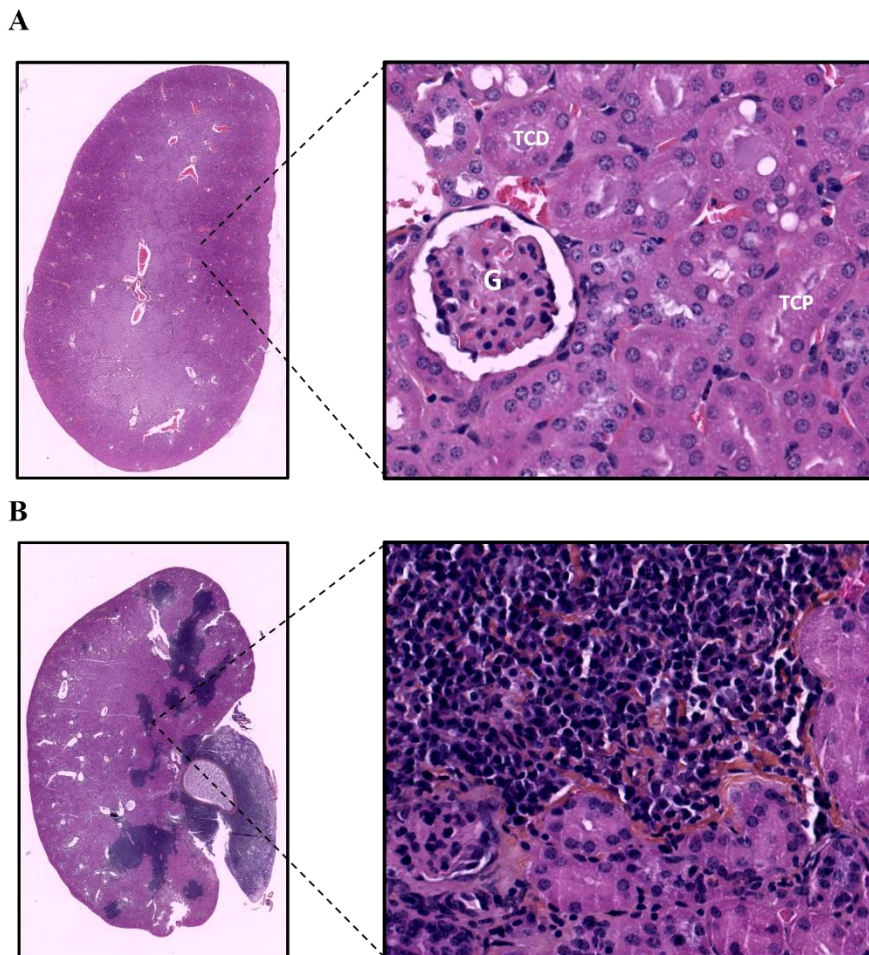
**Figure 69 : Taux d'infiltration des Tregs dans les tumeurs DLBCL-like versus LPL-like**

Les Tregs sont identifiés en cytométrie en flux par les marqueurs CD4, CD25 et FoxP3. Le taux de Tregs parmi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont comparés entre groupe contrôle (Ctrl), LPL-like et DLBCL-like. Ctrl n = 10, LPL-like n = 5, DLBCL-like n = 5.

## Chapitre IV. Atteintes secondaires d'organes, comparaison entre phénotype LPL et DLBCL

### A. Altération de l'activité rénale

Après avoir visuellement observée la présence de masses sur les reins de certaines souris *Myd88<sup>L252P</sup>*, nous avons décidé d'étudier un peu plus en détails ces organes. Une coloration HES en immunohistochimie sur coupes de reins de souris *Cd19<sup>Cre</sup>* inclus en paraffine nous permet d'abord d'observer la structure du rein normal, constitué des glomérules et des tubules contournés proximaux et distaux. Les tubules contournés distaux sont plus petits et ronds que les tubules contournés proximaux qui sont plus allongés (**Figure 70 A**). Chez les souris *Myd88<sup>L252P</sup>*, on observe une altération de cette structure avec la présence de régions denses qui marquent fortement l'hématoxyline (couleur bleu foncée). Si on observe ces régions de plus près, on remarque qu'elles sont composées d'une forte densité de petites cellules dont le noyau occupe la totalité du cytoplasme ; on peut ainsi établir que ces régions correspondent à des infiltrations de lymphocytes (**Figure 70 B**).



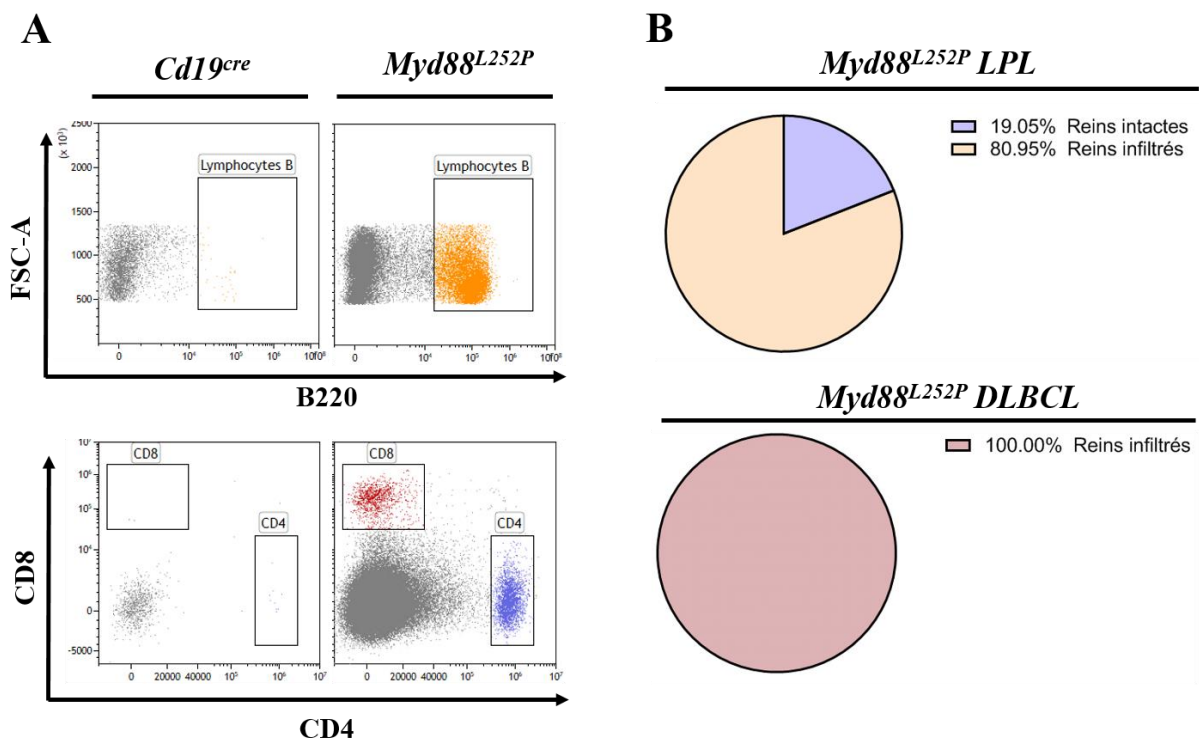
**Figure 70 : Histologie normale et pathologique du rein**

**A** : Coloration HES (Hématoxyline, Eosine, Safran) permettant de distinguer les structures fonctionnelles principales du rein : G (glomérule) ; TCD (Tubule contourné distal) ; TCP (tubule contourné proximal). **B** : Coloration HES (Hématoxyline, Eosine, Safran) démontrant la présence d'une infiltration massive de lymphocytes dans le rein chez les souris *Myd88<sup>L252P</sup>*.

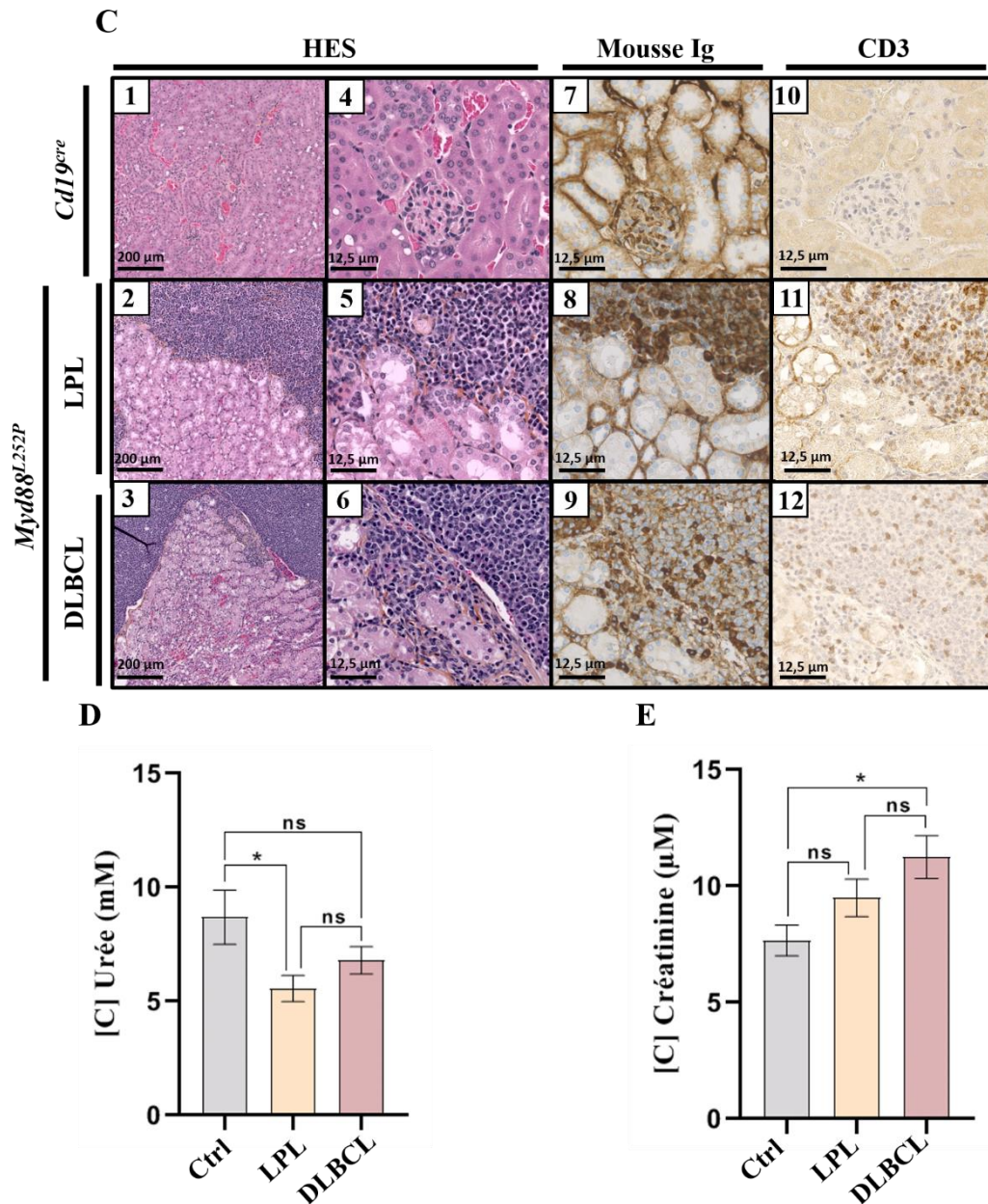
Cet infiltrat rénal a été caractérisé en cytométrie de flux. Nous avons tout d'abord confirmé nos observations faites en IHC à savoir qu'il n'y avait aucun infiltrat de ce type dans les reins de souris contrôles, alors que chez les souris *Myd88<sup>L252P</sup>*, ces infiltrats contenaient à la fois des LB tumoraux et des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (**Figure 71 A**). Après analyse des phénotypes, il s'avère que la majorité des souris présentant un LPL-like subissent un infiltrat rénal de ce type (80,95%) alors que 100% de souris atteintes de DLBCL-like ont une infiltration rénale (**Figure 71 B**).

L'immunohistochimie nous a ensuite permis de comparer ces deux phénotypes (**Figure 71 C1-C6**). A l'instar de ce que nous avons observé dans la rate, le marquage Mouse Ig montre une différence entre les populations LB qui colonisent les reins de souris LPL-like et ceux de souris DLBCL-like : dans les LPL-like, on retrouve un fort marquage cytoplasmique qui signe la présence de lymphoplasmocytes dans l'infiltrat, alors que dans le DLBCL-like ce marquage est pratiquement absent (**Figure 71 C7-C9**). De plus, un marquage anti-CD3 prouve d'une part l'absence de LT dans les reins sains (**Figure 71 C10**) et d'autre part il démontre que les infiltrats rénaux contiennent beaucoup moins de LT dans les DLBCL-like que dans les LPL-like, comme ce que nous avons montrés précédemment dans le cas des tumeurs primaires spléniques (**Figure 71 C11 et C12**). Enfin, afin d'évaluer la fonctionnalité des reins, nous avons dosé la concentration sérique de deux paramètres biologiques : l'urée et la créatinine. Pour ce qui est de l'urée, on distingue une diminution de sa concentration sérique dans les LPL-like et on ne retrouve qu'une tendance dans les DLBCL-like à cause de son caractère hétérogène (**Figure 71 D**). Pour ce qui est de la créatinine, sa concentration est significativement augmentée dans les DLBCL-like (**Figure 71 E**).

Les atteintes rénales secondaires sont fréquentes dans notre modèle *Myd88<sup>L252P</sup>*. La nature de l'infiltrat varie en fonction du phénotype de la tumeur primaire, et on retrouve associé les signes d'une néphrotoxicité qui semble accrue dans les cas de DLBCL-like par rapport aux LP-Like.





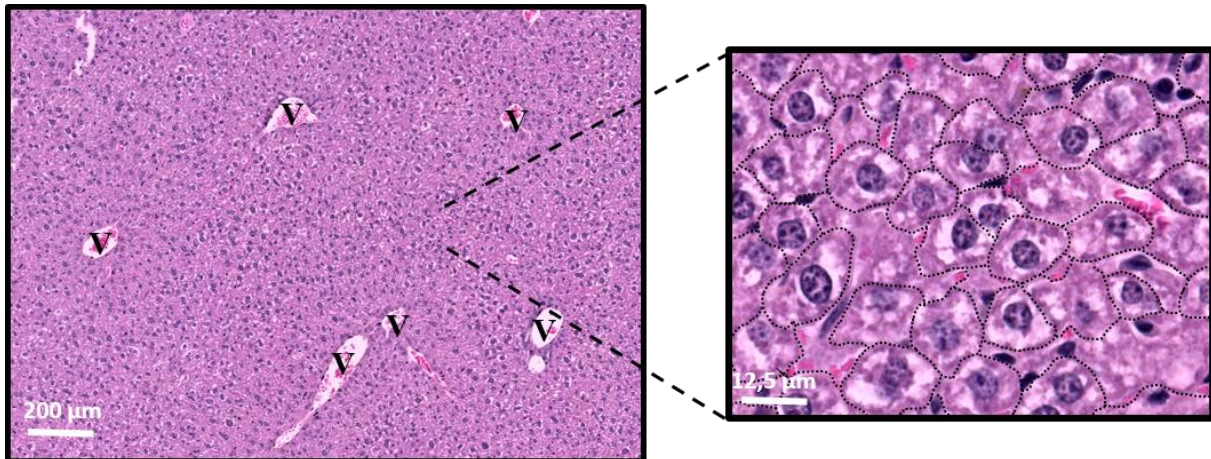


**Figure 71 : Histologie et biochimie comparative du rein entre souris LPL-like et DLBCL-like**

**A** : Marquage en cytométrie de flux sur broyat de reins démontrant la présence de LB B220<sup>+</sup> et de LT CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> uniquement chez les souris *Myd88<sup>L252P</sup>*. **B** : Proportions de souris *Myd88<sup>L252P</sup>* LPL et DLBCL présentant des infiltrations rénales. LPL n = 21 DLBCL n = 11. **C** : Immunohisto-chimie montrant des coupes de reins des 3 groupes *Cd19<sup>cre</sup>*, LPL et DLBCL colorées en HES sur plan large (C1-C3) et plan approfondi (C4 – C6). Marquage Mousse Ig révélant les LB et les lymphoplasmocytes sur coupe de chacun des 3 groupes (C7-C9) ; marquage anti-CD3 révélant la présence de lymphocytes T dans chacun des 3 groupes (C10-C12). **D** : Comparaison de la concentration sérique en urée entre les 3 groupes. **E** : Comparaison de la concentration sérique en créatinine entre les 3 groupes. n = 7.

## B. Altération de l'activité hépatique

Après avoir observé de fréquents cas d'infiltration tumorale dans les reins, nous nous sommes intéressés à un second site potentiel d'invasion tumorale : le foie. Le foie est un organe dont l'activité métabolique et enzymatique est primordiale pour l'organisme. Il est très richement vascularisé et est par conséquent un site d'invasion métastatique très fréquent dans de nombreux cancers. Au niveau de son architecture, le foie est un tissu homogène composé d'hépatocytes juxtaposés et traversés de nombreux capillaires sanguins. Les hépatocytes sont de grosses cellules possédant un noyau central qui présente des inclusions foncées, révélées en coloration HES (**Figure 72**).



**Figure 72 : Structure histologique du foie chez la souris**

Coloration HES (Hematoxyline, Eosine, Safran) sur coupe de foie de souris préalablement inclus en paraffine. Le foie présente une structure homogène composée d'hépatocytes et richement vascularisée, en témoigne la présence de nombreux vaisseaux sanguins (V). Les hépatocytes sont de grosses cellules possédant un noyau central d'aspect hétérogène.

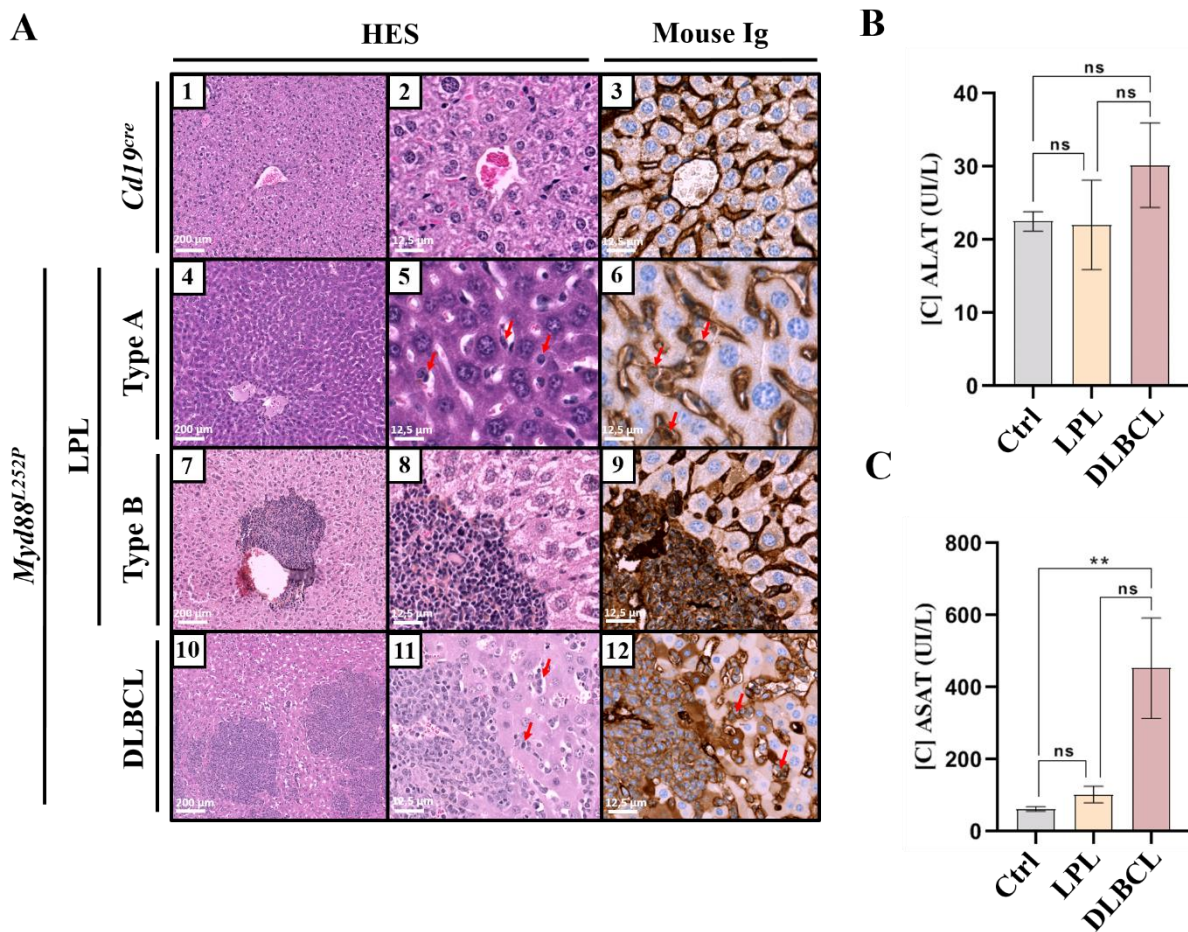
Chez nos souris *Myd88<sup>L252P</sup>*, nous observons une altération de cette architecture dans environ 70% des cas. La survenue de ce phénomène ne varie pas en fonction du phénotype LPL-like ou DLBCL-like de la tumeur primaire des animaux.

En revanche, nous observons plusieurs cas de figure différents :

- Chez certaines souris présentant un LPL-like, nous allons retrouver une infiltration dite de type A dans laquelle la structure du tissu est relativement conservée. En revanche, on remarque la présence fortement accrue de lymphoplasmocytes qui sont disséminés dans la partie interstitielle du tissu, entre les hépatocytes. Cette infiltration est détectée par immunohistochimie en alliant la coloration HES et le marquage Mouse Ig (**Figure 73 A4-6**).
- Dans d'autres cas de LPL-like, l'infiltration tumorale prend une forme différente (infiltration de type B). Les lymphoplasmocytes tumoraux ne sont plus disséminés dans le tissu, ils forment plutôt des amas denses qui se localisent essentiellement au niveau des vaisseaux sanguins (**Figure 73 A7-9**).
- Enfin pour ce qui est des souris présentant un DLBCL-like, elles peuvent ou non présenter une infiltration hépatique et leur haut grade tumoral ne présume pas de la

fréquence de ce phénomène. En revanche, lorsque ces animaux présentent une infiltration tumorale hépatique elle est généralement plus sévère que chez les LPL-like. Dans ce cas, on va retrouver des amas très conséquents de cellules tumorales qui envahissent tout le tissu et ne se limitent plus au pourtour des vaisseaux sanguins (**Figure 73 A10**). Qui plus est, on retrouve également une très grande quantité de cellules tumorales dans le tissu interstitiel de la même manière que dans l'infiltration de Type A ; à la différence que dans le cas des DLBCL-like les cellules infiltrées entre les hépatocytes ne sont pas isolées, elles forment plutôt des amas (**Figure 73 A11**). Enfin, le marquage Mouse Ig permet de démontrer que les cellules infiltrées dans le foie dans les cas de DLBCL-like sont de gros lymphocytes négatifs pour le marquage cytosolique aux immunoglobulines (**Figure 73 A12**).

Deux paramètres biologiques ont été dosés dans le sérum des animaux afin d'apprécier l'état fonctionnel du foie. L'alanine amino-transférase (ALAT) et l'aspartate amino-transférase (ASAT) sont deux enzymes sécrétées par les hépatocytes et ont un rôle essentiel dans le métabolisme hépatique. Si la concentration sérique en ALAT ne varie pas de façon significative, on observe malgré tout une tendance à l'augmentation qui s'accroît dans le groupe de souris atteintes de DLBCL (**Figure 71 B**). Pour ce qui est de l'ASAT, on détecte une concentration sérique augmentée d'un facteur 5 uniquement pour le groupe de DLBCL-like (**Figure 73 C**).



### Figure 73 : Caractérisation des atteintes hépatiques dans le modèle *Myd88<sup>L252P</sup>*

**A1-2** : Coloration HES sur coupe de foie normal de souris *Cd19<sup>cre</sup>* inclus en paraffine. **A3** : Marquage Mouse Ig sur coupe de foie normal de souris *Cd19<sup>cre</sup>*. **A4-5** : Coloration HES sur coupe de foie de souris *Myd88<sup>L252P</sup>* à phénotype LPL montrant une infiltration de type A : nombreux lymphocytes disséminés dans le tissu interstitiel entre les hépatocytes. **A6** : Marquage Mouse Ig montrant la présence de lymphoplasmocytes sur coupe de foie de souris *Myd88<sup>L252P</sup>* atteinte d'un LPL avec infiltration de Type A. **A7-8** : Coloration HES sur coupe de foie de souris *Myd88<sup>L252P</sup>* atteinte d'un LPL avec infiltration de type B : les cellules tumorales forment des amas denses à la périphérie des vaisseaux sanguins. **A9** : Marquage Mouse Ig démontrant la présence d'amas denses de lymphoplasmocytes dans les foies de souris *Myd88<sup>L252P</sup>* avec infiltration de type B. **A10-11** : Coloration HES sur coupe de foie de souris *Myd88<sup>L252P</sup>* à phénotype DLBCL. Les cellules tumorales forment de très gros amas qui s'étendent bien au-delà des vaisseaux sanguins. **A12** : Marquage Mouse Ig montrant d'une part que les cellules tumorales infiltrées sont de grandes cellules négatives au marquage intracellulaire et d'autre part que ces cellules envahissent le tissu interstitiel en plus de former de gros amas dans le tissu. **B** : dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT) dans le sérum et comparaison entre les 3 groupes *Cd19<sup>cre</sup>* (n = 6), LPL-like (n = 7) et DLBCL-like (n = 6). **C** : dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT) dans le sérum et comparaison entre les 3 groupes *Cd19<sup>cre</sup>* (n = 6), LPL-like (n = 7) et DLBCL-like (n = 6).

# Discussion et Perspectives

Comme détaillé en introduction de ce travail, plusieurs études récentes menées sur le microenvironnement immun des lymphomes non-Hodgkiniens B tendent à démontrer que ce dernier est dérégulé, participant ainsi au développement de la maladie (Görgün et al., 2005; Hilchey et al., 2007; Palma et al., 2017; Riches et al., 2013; Z.-Z. Yang et al., 2012).

Cependant durant les 10 dernières années, peu de travaux s'intéressent à ce phénomène dans le cadre de la maladie de Waldenström et par conséquent les connaissances que nous en avons sont encore limitées à de la pure description (Cholujova et al., 2023; Jalali et al., 2018; Kaushal et al., 2021; Sacco et al., 2023; Sun et al., 2022).

Ce travail de thèse s'appuie sur l'étude d'un modèle murin pré-clinique, le modèle *Myd88*<sup>L252P</sup> développé au laboratoire CRIBL de Limoges. Les animaux transgéniques expriment la mutation murine *Myd88*<sup>L252P</sup>, qui est orthologue à la mutation L265P humaine retrouvée dans 90% des cas de MW (Poulain et al., 2013; Treon et al., 2012). Cette expression est restreinte au lignage B grâce au système Cre-Lox, qui permet une expression CD19 dépendante dans notre cas. Ce modèle ayant été caractérisé préalablement par l'équipe, il est un modèle pertinent pour l'étude de la MW puisque les animaux développent un lymphome qui y ressemble fortement, alliant progression indolente d'un clone lymphoplasmocytaire et présence d'un pic d'IgM sérique (Ouk et al., 2021).

## **A. Discussion concernant le micro-environnement tumoral de la MW**

### **1. Immunosuppression des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>**

Nous avons caractérisé les principales populations lymphocytaires spléniques à savoir les lymphocytes B, lymphocytes T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> et lymphocytes NK. Puisque nous sommes en présence d'un lymphome B, nous observons de manière logique une augmentation des lymphocytes B qui est associée à une perte partielle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (**Figure 47 A et J**). Concernant les lymphocytes NK, ils sont quasi totalement perdus dans notre modèle murin et n'ont donc pas été étudiés plus en détail dans ce travail. Cependant, cette information concorde totalement avec les données de la littérature qui démontrent une perte des lymphocytes NK chez les patients (Cholujova et al., 2023; Sun et al., 2022).

Nous retrouvons dans notre modèle un phénotype activé et immunosuppresseur des lymphocytes B tumoraux qui surexpriment les marqueurs CD80/CD86 et PD-L1. De plus, nous retrouvons une perte partielle de l'expression de surface du CMH-II, signe d'une certaine perte d'immunogénéicité des cellules tumorales (**Figure 48 A-D**). Nous confirmons par ailleurs ce caractère immunosuppresseur en montrant que les cellules tumorales sécrètent de grandes quantités de cytokines immunosuppressives (IL-10) et inflammatoires (IL-6, TNFα) (**Figure 48 E-G**). Ces données rejoignent les observations faites précédemment chez le patient (Cholujova et al., 2023; Grote et al., 2013; Jalali et al., 2018)

Ces résultats nous ont donc poussé à étudier plus en détail les populations lymphocytaires T. Premièrement, on décèle les vestiges d'une réaction immune anti-tumorale d'abord sur le plan architectural de la rate. En temps normal, les LB et les LT spléniques constituent deux compartiments proches mais distincts l'un de l'autre, alors que dans le cas de notre modèle murin les LB et les LT sont distribués de façon très homogène (**Figure 49**). Ce changement traduit une migration active des LT vers les LB tumoraux, manifestement pour tenter d'endiguer la prolifération de ces derniers. Qui plus est, les LT aussi bien CD4<sup>+</sup> que CD8<sup>+</sup>

présentent tous les signes d'une réaction immune anti-tumorale de type Th1, avec une très forte accumulation des sous-populations effectrices au détriment des LT mémoires et naïfs (**Figure 50 A-B**) et une surexpression de l'IFN $\gamma$  (**Figure 50 D et H**). Cependant, ces cellules produisent également de grandes quantités de TNF $\alpha$  et d'IL-10, qui sont plutôt associées au type Th2 et à la réponse immune humorale. Ce phénomène de transition d'une réponse T Th1 vers une réponse Th2 est bien décrit, et on parle de « Shift Th1-Th2 ». Cette transition anormale des LT induit un biais dans la réponse anti-tumorale, la présence de LT polarisés Th2 étant inefficace contre le développement de la tumeur. Plusieurs travaux traitent de ce biais de polarisation des LT dans différents cancers solides et démontrent qu'il favorise le développement tumoral et est de mauvais pronostic (Bais et al., 2005; Hatanaka et al., 2000; H. L. Lee et al., 2019). Cependant, il s'agit ici d'une des premières observations de ce phénomène dans le contexte d'un lymphome B indolent.

Deuxièmement, nous avons établi que dans notre modèle, un phénomène d'épuisement des LT avait bien lieu. Ces derniers surexpriment les marqueurs de surface PD-1, CTLA-4, TIM-3 et LAG-3 ce qui signe l'existence d'un phénotype épuisé, qui est confirmé sur le plan fonctionnel par la sécrétion accrue de TNF $\alpha$  et d'IL-10 (**Figure 51**).

Il semble manifestement que la forte progression d'un phénotype épuisé des LT soit également à l'origine de l'échec de cette réponse immune anti-tumorale. Peut-être les LT ont-ils été exposés à de trop grandes quantités d'antigènes pendant trop longtemps, toujours est-il que nous confirmons dans notre modèle ce qui avait été suspecté chez les patients atteints de MW : la présence de la protéine MYD88 mutée constitutivement active semble provoquer l'émergence d'un phénotype tumoral immunosuppresseur responsable d'un phénomène d'épuisement des LT sur le long terme (Cholujova et al., 2023). Par ailleurs, il serait particulièrement intéressant de déterminer de manière exacte quels sont les antigènes reconnus par les LT épuisés dans notre modèle, cela permettrait peut-être de dresser une liste d'antigènes favorisant l'épuisement des LT et l'échappement tumoral. Aller rechercher ces antigènes chez le patient permettrait d'apporter un élément prédictif de l'épuisement des LT, et ils pourraient également constituer de nouvelles cibles thérapeutiques puisqu'on peut imaginer que bloquer ces antigènes permettrait de prolonger l'efficacité de la réponse immune anti-tumorale.

## **2. Caractérisation des LT régulateurs**

A l'instar des observations faites par Sacco A. *et al.* chez des patients atteints de MW, nous démontrons dans notre modèle murin une augmentation de la population des Tregs au niveau des tumeurs spléniques (**Figure 52 A**) (Sacco et al., 2023). Cependant, nous précisons un peu plus ces résultats en allant plus loin dans la caractérisation des Tregs.

Les Tregs sont par nature des cellules immunosuppressives, et la dérégulation de leurs fonctions est reconnue comme impliquée dans de nombreux cancers. Nous montrons par ailleurs qu'en plus d'être plus nombreux, les Tregs issus de tumeurs MW-like surexpriment les cytokines immunosuppressives (IL-10) et inflammatoires (IL-6) (**Figure 52 B et C**).

En se basant sur les travaux de W. Zhong *et al.* (Zhong et al., 2021), nous avons découvert dans notre modèle murin l'existence d'une population de Tregs TIM-3<sup>+</sup> qui s'avère être plus importante que chez les animaux contrôles (**Figure 52 D**). Ces Tregs TIM-3<sup>+</sup> sécrètent de plus grandes quantités d'IL-6 et d'IL-10 que ne le font les Tregs TIM-3<sup>-</sup>, et il semblerait donc qu'ils possèdent des caractéristiques immunosuppressives non négligeables. Afin de quantifier plus précisément le rôle de cette population de cellules en particulier, il serait très intéressant de confronter le développement tumoral *Myd88*<sup>L252P</sup> dépendant en présence et en absence de

ces cellules (via génération d'un modèle TIM-3 KO à expression FoxP3 dépendante par exemple). Qui plus est, l'intérêt de cibler les Tregs en thérapie n'est pas à négliger, puisque A. Sacco *et al.* viennent de démontrer qu'il était possible de réverser l'effet immunosuppresseur des Tregs via un traitement affectant l'axe CD40/CD40L dans un modèle murin transgénique développant des lymphomes qui ressemblent à la MW (Sacco et al., 2023).

## **B. Discussion concernant les perspectives thérapeutiques de l'échappement tumoral dans la MW**

### **1. Ibrutinib® et combinaisons thérapeutiques**

L'Ibrutinib® est un inhibiteur de l'enzyme BTK qui est par conséquent spécifique des LB. Il est très largement utilisé dans le traitement des lymphomes B, MW y compris. Dans le but de mieux préciser la coopération qui s'opère entre les signalisations MYD88 et BTK, une cohorte de 10 souris a été traitée à l'Ibrutinib® pendant 42 jours. A l'issue de ce traitement 2 groupes d'animaux sont distingués en fonction de leur réponse ou non à l'inhibiteur (**Figure 53**). Le niveau d'expression des quatre marqueurs d'épuisement PD-1, CTLA-4, TIM-3 et LAG-3 à la surface des LT est comparé entre ces deux groupes répondeurs et non-répondeurs. Il s'avère que dans le groupe répondeur, on distingue de manière générale une diminution d'expression de ces marqueurs que l'on ne retrouve pas du tout dans le groupe non-répondeur (**Figure 55**). Par ailleurs, nous avons également démontré via une expérimentation *ex vivo* que l'Ibrutinib® permet d'augmenter le niveau de prolifération des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (**Figure 57 B-D et 58 B-D**).

Depuis 2017, plusieurs travaux montrent que l'Ibrutinib® est capable de restaurer au moins partiellement l'activité des LT en réduisant leur caractère épuisé. Cependant, ces études traitent en grande majorité de patients atteints de LLC, et ce phénomène n'a encore jamais été identifié dans le cadre de la MW (Davis et al., 2021; Liu et al., 2022; Long et al., 2017; Parry et al., 2019; Solman et al., 2020). Bien que des données supplémentaires sur la sécrétion cytokinique des LT par exemple seraient nécessaires pour compléter ces résultats, nous démontrons pour la première fois dans notre modèle murin de MW l'existence d'un phénomène de restauration de l'épuisement des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> suite à un traitement Ibrutinib®. Ces observations confortent les données obtenues par Cholujova *et al.* chez les patients atteints de MW.

Malgré tout, le rôle exact de l'Ibrutinib® dans ce phénomène de restauration reste encore à déterminer. *In vivo*, l'expression du CD80 à la surface des LB augmente alors que celle du CD86 diminue fortement chez le groupe répondeur, mais il semble peu probable que cela suffise à restaurer l'activité des LT d'autant plus que nous ne remarquons aucun changement au niveau du caractère immunosuppresseur des LB tumoraux, dont l'expression de PD-L1 et la perte du CMH-II restent stables malgré l'efficacité du traitement. Cependant dans cette expérience le niveau d'expression de PD-L1 est mesuré uniquement sur les LB B220<sup>+</sup>. Or, notre expérimentation de traitement Ibrutinib® sur splénocytes *ex vivo* pourrait nous apporter quelques éléments de réponse supplémentaires. Lors de cette expérience, la distinction d'expression de PD-L1 est faite entre les LB B220<sup>+</sup> CD138<sup>-</sup>, les plasmablastes B220<sup>+</sup> CD138<sup>+</sup> et les plasmocytes B220<sup>-</sup> CD138<sup>+</sup>. Il se trouve d'une part que l'expression de PD-L1 augmente lors de la différenciation plasmocytaire ; mais d'autre part et surtout, nous avons déterminé que l'Ibrutinib® était capable de réduire l'expression de PD-L1 uniquement chez les plasmocytes, et qu'il n'avait pas d'effet chez les LB / plasmablastes (**Figure 56 F-H**). Il

semblerait donc que dans un lymphome lymphoplasmocytaire tel que la MW, ce soit essentiellement les plasmocytes qui soient responsables de l'épuisement des LT, et que c'est en agissant sur l'expression de PD-L1 à la surface des plasmocytes que l'Ibrutinib® pourrait permettre la restauration de l'activité T.

Quoiqu'il en soit, la capacité de l'Ibrutinib® à réduire partiellement l'épuisement T laisse à penser qu'il serait très opportun d'utiliser ce mécanisme en thérapie comme point d'appui pour relancer la réaction immune T anti-tumorale et ainsi potentialiser l'effet de l'inhibiteur. Afin de confronter cette théorie, nous avons testé *ex vivo* sur des splénocytes de souris *Myd88<sup>L252P</sup>* une combinaison thérapeutique alliant Ibrutinib® + anti-PD-1. Les résultats obtenus sont comparés à un traitement Ibrutinib® seul. On décèle bien un effet additif de l'anti-PD-1 vis-à-vis de l'Ibrutinib® seul : au vu de la quasi perte d'expression de PD-1 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> on peut supposer que l'anticorps utilisé induit très efficacement l'internalisation du récepteur. De plus on distingue une perte d'expression de CTLA-4 uniquement avec la combinaison thérapeutique (**Figures 57 E et F, 58 E et F**). L'anti-PD-1 n'a cependant pas d'effet supplémentaire ni sur la réduction de la prolifération des LB tumoraux ni sur l'augmentation de LT proliférants (**Figure 56 B-D, Figure 57 B-D, Figure 58 B-D**). Ceci n'est pas étonnant au regard de la durée du traitement *ex vivo* qui n'est que de 72h. Malgré tout, ces résultats montrent la naissance d'un effet synergique de l'Ibrutinib® avec l'anti-PD-1 qui ensemble sont capables de restaurer l'épuisement des LT plus efficacement que l'Ibrutinib® seul. Afin de préciser ces résultats, il serait par conséquent très intéressant de tester cette combinaison thérapeutique *in vivo* cette fois-ci.

A plus long terme on peut facilement imaginer l'intérêt d'une telle combinaison chez le patient, qui permettrait par exemple d'optimiser le traitement Ibrutinib® peut-être en augmentant le taux de patients répondeurs ou bien en permettant de limiter les doses d'Ibrutinib® tout en gardant la même efficacité, réduisant ainsi les effets indésirables de la molécule.

## **2. Inefficacité du traitement anti-PD-L1**

Comme dans beaucoup de pathologies cancéreuses, le traitement à l'anti-PD-L1 s'est montré inefficace et n'a pas permis de restreindre le développement tumoral chez 3 animaux *Myd88<sup>L252P</sup>* traités (**Figure 59**). Afin d'expliquer pourquoi le traitement anti-PD-L1 ne fonctionne pas alors que l'anti-PD-1 semble si prometteur, nous nous sommes basés sur des travaux préalablement réalisés au laboratoire qui démontrent la capacité des microvésicules extracellulaires à interférer avec les immunothérapies (Aitamer et al., 2021). Ces microvésicules feraient office de leurres surexprimant PD-L1 à leur surface, qui captent l'anticorps anti-PD-L1 et l'empêcheraient d'aller cibler les cellules tumorales.

Au cours de ce travail réalisé par Mina Chabaud, étudiante de Master 2 encadrée au cours de ma thèse ; nous avons tout d'abord isolé et caractérisé dans le sérum de nos souris transgéniques des microvésicules extra-cellulaires qui correspondent à des exosomes puisqu'elles possèdent une taille comprise entre 30 et 100 nm (**Figure 60 A**) et qu'elles possèdent le marqueur spécifique ALIX (**Figure 60 B**). L'analyse de la concentration en PD-L1 en Western Blot montre la présence de 3 isoformes de la molécule dans les exosomes (30, 35 et 55 kDa). A noter que les formes à 30 et 55 kDa sont significativement augmentées dans les exosomes de souris mutées, et que la forme à 35 kDa aurait tendance à l'être également



(**Figure 60 C-F**). Ces formes de haut poids moléculaire sont des formes glycosylées de PD-L1. Cette glycosylation est connue pour stabiliser PD-L1 à la surface des membranes.

En résumé, il semble effectivement que les exosomes circulants dans le sérum des souris *Myd88* mutées possèdent plus de PD-L1 que chez les souris contrôles. Grâce à ce travail sur notre modèle murin, nous avons identifié un nouveau mécanisme d'échappement immunitaire qui pourrait être impliqué dans le développement de la MW. Cependant, il est encore trop tôt pour se prononcer concernant l'implication de ces vésicules dans la résistance au traitement anti-PD-L1. Malgré tout, la technique d'isolation et de caractérisation des micro-vésicules sériques est à présent au point et permettra à l'avenir des tests fonctionnels visant à démontrer notre hypothèse. En conséquence, il serait tout à fait envisageable d'isoler des micro-vésicules du sérum de souris *Myd88*<sup>L252P</sup> pour les remettre en culture avec les LT épuisés de ces mêmes animaux, dans le but de voir si ces vésicules seraient capables à elles-seules de maintenir le phénotype d'épuisement.

### **3. Traitements anti-IL-6R et anti-IL-10R**

Ayant identifié une forte sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-6) et immunosuppressives (IL-10) dans le microenvironnement tumoral (provenant des LB, LT et Tregs), et au vu des propriétés immunosuppressives de ces deux cytokines ; nous avons testé *ex vivo* deux traitements bloquant respectivement l'IL-6R et l'IL-10R afin d'observer un possible effet bénéfique sur la réponse immune anti-tumorale. Ce traitement a été réalisé sur 72h. Il faut d'abord noter qu'aucun de ces 2 anticorps ne semble avoir d'effet sur la prolifération et l'expression de PD-L1 des LB tumoraux (**Figure 61**). Si le traitement anti-IL6R ne semble pas non plus produire d'effet ni sur les LT CD4<sup>+</sup> ni sur les LT CD8<sup>+</sup>, on remarque cependant plusieurs choses intéressantes avec le traitement IL-10R. Le blocage de l'IL-10R semble induire une diminution de l'expression de CTLA-4 chez les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, bien que l'on observe une activation de la prolifération uniquement chez les LT CD8<sup>+</sup> (**Figures 62 et 63**).

D'une part cette expérience confirme le caractère immunosuppresseur de l'IL-10 dans notre modèle, puisque le fait de bloquer son action permet d'activer la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> et de réduire l'expression de CTLA-4 par les LT en général. D'autre part, ce travail nous montre qu'il y aurait un fort potentiel pour l'anti-IL-10R et il encourage à tester à l'avenir cet anticorps *in vivo* sur notre modèle préclinique seul ou bien combiné à l'Ibrutinib®.

### **C. Discussion concernant la transformation de la MW et le microenvironnement immun**

Si des cas de MW transformées en lymphomes agressifs type DLBCL sont observés cliniquement, les mécanismes mis en jeu lors de ce phénomène sont encore mal connus. Lors de la caractérisation de notre modèle *Myd88*<sup>L252P</sup>, nous avons en réalité observé 2 phénotypes tumoraux différents chez les animaux : Une tumeur de type LPL ressemblant à la MW avec une hétérogénéité de cellules tumorales allant du lymphocyte B au plasmocyte ; et une tumeur de type DLBCL avec de grandes cellules B et absence de lymphoplasmocytes (**Figure 64**). Le phénotype DLBCL étant retrouvé chez des animaux en moyenne plus âgés, nous supposons que ces tumeurs DLBCL sont en fait issues de LPL transformés en lymphomes agressifs.

Afin d'étayer cette hypothèse l'équipe mène deux approches de front : un axe du travail s'intéresse aux mutations somatiques et à l'expression génique comparative entre cas de LPL et de DLBCL ; et un second axe initié par mes soins tente d'identifier un rôle du microenvironnement immun dans ce phénomène de transformation.

Si quelques changements s'opèrent au niveau des cellules tumorales entre LPL et DLBCL, ils sont essentiellement en lien avec leur caractère prolifératif. Aussi on retrouve une augmentation du CD80 et du CD86, signe que les LB sont plus actifs dans le DLBCL que dans le LPL. Dans les DLBCL on distingue une prédominance des LB IgM<sup>+</sup> plus marquée que dans les LPL, qui peut s'expliquer par la chute drastique du nombre de LB IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> dans les DLBCL. Qui plus est, le nombre de LB switchés IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> augmente fortement dans les cas de DLBCL. La sélection des LB IgM<sup>+</sup> paraît plus forte encore dans les DLBCL que dans les LPL, malgré tout il semblerait que la diversité isotipique des LB soit accrue dans les DLBCL ce qui peut laisser penser à une plus grande instabilité génomique.

En revanche, les expressions de PD-L1 et du CMH-II des LB issus de DLBCL et de LPL restent les mêmes quel que soit le phénotype (**Figure 65**).

En comparant l'état des LT entre tumeurs LPL et DLBCL, nous observons plusieurs différences. Premièrement, le pourcentage de LT CD3<sup>+</sup> déjà réduit chez les LPL s'effondre totalement dans les DLBCL. Dans ces tumeurs agressives, les LT ne sont plus regroupés en amas, ils ne sont plus qu'une population de cellules isolées distribuées de façon éparse et homogène dans le tissu tumoral (**Figure 66**).

En terme de phénotype, les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sont clairement suractivés avec une augmentation des LT effecteurs au profit des LT naïfs et mémoires plus marqués encore que dans les LPL (**Figure 67**). Qui plus est, les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> issus de tumeurs DLBCL montrent un phénotype plus épuisé encore que dans les LPL, puisqu'on retrouve une augmentation de l'expression des marqueurs PD-1, CTLA-4, TIM-3 et LAG-3 chez ces cellules (**Figure 68**).

Dans les tumeurs DLBCL on a donc une modification de la population tumorale puisque les lymphoplasmocytes typiques du LPL laissent place à une population composée quasi-exclusivement de LB. Ces cellules sont suractivées, et sont majoritairement IgM<sup>+</sup> ou bien switchées. Bien que les LB issus de DLBCL ne présentent pas un caractère plus immunosuppresseur que ceux retrouvés dans les LPL, les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> des DLBCL sont bien plus endommagées avec une diminution importante de leur nombre et la survenue d'un phénotype épuisé beaucoup plus marqué. Peut-être faudrait-il analyser l'expression de PD-L1 de manière plus précise au sein des sous-populations CD19<sup>+</sup>, afin de déterminer si son augmentation d'expression n'est pas restreinte à un compartiment ou un autre (plasmocytes par exemple).

Ce constat nous permet d'apporter quelques éléments de réponse en faveur de l'idée que les phénotypes DLBCL observés chez nos animaux sont bien issus de LPL transformés. En effet, compte tenu de la stabilité du phénotype immunosuppresseur des cellules tumorales entre LPL et DLBCL on peut d'ores et déjà dire que l'aggravation du phénotype épuisé des LT observée chez les DLBCL n'est pas due à une augmentation de la capacité des LB à éteindre la réponse immune. Cette augmentation de l'épuisement des LT serait plutôt due à une stimulation chronique excessive et répétée sur un plus long terme que pour les LPL puisque les animaux présentant un DLBCL sont plus âgés.

En synthèse, nous pouvons par ces résultats affirmer que le phénomène d'épuisement des LT est plus marqué chez les animaux présentant un DLBCL que chez ceux atteints de LPL, ce qui étaye l'idée que les cas de DLBCL soient bien des LPL transformés. Cependant, est-ce que la transformation est provoquée par un effondrement total de la réponse immune anti-tumorale, ou bien est-ce que c'est le DLBCL qui provoque ce profond épuisement des

LT ? Nous ne pouvons pas actuellement répondre à cette question. Pour se faire, il serait particulièrement intéressant de réaliser des tests de développement tumoraux dans différents contextes immunosupprimés (sur fond génétique CD3-KO notamment) afin de déterminer si cela induit la survenue du phénotype DLBCL plus rapidement ou non.

Quoiqu'il en soit, au regard des modifications drastiques subies par les cellules tumorales entre les phénotypes LPL et DLBCL il est clair que l'analyse moléculaire comparative entre ces deux populations apportera des éléments de réponse complémentaires.

#### **D. Discussion concernant les atteintes secondaires rénales et hépatiques**

Au cours de ce travail, nous avons également pu décrire des phénomènes d'invasions tumorales secondaires au niveau des reins et du foie de nos animaux. Les néphropathies et hépatomégalies étant également retrouvées chez certains patients atteints de MW (Uppal et al., 2019), notre modèle pourrait par conséquent constituer un bon modèle préclinique pour en apprendre plus sur les mécanismes mis en jeu.

En ce qui concerne les infiltrations rénales notamment, du fait qu'elles soient retrouvées de manière quasi-systématique chez nos souris il serait très opportun d'aller plus dans le détail en recherchant la présence de maladies de dépôt par exemple.

Qui plus est, on distingue des signes de néphrotoxicité et d'hépatotoxicité beaucoup plus profonds dans les cas de DLBCL avec l'augmentation de la concentration sérique en créatinine et en ASAT notamment (**Figures 71 et 73**). Par ailleurs, il semble que le phénotype des cellules infiltrées dans les reins et/ou le foie corresponde au phénotype de cellules tumorales primaires ; autrement dit lorsque dans la rate on a développement d'un DLBCL, on retrouve dans le foie et les reins de grandes cellules B et peu voire pas du tout de plasmocytes. Malgré cette concordance apparente entre les tumeurs secondaires et primaires, il serait en mon sens très pertinent d'aller les comparer au niveau moléculaire, cela pourrait potentiellement permettre de trouver des modifications génétiques qui permettraient d'expliquer et de comprendre ces phénomènes d'infiltration.

## Conclusion

---

Lors de ces travaux réalisés durant ma thèse, nous avons pu démontrer que le modèle murin *Myd88*<sup>L252P</sup> était un modèle pertinent pour l'étude fondamentale mais également pré-clinique du microenvironnement immunitaire dans le cadre de la MW.

Dans ce modèle, nous avons pu mettre en évidence le caractère immunosuppresseur des cellules tumorales ainsi que l'implication de différents mécanismes d'échappement immunitaire tels que l'épuisement des LT, la présence anormale de Tregs TIM-3<sup>+</sup> ou encore la circulation d'exosomes chargés en PD-L1. A présent, il semblerait tout à fait judicieux d'aller rechercher ces phénomènes chez les patients atteints de MW.

Lors de tests pré-cliniques, nous avons démontré que l'Ibrutinib® avait des propriétés indirectes en réduisant l'épuisement des LT. Qui plus est, nous espérons par nos travaux avoir prouvé tout l'intérêt que peuvent représenter des thérapies ciblant le micro-environnement immunitaire (anti-PD-1, anti-IL-10R) dans le traitement de la MW. Ainsi, réaliser des traitements *in vivo* chez nos animaux en testant différentes combinaisons thérapeutiques (Ibrutinib® + anti-PD-1, Ibrutinib® + anti-TIM-3, Ibrutinib® + anti-IL-10, ...) permettrait très certainement d'offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les patients atteints de MW.

Bien que des données supplémentaires soient nécessaires pour comprendre pleinement les mécanismes en jeu lors de la transformation de la MW en lymphome agressif, nous démontrons par ces travaux que le micro-environnement immunitaire est très certainement impliqué une fois de plus.

Enfin, la forte fréquence d'infiltrations rénales et hépatiques que nous avons identifiées chez nos animaux pourra à l'avenir permettre d'étudier en détail ces événements qui sont plus rares chez les patients.

## Références bibliographiques

---

- Aitamer, M., Akil, H., Vignoles, C., Branchaud, M., Abraham, J., Gachard, N., Feuillard, J., Jauberteau, M.-O., Shirvani, H., Troutaud, D., & Bentayeb, H. (2021). CD20 expression, TrkB activation and functional activity of diffuse large B cell lymphoma-derived small extracellular vesicles. *British Journal of Cancer*, *125*(12), 1687-1698. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01611-7>
- Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Araujo, I. B. de O., Berti, E., Bhagat, G., Borges, A. M., Boyer, D., Calaminici, M., Chadburn, A., Chan, J. K. C., Cheuk, W., Chng, W.-J., Choi, J. K., Chuang, S.-S., Coupland, S. E., Czader, M., Dave, S. S., ... Xiao, W. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours : Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, *36*(7), 1720-1748. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>
- Albero, R., Enjuanes, A., Demajo, S., Castellano, G., Pinyol, M., García, N., Capdevila, C., Clot, G., Suárez-Cisneros, H., Shimada, M., Karube, K., López-Guerra, M., Colomer, D., Beà, S., Martín-Subero, J. I., Campo, E., & Jares, P. (2018). Cyclin D1 overexpression induces global transcriptional downregulation in lymphoid neoplasms. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(9), 4132-4147. <https://doi.org/10.1172/JCI96520>
- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore, T., Hudson, J., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G., ... Staudt, L. M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, *403*(6769), 503-511. <https://doi.org/10.1038/35000501>
- Alt, F. W., Yancopoulos, G. D., Blackwell, T. K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., & Baltimore, D. (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *The EMBO Journal*, *3*(6), 1209-1219. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb01955.x>
- Alves-Pereira, C. F., de Freitas, R., Lopes, T., Gardner, R., Marta, F., Vieira, P., & Barreto, V. M. (2014). Independent recruitment of Igh alleles in V(D)J recombination. *Nature Communications*, *5*, 5623. <https://doi.org/10.1038/ncomms6623>
- Aribi, M. (2020). Immunogenetic Aspect of B-Cell Antigen Receptor Diversity Generation. In *Normal and Malignant B-Cell*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90637>
- Attanavanich, K., & Kearney, J. F. (2004). Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *172*(2), 803-811. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.803>
- Azizi, G., Yazdani, R., & Mirshafiey, A. (2015). Th22 cells in autoimmunity : A review of current knowledge. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, *47*(4), 108-117.
- Baba, N., Rubio, M., Kenins, L., Regairaz, C., Woisetschlager, M., Carballido, J. M., & Sarfati, M. (2012). The aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand VAF347 selectively acts on monocytes and naïve CD4(+) Th cells to promote the development of IL-22-secreting Th cells. *Human Immunology*, *73*(8), 795-800. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.05.002>

- Bais, A. G., Beckmann, I., Lindemans, J., Ewing, P. C., Meijer, C. J. L. M., Snijders, P. J. F., & Helmerhorst, T. J. M. (2005). A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *Journal of Clinical Pathology*, *58*(10), 1096-1100. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.025072>
- Balabanian, K., Lagane, B., Pablos, J. L., Laurent, L., Planchenault, T., Verola, O., Lebbe, C., Kerob, D., Dupuy, A., Hermine, O., Nicolas, J.-F., Latger-Cannard, V., Bensoussan, D., Bordigoni, P., Baleux, F., Le Deist, F., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., & Bachelier, F. (2005). WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood*, *105*(6), 2449-2457. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2289>
- Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., & Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity*, *17*(3), 341-352. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00389-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00389-8)
- Banerjee, H., Nieves-Rosado, H., Kulkarni, A., Murter, B., McGrath, K. V., Chandran, U. R., Chang, A., Szymczak-Workman, A. L., Vujanovic, L., Delgoffe, G. M., Ferris, R. L., & Kane, L. P. (2021). Expression of Tim-3 drives phenotypic and functional changes in Treg cells in secondary lymphoid organs and the tumor microenvironment. *Cell Reports*, *36*(11), 109699. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109699>
- Banwait, R., Aljawai, Y., Cappuccio, J., McDiarmid, S., Morgan, E. A., Leblebjian, H., Roccaro, A. M., Laubach, J., Castillo, J. J., Paba-Prada, C., Treon, S., Redd, R., Weller, E., & Ghobrial, I. M. (2015). Extramedullary Waldenström macroglobulinemia. *American Journal of Hematology*, *90*(2), 100-104. <https://doi.org/10.1002/ajh.23880>
- Bassing, C. H., Swat, W., & Alt, F. W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*, *109 Suppl*, S45-55. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00675-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00675-x)
- Baumgarth, N. (2004). B-cell immunophenotyping. *Methods in Cell Biology*, *75*, 643-662. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(04\)75027-x](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(04)75027-x)
- Bazzaz, J. T., Amoli, M. M., Taheri, Z., Larijani, B., Pravica, V., & Hutchinson, I. V. (2014). TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  gene variation and genetic susceptibility to type 1 diabetes and its microangiopathic complications. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, *13*, 46. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-13-46>
- Benet, Z., Jing, Z., & Fooksman, D. R. (2021). Plasma cell dynamics in the bone marrow niche. *Cell Reports*, *34*(6), 108733. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108733>
- Berentsen, S. (2009). Cold agglutinin-mediated autoimmune hemolytic anemia in Waldenström's macroglobulinemia. *Clinical Lymphoma & Myeloma*, *9*(1), 110-112. <https://doi.org/10.3816/CLM.2009.n.030>
- Beyer, M., Abdullah, Z., Chemnitz, J. M., Maisel, D., Sander, J., Lehmann, C., Thabet, Y., Shinde, P. V., Schmidleithner, L., Köhne, M., Trebicka, J., Schierwagen, R., Hofmann, A., Popov, A., Lang, K. S., Oxenius, A., Buch, T., Kurts, C., Heikenwalder, M., ... Schultze, J. L. (2016). Tumor-necrosis factor impairs CD4(+) T cell-mediated immunological control in chronic viral infection. *Nature Immunology*, *17*(5), 593-603. <https://doi.org/10.1038/ni.3399>

- Bonizzi, G., Bebien, M., Otero, D. C., Johnson-Vroom, K. E., Cao, Y., Vu, D., Jegga, A. G., Aronow, B. J., Ghosh, G., Rickert, R. C., & Karin, M. (2004). Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *The EMBO Journal*, 23(21), 4202-4210. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600391>
- Bradley, L. M., Dalton, D. K., & Croft, M. (1996). A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 157(4), 1350-1358.
- Burger, R. (2013). Impact of interleukin-6 in hematological malignancies. *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie*, 40(5), 336-343. <https://doi.org/10.1159/000354194>
- Calderón, L., & Boehm, T. (2011). Three chemokine receptors cooperatively regulate homing of hematopoietic progenitors to the embryonic mouse thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18), 7517-7522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016428108>
- Canossi, A., Aureli, A., Del Beato, T., Rossi, P., Franceschilli, L., De Sanctis, F., Sileri, P., di Lorenzo, N., Buonomo, O., Lauro, D., Venditti, A., & Sconocchia, G. (2016). Role of KIR and CD16A genotypes in colorectal carcinoma genetic risk and clinical stage. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 239. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1001-y>
- Carbone, A., Roulland, S., Gloghini, A., Younes, A., von Keudell, G., López-Guillermo, A., & Fitzgibbon, J. (2019). Follicular lymphoma. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 83. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0132-x>
- Caron, G., Le Gallou, S., Lamy, T., Tarte, K., & Fest, T. (2009). CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(12), 7595-7602. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804272>
- Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Fox, B. C., Colomo, L., Martinez, A., Roncador, G., Montserrat, E., Campo, E., & Banham, A. H. (2006). High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*, 108(9), 2957-2964. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-018218>
- Castillo, J. J., Gustine, J., Meid, K., Dubeau, T., Hunter, Z. R., & Treon, S. P. (2016). Histological transformation to diffuse large B-cell lymphoma in patients with Waldenström macroglobulinemia. *American Journal of Hematology*, 91(10), 1032-1035. <https://doi.org/10.1002/ajh.24477>
- Castillo, J. J., Gustine, J., Meid, K., Dubeau, T., Severns, P., & Treon, S. P. (2017). Acquired Von Willebrand Disease in Patients with Waldenström Macroglobulinemia. *Blood*, 130, 1088. [https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl\\_1.1088.1088](https://doi.org/10.1182/blood.V130.Suppl_1.1088.1088)
- Castillo, J. J., Meid, K., Gustine, J. N., Leventoff, C., White, T., Flynn, C. A., Sarosiek, S., Demos, M. G., Guerrero, M. L., Kofides, A., Liu, X., Munshi, M., Tsakmaklis, N., Xu, L., Yang, G., Branagan, A. R., O'Donnell, E., Raje, N., Yee, A. J., ... Treon, S. P. (2022). Long-term follow-up of ibrutinib monotherapy in treatment-naive patients with

- Waldenstrom macroglobulinemia. *Leukemia*, 36(2), 532-539. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01417-9>
- Cerhan, J. R., & Habermann, T. M. (2021). Epidemiology of Marginal Zone Lymphoma. *Annals of Lymphoma*, 5, 1. <https://doi.org/10.21037/aol-20-28>
- Chang, H.-C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G. L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A.-N., Han, L., Nguyen, E. T., Robertson, M. J., Perumal, N. B., Tepper, R. S., Nutt, S. L., & Kaplan, M. H. (2010). The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nature Immunology*, 11(6), 527-534. <https://doi.org/10.1038/ni.1867>
- Chang, Y., Bosma, M. J., & Bosma, G. C. (1999). Extended duration of DH-JH rearrangement in immunoglobulin heavy chain transgenic mice: Implications for regulation of allelic exclusion. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(8), 1295-1305. <https://doi.org/10.1084/jem.189.8.1295>
- Chappell, C. P., Draves, K. E., Giltiay, N. V., & Clark, E. A. (2012). Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(10), 1825-1840. <https://doi.org/10.1084/jem.20120774>
- Chen, L.-F., & Greene, W. C. (2004). Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(5), 392-401. <https://doi.org/10.1038/nrm1368>
- Choi, Y. S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T. C., Johnston, R. J., Monticelli, L., Lao, C., & Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity*, 34(6), 932-946. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.023>
- Cholujova, D., Beke, G., Hunter, Z. R., Hideshima, T., Flores, L., Zeleznikova, T., Harrachova, D., Klucar, L., Leiba, M., Drgona, L., Treon, S. P., Kastritis, E., Dorfman, D. M., Anderson, K. C., & Jakubikova, J. (2023). Dysfunctions of innate and adaptive immune tumor microenvironment in Waldenström macroglobulinemia. *International Journal of Cancer*, 152(9), 1947-1963. <https://doi.org/10.1002/ijc.34405>
- Chou, M.-Y., Fogelstrand, L., Hartvigsen, K., Hansen, L. F., Woelkers, D., Shaw, P. X., Choi, J., Perkmann, T., Bäckhed, F., Miller, Y. I., Hörkkö, S., Corr, M., Witztum, J. L., & Binder, C. J. (2009). Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(5), 1335-1349. <https://doi.org/10.1172/JCI36800>
- Cinamon, G., Matloubian, M., Lesneski, M. J., Xu, Y., Low, C., Lu, T., Proia, R. L., & Cyster, J. G. (2004). Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nature Immunology*, 5(7), 713-720. <https://doi.org/10.1038/ni1083>
- Cinamon, G., Zachariah, M. A., Lam, O. M., Foss, F. W., & Cyster, J. G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nature Immunology*, 9(1), 54-62. <https://doi.org/10.1038/ni1542>
- Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkhurst, C. N., Muratet, M., Newberry, K. M., Meadows, S., Greenfield, A., Yang, Y., Jain, P., Kirigin, F. K., Birchmeier, C., Wagner, E. F., Murphy, K. M., ... Littman, D. R.



- (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell*, 151(2), 289-303. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.016>
- Constantinescu, A., & Schlissel, M. S. (1997). Changes in locus-specific V(D)J recombinase activity induced by immunoglobulin gene products during B cell development. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(4), 609-620. <https://doi.org/10.1084/jem.185.4.609>
- Cortes, J., & Kurzrock, R. (1997). Interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 26(3-4), 251-259. <https://doi.org/10.3109/10428199709051774>
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S. K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J.-P., D'Cruz, D., Casanova, J.-L., Trouillet, C., & Geissmann, F. (2010). Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*, 33(3), 375-386. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.012>
- Crotty, S. (2019). T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity*, 50(5), 1132-1148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.011>
- Cunningham, A. F., Gaspal, F., Serre, K., Mohr, E., Henderson, I. R., Scott-Tucker, A., Kenny, S. M., Khan, M., Toellner, K.-M., Lane, P. J. L., & MacLennan, I. C. M. (2007). Salmonella induces a switched antibody response without germinal centers that impedes the extracellular spread of infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(10), 6200-6207. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6200>
- Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R. C., & Croce, C. M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(24), 7824-7827. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.24.7824>
- Dam, J., Guan, R., Natarajan, K., Dimasi, N., Chlewicki, L. K., Kranz, D. M., Schuck, P., Margulies, D. H., & Mariuzza, R. A. (2003). Variable MHC class I engagement by Ly49 natural killer cell receptors demonstrated by the crystal structure of Ly49C bound to H-2K(b). *Nature Immunology*, 4(12), 1213-1222. <https://doi.org/10.1038/ni1006>
- Damoiseaux, J. (2020). The IL-2 - IL-2 receptor pathway in health and disease: The role of the soluble IL-2 receptor. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 218, 108515. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108515>
- Davis, J. E., Sharpe, C., Mason, K., Tam, C. S., Koldej, R. M., & Ritchie, D. S. (2021). Ibrutinib protects T cells in patients with CLL from proliferation-induced senescence. *Journal of Translational Medicine*, 19(1), 473. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03136-2>
- De Simone, M., Rossetti, G., & Pagani, M. (2018). Single Cell T Cell Receptor Sequencing: Techniques and Future Challenges. *Frontiers in Immunology*, 9, 1638. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01638>
- Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z.-W., Karin, M., Ware, C. F., & Green, D. R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity*, 17(4), 525-535. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00423-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00423-5)
- Dimopoulos, M. A., García-Sanz, R., Gavriatopoulou, M., Morel, P., Kyrtonis, M.-C., Michalis, E., Kartasis, Z., Leleu, X., Palladini, G., Tedeschi, A., Gika, D., Merlini, G., Kastritis, E.,

- & Sonneveld, P. (2013). Primary therapy of Waldenstrom macroglobulinemia (WM) with weekly bortezomib, low-dose dexamethasone, and rituximab (BDR) : Long-term results of a phase 2 study of the European Myeloma Network (EMN). *Blood*, 122(19), 3276-3282. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-503862>
- Dong, D., Zheng, L., Lin, J., Zhang, B., Zhu, Y., Li, N., Xie, S., Wang, Y., Gao, N., & Huang, Z. (2019). Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex. *Nature*, 573(7775), 546-552. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1537-0>
- Dorshkind, K., & Montecino-Rodriguez, E. (2007). Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nature Reviews. Immunology*, 7(3), 213-219. <https://doi.org/10.1038/nri2019>
- Douglas, M. (2022). Richter Transformation : Clinical Manifestations, Evaluation, and Management. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, 13(5), 525-534. <https://doi.org/10.6004/jadpro.2022.13.5.6>
- Elimimian, E. B., Bilani, N., Diacovo, M. J., Sirvaitis, S., & Fu, C. L. (2021). Histologic Transformation in an Untreated Waldenstrom's Macroglobulinemia After 14 Years : Case Report and Review of the Literature. *Journal of Hematology*, 10(1), 25-29. <https://doi.org/10.14740/jh767>
- ES, J., NL, H., H, S., & JW, V. (2001). *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Pathology-And-Genetics-Of-Tumours-Of-Haematopoietic-And-Lymphoid-Tissues-2001>
- Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A., & Bluestone, J. A. (2016). CD28 Costimulation : From Mechanism to Therapy. *Immunity*, 44(5), 973-988. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.020>
- Ettinger, R., Sims, G. P., Robbins, R., Withers, D., Fischer, R. T., Grammer, A. C., Kuchen, S., & Lipsky, P. E. (2007). IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(5), 2872-2882. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2872>
- Fangazio, M., Ladewig, E., Gomez, K., Garcia-Ibanez, L., Kumar, R., Teruya-Feldstein, J., Rossi, D., Filip, I., Pan-Hammarström, Q., Inghirami, G., Boldorini, R., Ott, G., Staiger, A. M., Chapuy, B., Gaidano, G., Bhagat, G., Basso, K., Rabadan, R., Pasqualucci, L., & Dalla-Favera, R. (2021). Genetic mechanisms of HLA-I loss and immune escape in diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(22), e2104504118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104504118>
- Feng, L.-L., Gao, J.-M., Li, P.-P., & Wang, X. (2011). IL-9 contributes to immunosuppression mediated by regulatory T cells and mast cells in B-cell non-hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Immunology*, 31(6), 1084-1094. <https://doi.org/10.1007/s10875-011-9584-9>
- Feng, Z.-C., Riopel, M., Popell, A., & Wang, R. (2015). A survival Kit for pancreatic beta cells : Stem cell factor and c-Kit receptor tyrosine kinase. *Diabetologia*, 58(4), 654-665. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3504-0>

- Ferrao, R., Zhou, H., Shan, Y., Li, Q., Shaw, D. E., Li, X., & Wu, H. (2014). IRAK4 Dimerization and Trans-autophosphorylation are Induced by Myddosome Assembly. *Molecular cell*, *55*(6), 891-903. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.006>
- Fonseca, T. G., Auguste, M., Ribeiro, F., Cardoso, C., Mestre, N. C., Abessa, D. M. S., & Bebianno, M. J. (2018). Environmental relevant levels of the cytotoxic drug cyclophosphamide produce harmful effects in the polychaete *Nereis diversicolor*. *The Science of the Total Environment*, *636*, 798-809. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.318>
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Immunology*, *4*(4), 330-336. <https://doi.org/10.1038/ni904>
- Fraser, J. H., Rincón, M., McCoy, K. D., & Le Gros, G. (1999). CTLA4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF-kappaB activity in activated T cells. *European Journal of Immunology*, *29*(3), 838-844. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199903\)29:03<838::AID-IMMU838>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199903)29:03<838::AID-IMMU838>3.0.CO;2-P)
- Gavriatopoulou, M., García-Sanz, R., Kastiris, E., Morel, P., Kyrtonis, M.-C., Michalis, E., Kartasis, Z., Leleu, X., Palladini, G., Tedeschi, A., Gika, D., Merlini, G., Sonneveld, P., & Dimopoulos, M. A. (2017). BDR in newly diagnosed patients with WM: Final analysis of a phase 2 study after a minimum follow-up of 6 years. *Blood*, *129*(4), 456-459. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-742411>
- Gayet, M., Leymarie, V., Derouault, P., Guérin, E., Vaidié, J., Pascal, V., Boulin, M., Dmytruk, N., Chauzeix, J., Trimoreau, F., Gachard, N., Feuillard, J., & Rizzo, D. (2022). Flow cytometry detection of CD138 expression continuum between monotypic B and plasma cells is associated with both high IgM peak levels and MYD88 mutation and contributes to diagnosis of Waldenström macroglobulinemia. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, *102*(1), 62-69. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21995>
- Ghobrial, I. M., Fonseca, R., Greipp, P. R., Blood, E., Rue, M., Vesole, D. H., Gertz, M. A., & Eastern Cooperative Oncology Group. (2004). Initial immunoglobulin M « flare » after rituximab therapy in patients diagnosed with Waldenström macroglobulinemia: An Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Cancer*, *101*(11), 2593-2598. <https://doi.org/10.1002/cncr.20658>
- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews. Immunology*, *14*(6), 392-404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>
- Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., & Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *150*(10), 4244-4252.
- Godfrey, J., Tumuluru, S., Bao, R., Leukam, M., Venkataraman, G., Phillip, J., Fitzpatrick, C., McElherne, J., MacNabb, B. W., Orlowski, R., Smith, S. M., & Kline, J. (2019). PD-L1 gene alterations identify a subset of diffuse large B-cell lymphoma harboring a T-cell-inflamed phenotype. *Blood*, *133*(21), 2279-2290. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-879015>

- Görgün, G., Holderried, T. A. W., Zahrieh, D., Neuberg, D., & Gribben, J. G. (2005). Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(7), 1797-1805. <https://doi.org/10.1172/JCI24176>
- Grande, B. M., Gerhard, D. S., Jiang, A., Griner, N. B., Abramson, J. S., Alexander, T. B., Allen, H., Ayers, L. W., Bethony, J. M., Bhatia, K., Bowen, J., Casper, C., Choi, J. K., Culibrk, L., Davidsen, T. M., Dyer, M. A., Gastier-Foster, J. M., Gesuwan, P., Greiner, T. C., ... Staudt, L. M. (2019). Genome-wide discovery of somatic coding and noncoding mutations in pediatric endemic and sporadic Burkitt lymphoma. *Blood*, *133*(12), 1313-1324. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-871418>
- Grawunder, U., Leu, T. M., Schatz, D. G., Werner, A., Rolink, A. G., Melchers, F., & Winkler, T. H. (1995). Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity*, *3*(5), 601-608. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90131-0](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90131-0)
- Groom, J. R., Fletcher, C. A., Walters, S. N., Grey, S. T., Watt, S. V., Sweet, M. J., Smyth, M. J., Mackay, C. R., & Mackay, F. (2007). BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(8), 1959-1971. <https://doi.org/10.1084/jem.20062567>
- Grote, D. M., Ziesmer, S. C., Hodge, L. S., Price-Troska, T. L., Novak, A. J., Yang, Z.-Z., & Ansell, S. M. (2013). Interactions Between PD-1 and PD-L1 and PD-L2 Promote Malignant B-Cell Growth in Waldenstrom Macroglobulinemia. *Blood*, *122*(21), 4334. <https://doi.org/10.1182/blood.V122.21.4334.4334>
- Grubisha, O., Kaminska, M., Duquerroy, S., Fontan, E., Cordier, F., Haouz, A., Raynal, B., Chiaravalli, J., Delepierre, M., Israël, A., Véron, M., & Agou, F. (2010). DARPIn-assisted crystallography of the CC2-LZ domain of NEMO reveals a coupling between dimerization and ubiquitin binding. *Journal of Molecular Biology*, *395*(1), 89-104. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.10.018>
- Guo, H., Barberi, T., Suresh, R., & Friedman, A. D. (2018). Progression from the Common Lymphoid Progenitor to B/Myeloid PreproB and ProB Precursors during B Lymphopoiesis Requires C/EBP $\alpha$ . *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *201*(6), 1692-1704. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800244>
- Ha, S., Tsuji, M., Suzuki, K., Meek, B., Yasuda, N., Kaisho, T., & Fagarasan, S. (2006). Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. *The Journal of Experimental Medicine*, *203*(11), 2541-2550. <https://doi.org/10.1084/jem.20061041>
- Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., & Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *94*(6), 1848-1854.
- Hartley, S. B., Crosbie, J., Brink, R., Kantor, A. B., Basten, A., & Goodnow, C. C. (1991). Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature*, *353*(6346), 765-769. <https://doi.org/10.1038/353765a0>
- Hatanaka, H., Abe, Y., Kamiya, T., Morino, F., Nagata, J., Tokunaga, T., Oshika, Y., Suemizu, H., Kijima, H., Tsuchida, T., Yamazaki, H., Inoue, H., Nakamura, M., & Ueyama, Y.

- (2000). Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 11(7), 815-819. <https://doi.org/10.1023/A:1008375208574>
- He, B., Santamaria, R., Xu, W., Cols, M., Chen, K., Puga, I., Shan, M., Xiong, H., Bussel, J. B., Chiu, A., Puel, A., Reichenbach, J., Marodi, L., Döffinger, R., Vasconcelos, J., Issekutz, A., Krause, J., Davies, G., Li, X., ... Cerutti, A. (2010). The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nature Immunology*, 11(9), 836-845. <https://doi.org/10.1038/ni.1914>
- He, Y.-F., Wang, X.-H., Zhang, G.-M., Chen, H.-T., Zhang, H., & Feng, Z.-H. (2005). Sustained low-level expression of interferon-gamma promotes tumor development: Potential insights in tumor prevention and tumor immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 54(9), 891-897. <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0654-1>
- Herblot, S., Aplan, P. D., & Hoang, T. (2002). Gradient of E2A activity in B-cell development. *Molecular and Cellular Biology*, 22(3), 886-900. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.3.886-900.2002>
- Hernández, L., Beà, S., Pinyol, M., Ott, G., Katzenberger, T., Rosenwald, A., Bosch, F., López-Guillermo, A., Delabie, J., Colomer, D., Montserrat, E., & Campo, E. (2005). CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Research*, 65(6), 2199-2206. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1526>
- Herzenberg, L. A. (2000). B-1 cells: The lineage question revisited. *Immunological Reviews*, 175, 9-22.
- Hilchey, S. P., De, A., Rimsza, L. M., Bankert, R. B., & Bernstein, S. H. (2007). Follicular lymphoma intratumoral CD4+CD25+GITR+ regulatory T cells potently suppress CD3/CD28-costimulated autologous and allogeneic CD8+CD25- and CD4+CD25- T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(7), 4051-4061. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4051>
- Horejsí, V., Zhang, W., & Schraven, B. (2004). Transmembrane adaptor proteins: Organizers of immunoreceptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, 4(8), 603-616. <https://doi.org/10.1038/nri1414>
- Huang, G., Wen, Q., Zhao, Y., Gao, Q., & Bai, Y. (2013). NF-κB plays a key role in inducing CD274 expression in human monocytes after lipopolysaccharide treatment. *PLoS One*, 8(4), e61602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061602>
- Huard, B., Prigent, P., Tournier, M., Bruniquel, D., & Triebel, F. (1995). CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *European Journal of Immunology*, 25(9), 2718-2721. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250949>
- Huppa, J. B., & Davis, M. M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature Reviews. Immunology*, 3(12), 973-983. <https://doi.org/10.1038/nri1245>
- Jalali, S., Price-Troska, T., Paludo, J., Villasboas, J., Kim, H.-J., Yang, Z.-Z., Novak, A. J., & Ansell, S. M. (2018). Soluble PD-1 ligands regulate T-cell function in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood Advances*, 2(15), 1985-1997. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018021113>

- Janz, S. (2013). Waldenström macroglobulinemia : Clinical and immunological aspects, natural history, cell of origin, and emerging mouse models. *ISRN Hematology*, 2013, 815325. <https://doi.org/10.1155/2013/815325>
- Jazirehi, A. R., Huerta-Yepe, S., Cheng, G., & Bonavida, B. (2005). Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: Role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer Research*, 65(1), 264-276.
- Jazirehi, A. R., Vega, M. I., Chatterjee, D., Goodglick, L., & Bonavida, B. (2004). Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer Research*, 64(19), 7117-7126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3500>
- Jiang, R., Tan, Z., Deng, L., Chen, Y., Xia, Y., Gao, Y., Wang, X., & Sun, B. (2011). Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 54(3), 900-909. <https://doi.org/10.1002/hep.24486>
- Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annual Review of Immunology*, 30, 531-564. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>
- Jr, C. A. J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J., Jr, C. A. J., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology* (5th éd.). Garland Science.
- Kang, Y.-S., Do, Y., Lee, H.-K., Park, S. H., Cheong, C., Lynch, R. M., Loeffler, J. M., Steinman, R. M., & Park, C. G. (2006). A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell*, 125(1), 47-58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.046>
- Kapoor, P., Paludo, J., Vallumsetla, N., & Greipp, P. R. (2015). Waldenström macroglobulinemia: What a hematologist needs to know. *Blood Reviews*, 29(5), 301-319. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2015.03.001>
- Kastritis, E., Leblond, V., Dimopoulos, M. A., Kimby, E., Staber, P., Kersten, M. J., Tedeschi, A., Buske, C., & ESMO Guidelines Committee. (2018). Waldenström's macroglobulinaemia : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(Suppl 4), iv270. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy322>
- Kaushal, A., Nooka, A. K., Carr, A. R., Pendleton, K. E., Barwick, B. G., Manalo, J., McCachren, S. S., Gupta, V. A., Joseph, N. S., Hofmeister, C. C., Kaufman, J. L., Heffner, L. T., Ansell, S. M., Boise, L. H., Lonial, S., Dhodapkar, K. M., & Dhodapkar, M. V. (2021). Aberrant Extrafollicular B Cells, Immune Dysfunction, Myeloid Inflammation, and MyD88-Mutant Progenitors Precede Waldenstrom Macroglobulinemia. *Blood Cancer Discovery*, 2(6), 600-615. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-21-0043>
- Kawagoe, T., Sato, S., Matsushita, K., Kato, H., Matsui, K., Kumagai, Y., Saitoh, T., Kawai, T., Takeuchi, O., & Akira, S. (2008). Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nature Immunology*, 9(6), 684-691. <https://doi.org/10.1038/ni.1606>

- Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Ambesi-Impiombato, A., Califano, A., Migliazza, A., Bhagat, G., & Dalla-Favera, R. (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*, *17*(1), 28-40. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.11.019>
- Knochelmann, H. M., Dwyer, C. J., Bailey, S. R., Amaya, S. M., Elston, D. M., Mazza-McCrann, J. M., & Paulos, C. M. (2018). When worlds collide : Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. *Cellular & Molecular Immunology*, *15*(5), 458-469. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0004-4>
- Krzisch, D., Guedes, N., Boccon-Gibod, C., Baron, M., Bravetti, C., Davi, F., Armand, M., Smagge, L., Caron, J., Bernard, O. A., Susin, S., Chapiro, E., Leblond, V., Nguyen-Khac, F., Roos-Weil, D., & on behalf the FILO (French Innovative Leukemia Organization) group. (2021). Cytogenetic and molecular abnormalities in Waldenström's macroglobulinemia patients: Correlations and prognostic impact. *American Journal of Hematology*, *96*(12), 1569-1579. <https://doi.org/10.1002/ajh.26339>
- Kumar, S. K., Rajkumar, V., Kyle, R. A., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M.-V., Gay, F., & Anderson, K. C. (2017). Multiple myeloma. *Nature Reviews. Disease Primers*, *3*, 17046. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>
- Küppers, R., & Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*, *20*(40), 5580-5594. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204640>
- Kyle, R. A., Benson, J. T., Larson, D. R., Therneau, T. M., Dispenzieri, A., Kumar, S., Melton, L. J., & Rajkumar, S. V. (2012). Progression in smoldering Waldenstrom macroglobulinemia: Long-term results. *Blood*, *119*(19), 4462-4466. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-384768>
- Kyle, R. A., Therneau, T. M., Rajkumar, S. V., Larson, D. R., Plevak, M. F., Offord, J. R., Dispenzieri, A., Katzmann, J. A., & Melton, L. J. (2006). Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *The New England Journal of Medicine*, *354*(13), 1362-1369. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa054494>
- Lane, R. S., Femel, J., Breazeale, A. P., Loo, C. P., Thibault, G., Kaempf, A., Mori, M., Tsujikawa, T., Chang, Y. H., & Lund, A. W. (2018). IFN $\gamma$ -activated dermal lymphatic vessels inhibit cytotoxic T cells in melanoma and inflamed skin. *The Journal of Experimental Medicine*, *215*(12), 3057-3074. <https://doi.org/10.1084/jem.20180654>
- Leblond, V., Maloum, K., Garff-Tavernier, M. L., Davi, F., & Nguyen-Khac, F. (2013). La maladie de Waldenström ou macroglobulinémie. *Revue Francophone des Laboratoires*, *2013*(452), 73-82. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(13\)72034-3](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(13)72034-3)
- Lee, H. L., Jang, J. W., Lee, S. W., Yoo, S. H., Kwon, J. H., Nam, S. W., Bae, S. H., Choi, J. Y., Han, N. I., & Yoon, S. K. (2019). Inflammatory cytokines and change of Th1/Th2 balance as prognostic indicators for hepatocellular carcinoma in patients treated with transarterial chemoembolization. *Scientific Reports*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40078-8>
- Lee, N.-R., Song, E.-K., Jang, K. Y., Choi, H. N., Moon, W. S., Kwon, K., Lee, J.-H., Yim, C.-Y., & Kwak, J.-Y. (2008). Prognostic impact of tumor infiltrating FOXP3 positive

- regulatory T cells in diffuse large B-cell lymphoma at diagnosis. *Leukemia & Lymphoma*, 49(2), 247-256. <https://doi.org/10.1080/10428190701824536>
- Levine, T., Pestronk, A., Florence, J., Al-Lozi, M. T., Lopate, G., Miller, T., Ramneantu, I., Waheed, W., Stambuk, M., Stone, M. J., & Choksi, R. (2006). Peripheral neuropathies in Waldenström's macroglobulinaemia. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 77(2), 224-228. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.071175>
- Li, C.-W., Lim, S.-O., Xia, W., Lee, H.-H., Chan, L.-C., Kuo, C.-W., Khoo, K.-H., Chang, S.-S., Cha, J.-H., Kim, T., Hsu, J. L., Wu, Y., Hsu, J.-M., Yamaguchi, H., Ding, Q., Wang, Y., Yao, J., Lee, C.-C., Wu, H.-J., ... Hung, M.-C. (2016). Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nature Communications*, 7, 12632. <https://doi.org/10.1038/ncomms12632>
- Li, Y., Yu, Q., Zhang, Z., Wang, J., Li, S., Zhang, J., & Liu, G. (2016). TH9 cell differentiation, transcriptional control and function in inflammation, autoimmune diseases and cancer. *Oncotarget*, 7(43), 71001-71012. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11681>
- Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 181-211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- Liu, Y., Song, Y., & Yin, Q. (2022). Effects of ibrutinib on T-cell immunity in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Frontiers in Immunology*, 13, 962552. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.962552>
- Long, M., Beckwith, K., Do, P., Mundy, B. L., Gordon, A., Lehman, A. M., Maddocks, K. J., Cheney, C., Jones, J. A., Flynn, J. M., Andritsos, L. A., Awan, F., Fraietta, J. A., June, C. H., Maus, M. V., Woyach, J. A., Caligiuri, M. A., Johnson, A. J., Muthusamy, N., & Byrd, J. C. (2017). Ibrutinib treatment improves T cell number and function in CLL patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(8), 3052-3064. <https://doi.org/10.1172/JCI89756>
- López, C., Burkhardt, B., Chan, J. K. C., Leoncini, L., Mbulaiteye, S. M., Ogwang, M. D., Orem, J., Rochford, R., Roschewski, M., & Siebert, R. (2022). Burkitt lymphoma. *Nature Reviews. Disease Primers*, 8(1), 78. <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00404-3>
- Love, P. E., & Hayes, S. M. (2010). ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(6), a002485. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002485>
- Lu, T. T., & Cyster, J. G. (2002). Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 409-412. <https://doi.org/10.1126/science.1071632>
- Ma, A., & Malynn, B. A. (2012). A20 : Linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nature Reviews. Immunology*, 12(11), 774-785. <https://doi.org/10.1038/nri3313>
- Maier, E., Duschl, A., & Horejs-Hoeck, J. (2012). STAT6-dependent and -independent mechanisms in Th2 polarization. *European Journal of Immunology*, 42(11), 2827-2833. <https://doi.org/10.1002/eji.201242433>
- Maki, K., Nagata, K., Kitamura, F., Takemori, T., & Karasuyama, H. (2000). Immunoglobulin beta signaling regulates locus accessibility for ordered immunoglobulin gene



- rearrangements. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(8), 1333-1340. <https://doi.org/10.1084/jem.191.8.1333>
- Marei, H. E., Althani, A., Afifi, N., Hasan, A., Caceci, T., Pozzoli, G., Morrione, A., Giordano, A., & Cenciarelli, C. (2021). P53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell International*, 21(1), 703. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02396-8>
- Mariuzza, R. A., Agnihotri, P., & Orban, J. (2020). The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation : An enduring enigma. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(4), 914-925. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.009411>
- Martin, F., Oliver, A. M., & Kearney, J. F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*, 14(5), 617-629. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00129-7](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00129-7)
- McInturff, J. E., Modlin, R. L., & Kim, J. (2005). The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *The Journal of Investigative Dermatology*, 125(1), 1-8. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23459.x>
- McMaster, M. L. (2023). The epidemiology of Waldenström macroglobulinemia. *Seminars in Hematology*, 60(2), 65-72. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2023.03.008>
- Mohanty, A., Sandoval, N., Das, M., Pillai, R., Chen, L., Chen, R. W., Amin, H. M., Wang, M., Marcucci, G., Weisenburger, D. D., Rosen, S. T., Pham, L. V., & Ngo, V. N. (2016). CCND1 mutations increase protein stability and promote ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. *Oncotarget*, 7(45), 73558-73572. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12434>
- Nagata, K., Nakamura, T., Kitamura, F., Kuramochi, S., Taki, S., Campbell, K. S., & Karasuyama, H. (1997). The Ig alpha/Igbeta heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity*, 7(4), 559-570. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80377-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80377-5)
- Nam, S. J., Kim, S., Kwon, D., Kim, H., Kim, S., Lee, E., Kim, T. M., Heo, D. S., Park, S. H., Lim, M. S., Kim, C. W., & Jeon, Y. K. (2018). Prognostic implications of tumor-infiltrating macrophages, M2 macrophages, regulatory T-cells, and indoleamine 2,3-dioxygenase-positive cells in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Oncoimmunology*, 7(7), e1442164. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1442164>
- Navarro, A., Clot, G., Royo, C., Jares, P., Hadzidimitriou, A., Agathangelidis, A., Bikos, V., Darzentas, N., Papadaki, T., Salaverria, I., Pinyol, M., Puig, X., Palomero, J., Vegliante, M. C., Amador, V., Martinez-Trillos, A., Stefancikova, L., Wiestner, A., Wilson, W., ... Campo, E. (2012). Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Research*, 72(20), 5307-5316. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1615>
- Ngo, V. N., Young, R. M., Schmitz, R., Jhavar, S., Xiao, W., Lim, K.-H., Kohlhammer, H., Xu, W., Yang, Y., Zhao, H., Shaffer, A. L., Romesser, P., Wright, G., Powell, J., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H. K., Ott, G., Gascoyne, R. D., Connors, J. M., ... Staudt, L. M. (2011). Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*, 470(7332), 115-119. <https://doi.org/10.1038/nature09671>

- Ocio, E. M., Schop, R. F. J., Gonzalez, B., Van Wier, S. A., Hernandez-Rivas, J. M., Gutierrez, N. C., Garcia-Sanz, R., Moro, M. J., Aguilera, C., Hernandez, J., Xu, R., Greipp, P. R., Dispenzieri, A., Jalal, S. M., Lacy, M. Q., Gonzalez-Paz, N., Gertz, M. A., San Miguel, J. F., & Fonseca, R. (2007). 6q deletion in Waldenström macroglobulinemia is associated with features of adverse prognosis. *British Journal of Haematology*, *136*(1), 80-86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06389.x>
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C., & Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science (New York, N.Y.)*, *248*(4962), 1517-1523. <https://doi.org/10.1126/science.2360047>
- O'Garra, A., & Vieira, P. (2007). T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature Reviews. Immunology*, *7*(6), 425-428. <https://doi.org/10.1038/nri2097>
- Oliver, A. M., Martin, F., Gartland, G. L., Carter, R. H., & Kearney, J. F. (1997). Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *European Journal of Immunology*, *27*(9), 2366-2374. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270935>
- Olszewski, A. J., & Castillo, J. J. (2013). Survival of patients with marginal zone lymphoma : Analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*, *119*(3), 629-638. <https://doi.org/10.1002/cncr.27773>
- Ouk, C., Roland, L., Gachard, N., Poulain, S., Oblet, C., Rizzo, D., Saintamand, A., Lemasson, Q., Carrion, C., Thomas, M., Balabanian, K., Espéli, M., Parrens, M., Soubeyran, I., Boulin, M., Faumont, N., Feuillard, J., & Vincent-Fabert, C. (2021). Continuous MYD88 Activation Is Associated With Expansion and Then Transformation of IgM Differentiating Plasma Cells. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.641692>
- Paiva, B., Corchete, L. A., Vidriales, M.-B., García-Sanz, R., Perez, J. J., Aires-Mejia, I., Sanchez, M.-L., Barcena, P., Alignani, D., Jimenez, C., Sarasquete, M.-E., Mateos, M.-V., Ocio, E. M., Puig, N., Escalante, F., Hernández, J., Cuello, R., García de Coca, A., Sierra, M., ... San Miguel, J. F. (2015). The cellular origin and malignant transformation of Waldenström macroglobulinemia. *Blood*, *125*(15), 2370-2380. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-602565>
- Palma, M., Gentilcore, G., Heimersson, K., Mozaffari, F., Näsman-Glaser, B., Young, E., Rosenquist, R., Hansson, L., Österborg, A., & Mellstedt, H. (2017). T cells in chronic lymphocytic leukemia display dysregulated expression of immune checkpoints and activation markers. *Haematologica*, *102*(3), 562-572. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.151100>
- Paludo, J., Abeykoon, J. P., Shreders, A., Ansell, S. M., Kumar, S., Ailawadhi, S., King, R. L., Koehler, A. B., Reeder, C. B., Buadi, F. K., Dispenzieri, A., Lacy, M. Q., Dingli, D., Witzig, T. E., Go, R. S., Gonsalves, W. I., Kourelis, T., Warsame, R., Leung, N., ... Kapoor, P. (2018). Bendamustine and rituximab (BR) versus dexamethasone, rituximab, and cyclophosphamide (DRC) in patients with Waldenström macroglobulinemia. *Annals of Hematology*, *97*(8), 1417-1425. <https://doi.org/10.1007/s00277-018-3311-z>
- Parry, H. M., Mirajkar, N., Cutmore, N., Zuo, J., Long, H., Kwok, M., Oldrieve, C., Hudson, C., Stankovic, T., Paneesha, S., Kelly, M., Begum, J., McSkeane, T., Pratt, G., & Moss, P.

- (2019). Long-Term Ibrutinib Therapy Reverses CD8+ T Cell Exhaustion in B Cell Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Frontiers in Immunology*, 10, 2832. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02832>
- Peach, R. J., Bajorath, J., Brady, W., Leytze, G., Greene, J., Naemura, J., & Linsley, P. S. (1994). Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(6), 2049-2058. <https://doi.org/10.1084/jem.180.6.2049>
- Pedersen, I. M., Buhl, A. M., Klausen, P., Geisler, C. H., & Jurlander, J. (2002). The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent mechanism. *Blood*, 99(4), 1314-1319. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.4.1314>
- Pereira, J. P., Kelly, L. M., Xu, Y., & Cyster, J. G. (2009). EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature*, 460(7259), 1122-1126. <https://doi.org/10.1038/nature08226>
- Pieters, T., T'Sas, S., Vanhee, S., Almeida, A., Driège, Y., Roels, J., Van Looche, W., Daneels, W., Baens, M., Marchand, A., Van Trimpont, M., Matthijssens, F., Morscio, J., Lemeire, K., Lintermans, B., Reunes, L., Chaltin, P., Offner, F., Van Dorpe, J., ... Goossens, S. (2021). Cyclin D2 overexpression drives B1a-derived MCL-like lymphoma in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 218(10), e20202280. <https://doi.org/10.1084/jem.20202280>
- Pinyol, M., Hernandez, L., Cazorla, M., Balbín, M., Jares, P., Fernandez, P. L., Montserrat, E., Cardesa, A., Lopez-Otín, C., & Campo, E. (1997). Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*, 89(1), 272-280.
- Plitas, G., & Rudensky, A. Y. (2016). Regulatory T Cells : Differentiation and Function. *Cancer Immunology Research*, 4(9), 721-725. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0193>
- Pophali, P. A., Bartley, A., Kapoor, P., Gonsalves, W. I., Ashrani, A. A., Marshall, A. L., Siddiqui, M. A., Kyle, R. A., & Go, R. S. (2019). Prevalence and survival of smouldering Waldenström macroglobulinaemia in the United States. *British Journal of Haematology*, 184(6), 1014-1017. <https://doi.org/10.1111/bjh.15201>
- Poulain, S., Roumier, C., Bertrand, E., Renneville, A., Caillault-Venet, A., Doye, E., Geffroy, S., Sebda, S., Nibourel, O., Nudel, M., Herbaux, C., Renaud, L., Tomowiak, C., Guidez, S., Tricot, S., Roche-Lestienne, C., Quesnel, B., Preudhomme, C., & Leleu, X. (2017). TP53 Mutation and Its Prognostic Significance in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(20), 6325-6335. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0007>
- Poulain, S., Roumier, C., Decambron, A., Renneville, A., Herbaux, C., Bertrand, E., Tricot, S., Daudignon, A., Galiègue-Zouitina, S., Soenen, V., Theisen, O., Grardel, N., Nibourel, O., Roche-Lestienne, C., Quesnel, B., Duthilleul, P., Preudhomme, C., & Leleu, X. (2013). MYD88 L265P mutation in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 121(22), 4504-4511. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-436329>

- Prak, E. L., & Weigert, M. (1995). Light chain replacement : A new model for antibody gene rearrangement. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(2), 541-548. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.541>
- Pridans, C., Holmes, M. L., Polli, M., Wettenhall, J. M., Dakic, A., Corcoran, L. M., Smyth, G. K., & Nutt, S. L. (2008). Identification of Pax5 target genes in early B cell differentiation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(3), 1719-1728. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1719>
- Puri, K. D., Di Paolo, J. A., & Gold, M. R. (2013). B-cell receptor signaling inhibitors for treatment of autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies. *International Reviews of Immunology*, 32(4), 397-427. <https://doi.org/10.3109/08830185.2013.818140>
- Queirós, A. C., Beekman, R., Vilarrasa-Blasi, R., Duran-Ferrer, M., Clot, G., Merkel, A., Raineri, E., Russiñol, N., Castellano, G., Beà, S., Navarro, A., Kulis, M., Verdaguer-Dot, N., Jares, P., Enjuanes, A., Calasanz, M. J., Bergmann, A., Vater, I., Salaverría, I., ... Martín-Subero, J. I. (2016). Decoding the DNA Methylome of Mantle Cell Lymphoma in the Light of the Entire B Cell Lineage. *Cancer Cell*, 30(5), 806-821. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.014>
- Rajkumar, S. V., Dimopoulos, M. A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.-V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastritis, E., Richardson, P., Landgren, O., Paiva, B., Dispenzieri, A., Weiss, B., LeLeu, X., Zweegman, S., Lonial, S., Rosinol, L., Zamagni, E., ... Miguel, J. F. S. (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet. Oncology*, 15(12), e538-548. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)
- Riches, J. C., Davies, J. K., McClanahan, F., Fatah, R., Iqbal, S., Agrawal, S., Ramsay, A. G., & Gribben, J. G. (2013). T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*, 121(9), 1612-1621. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457531>
- Riva, E., Duarte, P. J., Valcárcel, B., Remaggi, G., Murrieta, I., Corzo, A., Del Carpio, D., Peña, C., Vázquez, J., Bove, V., Teixeira, L., Fleury-Perini, G., Yantorno, S., Samánez, C., Lopresti, S., Altamirano, M., Villela, L., Ruiz-Arguelles, G. J., Ruiz-Delgado, G. J., ... Malpica Castillo, L. E. (2022). Treatment and Survival Outcomes of Waldenstrom Macroglobulinemia in Latin American Patients : A Multinational Retrospective Cohort Study. *JCO Global Oncology*, 8, e2100380. <https://doi.org/10.1200/GO.21.00380>
- Robey, E., & Fowlkes, B. J. (1994). Selective events in T cell development. *Annual Review of Immunology*, 12, 675-705. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.003331>
- Rochford, R. (2021). Reframing Burkitt lymphoma : Virology not epidemiology defines clinical variants. *Annals of Lymphoma*, 5, 22. <https://doi.org/10.21037/aol-21-18>
- Rodríguez, S., Botta, C., Celay, J., Goicoechea, I., Jiménez, C., Garcia-Barchino, M. J., Valdés-Mas, R., Carrasco, Y., Garcés, J. J., Larrayoz, M., Santos, S., Alignani, D., Vilas-Zornoza, A., Pérez Ruiz, C., Garate, S., Sarai, S., Lopez, A. L., Reinhardt, C., Sanchez-Garcia, I., ... Paiva, B. (2020). Waldenström's Macroglobulinemia (WM) Is Preceded By Clonal Lymphopoiesis Including MYD88 L265P in Progenitor B Cells. *Blood*, 136(Supplement 1), 42-43. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-136982>

- Roos-Weil, D., Giacomelli, B., Armand, M., Della-Valle, V., Ghamlouch, H., Decaudin, C., Metzner, M., Lu, J., Le Garff-Tavernier, M., Leblond, V., Vyas, P., Zenz, T., Nguyen-Khac, F., Bernard, O. A., & Oakes, C. C. (2020). Identification of 2 DNA methylation subtypes of Waldenström macroglobulinemia with plasma and memory B-cell features. *Blood*, *136*(5), 585-595. <https://doi.org/10.1182/blood.2020005081>
- Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., Gascoyne, R. D., Muller-Hermelink, H. K., Smeland, E. B., Giltmane, J. M., Hurt, E. M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Klausner, R. D., Powell, J., ... Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, *346*(25), 1937-1947. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012914>
- Rossi, F. M. V., Corbel, S. Y., Merzaban, J. S., Carlow, D. A., Gossens, K., Duenas, J., So, L., Yi, L., & Ziltener, H. J. (2005). Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nature Immunology*, *6*(6), 626-634. <https://doi.org/10.1038/ni1203>
- Ru, H., Chambers, M. G., Fu, T.-M., Tong, A. B., Liao, M., & Wu, H. (2015). Molecular Mechanism of V(D)J Recombination from Synaptic RAG1-RAG2 Complex Structures. *Cell*, *163*(5), 1138-1152. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.055>
- Sacco, A., Desantis, V., Celay, J., Giustini, V., Rigali, F., Savino, F. D., Cea, M., Soncini, D., Cagnetta, A., Solimando, A. G., D'Aliberti, D., Spinelli, S., Ramazzotti, D., Almici, C., Todoerti, K., Neri, A., Anastasia, A., Tucci, A., Motta, M., ... Roccaro, A. M. (2023). Targeting the immune microenvironment in Waldenström macroglobulinemia via halting the CD40/CD40-ligand axis. *Blood*, *141*(21), 2615-2628. <https://doi.org/10.1182/blood.2022019240>
- Sahota, S. S., Babbage, G., & Weston-Bell, N. J. (2009). CD27 in defining memory B-cell origins in Waldenström's macroglobulinemia. *Clinical Lymphoma & Myeloma*, *9*(1), 33-35. <https://doi.org/10.3816/CLM.2009.n.007>
- Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P. M., Bhagat, G., Pernis, A., Pasqualucci, L., & Dalla-Favera, R. (2007). A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell*, *12*(3), 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.011>
- Saito, M., Novak, U., Piovan, E., Basso, K., Sumazin, P., Schneider, C., Crespo, M., Shen, Q., Bhagat, G., Califano, A., Chadburn, A., Pasqualucci, L., & Dalla-Favera, R. (2009). BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(27), 11294-11299. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903854106>
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Hamada, Y., Aizawa, S., & Hirai, H. (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity*, *18*(5), 675-685. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00111-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00111-0)
- Scheeren, F. A., Nagasawa, M., Weijer, K., Cupedo, T., Kirberg, J., Legrand, N., & Spits, H. (2008). T cell-independent development and induction of somatic hypermutation in

- human IgM+ IgD+ CD27+ B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(9), 2033-2042. <https://doi.org/10.1084/jem.20070447>
- Schwickert, T. A., Victora, G. D., Fooksman, D. R., Kamphorst, A. O., Mugnier, M. R., Gitlin, A. D., Dustin, M. L., & Nussenzweig, M. C. (2011). A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(6), 1243-1252. <https://doi.org/10.1084/jem.20102477>
- Shapiro-Shelef, M., Lin, K.-I., McHeyzer-Williams, L. J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M. G., & Calame, K. (2003). Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity*, 19(4), 607-620. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00267-x](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00267-x)
- Shatrova, A. N., Mityushova, E. V., Vassilieva, I. O., Aksenov, N. D., Zenin, V. V., Nikolsky, N. N., & Marakhova, I. I. (2016). Time-Dependent Regulation of IL-2R  $\alpha$ -Chain (CD25) Expression by TCR Signal Strength and IL-2-Induced STAT5 Signaling in Activated Human Blood T Lymphocytes. *PloS One*, 11(12), e0167215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167215>
- Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). Concise review : Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 32(6), 1380-1389. <https://doi.org/10.1002/stem.1661>
- Solman, I. G., Blum, L. K., Hoh, H. Y., Kipps, T. J., Burger, J. A., Barrientos, J. C., O'Brien, S., Mulligan, S. P., Kay, N. E., Hillmen, P., Byrd, J. C., Lal, I. D., Dean, J. P., & Mongan, A. (2020). Ibrutinib restores immune cell numbers and function in first-line and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, 97, 106432. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2020.106432>
- Song, H., & Cerny, J. (2003). Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1923-1935. <https://doi.org/10.1084/jem.20031498>
- Stone, M. J. (2009). Waldenström's macroglobulinemia: Hyperviscosity syndrome and cryoglobulinemia. *Clinical Lymphoma & Myeloma*, 9(1), 97-99. <https://doi.org/10.3816/CLM.2009.n.026>
- Stone, M. J., & Pascual, V. (2010). Pathophysiology of Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica*, 95(3), 359-364. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.017251>
- Sun, H., Fang, T., Wang, T., Yu, Z., Gong, L., Wei, X., Wang, H., He, Y., Liu, L., Yan, Y., Sui, W., Xu, Y., Yi, S., Qiu, L., & Hao, M. (2022). Single-cell profiles reveal tumor cell heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in Waldenström macroglobulinemia. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 576. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03798-6>
- Sutherland, C. L., Chalupny, N. J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M., & Cosman, D. (2002). UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(2), 671-679. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.2.671>

- Suzuki, E., Umezawa, K., & Bonavida, B. (2016). Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines : Involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. *Oncogene*, *35*(42), 5576. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.207>
- Terré, C., Nguyen-Khac, F., Barin, C., Mozziconacci, M. J., Eclache, V., Léonard, C., Chapiro, E., Farhat, H., Bouyon, A., Rousselot, P., Choquet, S., Spentchian, M., Dubreuil, P., Leblond, V., & Castaigne, S. (2006). Trisomy 4, a new chromosomal abnormality in Waldenström's macroglobulinemia : A study of 39 cases. *Leukemia*, *20*(9), 1634-1636. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404314>
- Tikhonova, A. N., Dolgalev, I., Hu, H., Sivaraj, K. K., Hoxha, E., Cuesta-Domínguez, Á., Pinho, S., Akhmetzyanova, I., Gao, J., Witkowski, M., Guillaumot, M., Gutkin, M. C., Zhang, Y., Marier, C., Diefenbach, C., Kousteni, S., Heguy, A., Zhong, H., Fooksman, D. R., ... Aifantis, I. (2019). The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature*, *569*(7755), 222-228. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1104-8>
- Treon, S. P., Xu, L., Yang, G., Zhou, Y., Liu, X., Cao, Y., Sheehy, P., Manning, R. J., Patterson, C. J., Tripsas, C., Arcaini, L., Pinkus, G. S., Rodig, S. J., Sohani, A. R., Harris, N. L., Laramie, J. M., Skifter, D. A., Lincoln, S. E., & Hunter, Z. R. (2012). MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *The New England Journal of Medicine*, *367*(9), 826-833. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200710>
- Tsubata, T., & Reth, M. (1990). 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. *The Journal of Experimental Medicine*, *172*(3), 973-976. <https://doi.org/10.1084/jem.172.3.973>
- Tsukamoto, A., Weissman, I. L., & Hunt, S. V. (1984). Allelic exclusion in rat kappa immunoglobulin chains : Extent of Jk rearrangement in normal B lymphocytes. *The EMBO Journal*, *3*(5), 975-981. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb01916.x>
- Tsukamoto, H., Fujieda, K., Senju, S., Ikeda, T., Oshiumi, H., & Nishimura, Y. (2018). Immune-suppressive effects of interleukin-6 on T-cell-mediated anti-tumor immunity. *Cancer Science*, *109*(3), 523-530. <https://doi.org/10.1111/cas.13433>
- Tumang, J. R., Francés, R., Yeo, S. G., & Rothstein, T. L. (2005). Spontaneously Ig-secreting B-1 cells violate the accepted paradigm for expression of differentiation-associated transcription factors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *174*(6), 3173-3177. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3173>
- Uppal, N. N., Monga, D., Vernace, M. A., Mehtabdin, K., Shah, H. H., Bijol, V., & Jhaveri, K. D. (2019). Kidney diseases associated with Waldenström macroglobulinemia. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, *34*(10), 1644-1652. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy320>
- van Keimpema, M., Grüneberg, L. J., Mokry, M., van Boxtel, R., Koster, J., Coffey, P. J., Pals, S. T., & Spaargaren, M. (2014). FOXP1 directly represses transcription of proapoptotic genes and cooperates with NF-κB to promote survival of human B cells. *Blood*, *124*(23), 3431-3440. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-553412>

- van Oers, N. S., von Boehmer, H., & Weiss, A. (1995). The pre-T cell receptor (TCR) complex is functionally coupled to the TCR-zeta subunit. *The Journal of Experimental Medicine*, *182*(5), 1585-1590. <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1585>
- Vari, F., Arpon, D., Keane, C., Hertzberg, M. S., Talaulikar, D., Jain, S., Cui, Q., Han, E., Tobin, J., Bird, R., Cross, D., Hernandez, A., Gould, C., Birch, S., & Gandhi, M. K. (2018). Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood*, *131*(16), 1809-1819. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-796342>
- Veillette, A., Zúñiga-Pflücker, J. C., Bolen, J. B., & Kruisbeek, A. M. (1989). Engagement of CD4 and CD8 expressed on immature thymocytes induces activation of intracellular tyrosine phosphorylation pathways. *The Journal of Experimental Medicine*, *170*(5), 1671-1680. <https://doi.org/10.1084/jem.170.5.1671>
- Victora, G. D., Dominguez-Sola, D., Holmes, A. B., Deroubaix, S., Dalla-Favera, R., & Nussenzweig, M. C. (2012). Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood*, *120*(11), 2240-2248. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415380>
- Victora, G. D., Schwickert, T. A., Fooksman, D. R., Kamphorst, A. O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M. L., & Nussenzweig, M. C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*, *143*(4), 592-605. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.032>
- Vincent-Fabert, C., Saintamand, A., David, A., Alizadeh, M., Boyer, F., Arnaud, N., Zimmer-Strobl, U., Feuillard, J., & Faumont, N. (2019). Reproducing indolent B-cell lymphoma transformation with T-cell immunosuppression in LMP1/CD40-expressing mice. *Cellular & Molecular Immunology*, *16*(4), 412-414. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0197-6>
- Vincent-Fabert, C., Soubeyran, I., Velasco, V., Parrens, M., Jeannet, R., Lereclus, E., Gachard, N., Feuillard, J., & Faumont, N. (2019). Inflamed phenotype of splenic marginal zone B-cell lymphomas with expression of PD-L1 by intratumoral monocytes/macrophages and dendritic cells. *Cellular & Molecular Immunology*, *16*(6), 621-624. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0228-y>
- von Boehmer, H., Teh, H. S., & Kisielow, P. (1989). The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunology Today*, *10*(2), 57-61. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(89\)90307-1](https://doi.org/10.1016/0167-5699(89)90307-1)
- Waldenström, J. (1944). Incipient myelomatosis or «essential» hyperglobulinemia with fibrinogenopenia—A new syndrome? *Acta Medica Scandinavica*, *117*(3-4), 216-247. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1944.tb03955.x>
- Wang, A., Pan, D., Lee, Y.-H., Martinez, G. J., Feng, X.-H., & Dong, C. (2013). Cutting edge : Smad2 and Smad4 regulate TGF- $\beta$ -mediated Il9 gene expression via EZH2 displacement. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *191*(10), 4908-4912. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300433>
- Wertz, I. E., & Dixit, V. M. (2010). Signaling to NF-kappaB : Regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(3), a003350. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003350>



- Whitmire, J. K., Tan, J. T., & Whitton, J. L. (2005). Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(7), 1053-1059. <https://doi.org/10.1084/jem.20041463>
- Williams, A. M., Maman, Y., Alinikula, J., & Schatz, D. G. (2016). Bcl6 Is Required for Somatic Hypermutation and Gene Conversion in Chicken DT40 Cells. *PloS One*, 11(2), e0149146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149146>
- Wolf, Y., Anderson, A. C., & Kuchroo, V. K. (2020). TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nature Reviews. Immunology*, 20(3), 173-185. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0224-6>
- Wong, K. L., Tai, J. J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., & Wong, S.-C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, 118(5), e16-31. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326355>
- Wright, G. W., Huang, D. W., Phelan, J. D., Coulibaly, Z. A., Roulland, S., Young, R. M., Wang, J. Q., Schmitz, R., Morin, R. D., Tang, J., Jiang, A., Bagaev, A., Plotnikova, O., Kotlov, N., Johnson, C. A., Wilson, W. H., Scott, D. W., & Staudt, L. M. (2020). A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell*, 37(4), 551-568.e14. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.015>
- Wu, Y., He, X., Huang, N., Yu, J., & Shao, B. (2020). A20 : A master regulator of arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 22(1), 220. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-02281-1>
- Xiao, G., Fong, A., & Sun, S.-C. (2004). Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking I kappa B kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30099-30105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401428200>
- Xochelli, A., Bikos, V., Polychronidou, E., Galigalidou, C., Agathangelidis, A., Charlotte, F., Moschonas, P., Davis, Z., Colombo, M., Roumelioti, M., Sutton, L.-A., Groenen, P., van den Brand, M., Boudjoghra, M., Algara, P., Traverse-Glehen, A., Ferrer, A., Stalika, E., Karypidou, M., ... Stamatopoulos, K. (2019). Disease-biased and shared characteristics of the immunoglobulin gene repertoires in marginal zone B cell lymphoproliferations. *The Journal of Pathology*, 247(4), 416-421. <https://doi.org/10.1002/path.5209>
- Xu, Z., Zan, H., Pone, E. J., Mai, T., & Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination : Induction, targeting and beyond. *Nature Reviews. Immunology*, 12(7), 517-531. <https://doi.org/10.1038/nri3216>
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F., & Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation : Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-1>
- Yang, Z.-Z., Grote, D. M., Ziesmer, S. C., Niki, T., Hirashima, M., Novak, A. J., Witzig, T. E., & Ansell, S. M. (2012). IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1271-1282. <https://doi.org/10.1172/JCI59806>

- Yang, Z.-Z., Kim, H. J., Villasboas, J. C., Price-Troska, T., Jalali, S., Wu, H., Luchtel, R. A., Polley, M.-Y. C., Novak, A. J., & Ansell, S. M. (2019). Mass Cytometry Analysis Reveals that Specific Intratumoral CD4+ T Cell Subsets Correlate with Patient Survival in Follicular Lymphoma. *Cell Reports*, 26(8), 2178-2193.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.085>
- Ye, J., Livergood, R. S., & Peng, G. (2013). The role and regulation of human Th17 cells in tumor immunity. *The American Journal of Pathology*, 182(1), 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.041>
- Yi, S., Yan, Y., Jin, M., Bhattacharya, S., Wang, Y., Wu, Y., Yang, L., Gine, E., Clot, G., Chen, L., Yu, Y., Zou, D., Wang, J., Phan, A. T., Cui, R., Li, F., Sun, Q., Zhai, Q., Wang, T., ... Wang, L. (2022). Genomic and transcriptomic profiling reveals distinct molecular subsets associated with outcomes in mantle cell lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 132(3), e153283. <https://doi.org/10.1172/JCI153283>
- Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M., & Saito, T. (2012). Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(6), 1201-1217. <https://doi.org/10.1084/jem.20112741>
- Yokoyama, W. M., & Kim, S. (2006). Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunological Reviews*, 214, 143-154. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00458.x>
- Yu, X., Li, W., Deng, Q., Li, L., Hsi, E. D., Young, K. H., Zhang, M., & Li, Y. (2018). MYD88 L265P Mutation in Lymphoid Malignancies. *Cancer Research*, 78(10), 2457-2462. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0215>
- Yu, X., Li, W., Deng, Q., Liu, H., Wang, X., Hu, H., Cao, Y., Xu-Monette, Z. Y., Li, L., Zhang, M., Lu, Z., Young, K. H., & Li, Y. (2021). MYD88 L265P elicits mutation-specific ubiquitination to drive NF- $\kappa$ B activation and lymphomagenesis. *Blood*, 137(12), 1615-1627. <https://doi.org/10.1182/blood.2020004918>
- Zenz, T., Mertens, D., Küppers, R., Döhner, H., & Stilgenbauer, S. (2010). From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews. Cancer*, 10(1), 37-50. <https://doi.org/10.1038/nrc2764>
- Zhang, Z., Espinoza, C. R., Yu, Z., Stephan, R., He, T., Williams, G. S., Burrows, P. D., Hagman, J., Feeney, A. J., & Cooper, M. D. (2006). Transcription factor Pax5 (BSAP) transactivates the RAG-mediated V(H)-to-DJ(H) rearrangement of immunoglobulin genes. *Nature Immunology*, 7(6), 616-624. <https://doi.org/10.1038/ni1339>
- Zhong, W., Liu, X., Zhu, Z., Li, Q., & Li, K. (2021). High levels of Tim-3+Foxp3+Treg cells in the tumor microenvironment is a prognostic indicator of poor survival of diffuse large B cell lymphoma patients. *International Immunopharmacology*, 96, 107662. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107662>
- Zucca, E., & Bertoni, F. (2016). The spectrum of MALT lymphoma at different sites : Biological and therapeutic relevance. *Blood*, 127(17), 2082-2092. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-624304>

## Annexes

---

<b>Annexe 1. Article détaillant la caractérisation du modèle <i>Myd88</i><sup>L252P</sup> (Continuous MYD88 Activation Is Associated With Expansion and Then Transformation of IgM Differentiating Plasma Cells).....</b>	<b>172</b>
<b>Annexe 2. Article préliminaire publié dans BioRxiv (B-cell specific expression of the murine <i>Myd88</i><sup>L252P</sup> mutation correlates with the establishment of an immunosuppressive microenvironment in Waldenström macroglobulinemia lymphoplasmacytic lymphoma).....</b>	<b>173</b>
<b>Annexe 3. Analyse du niveau d'expression de PD-L1 en IHC et Western blot .....</b>	<b>174</b>

**Annexe 1. Article détaillant la caractérisation du modèle *Myd88*<sup>L252P</sup> (Continuous MYD88 Activation Is Associated With Expansion and Then Transformation of IgM Differentiating Plasma Cells).**



# Continuous MYD88 Activation Is Associated With Expansion and Then Transformation of IgM Differentiating Plasma Cells

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Pablo Engel,  
University of Barcelona, Spain

### Reviewed by:

Hiromi Kubagawa,  
German Rheumatism Research  
Center (DRFZ), Germany  
Rachel Maurie Gerstein,  
University of Massachusetts Medical  
School, United States

### \*Correspondence:

Christelle Vincent-Fabert  
christelle.vincent-fabert@unilim.fr  
Jean Feuillard  
jean.feuilleard@unilim.fr

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

<sup>‡</sup>These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
B Cell Biology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 14 December 2020

**Accepted:** 14 April 2021

**Published:** 04 May 2021

### Citation:

Ouk C, Roland L, Gachard N,  
Poulain S, Oblet C, Rizzo D,  
Saintamand A, Lemasson Q,  
Carrion C, Thomas M, Balabanian K,  
Espéli M, Parrens M, Soubeyran I,  
Boulin M, Faumont N, Feuillard J and  
Vincent-Fabert C (2021) Continuous  
MYD88 Activation Is Associated With  
Expansion and Then Transformation of  
IgM Differentiating Plasma Cells.  
*Front. Immunol.* 12:641692.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.641692

Catherine Ouk<sup>1†</sup>, Lilian Roland<sup>1†</sup>, Nathalie Gachard<sup>1‡</sup>, Stéphanie Poulain<sup>2‡</sup>, Christelle Oblet<sup>1</sup>, David Rizzo<sup>1</sup>, Alexis Saintamand<sup>1</sup>, Quentin Lemasson<sup>1</sup>, Claire Carrion<sup>1</sup>, Morgane Thomas<sup>1</sup>, Karl Balabanian<sup>3</sup>, Marion Espéli<sup>3</sup>, Marie Parrens<sup>4</sup>, Isabelle Soubeyran<sup>5</sup>, Mélanie Boulin<sup>1</sup>, Nathalie Faumont<sup>1</sup>, Jean Feuillard<sup>1\*</sup> and Christelle Vincent-Fabert<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> UMR CNRS 7276/INSERM U1262 CRIBL, University of Limoges, and Hematology Laboratory of Dupuytren Hospital University Center (CHU) of Limoges, Limoges, France, <sup>2</sup> UMR CANTHER « CANCER Heterogeneity, Plasticity and Resistance to THERapies » INSERM 1277-CNRS 9020 UMRS 12, University of Lille, Hematology Laboratory, Biology and Pathology Center, CHU de Lille, Lille, France, <sup>3</sup> Institut de Recherche Saint-Louis, EMILy, INSERM U1160, University of Paris, Paris, France, <sup>4</sup> Pathology Department, Hospital University Center of Bordeaux, Bordeaux, France, <sup>5</sup> Laboratory of Pathology, Institut Bergonié, Bordeaux, France

Activating mutations of *MYD88* (*MYD88*<sup>L265P</sup> being the far most frequent) are found in most cases of Waldenström macroglobulinemia (WM) as well as in various aggressive B-cell lymphoma entities with features of plasma cell (PC) differentiation, such as activated B-cell type diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). To understand how MYD88 activation exerts its transformation potential, we developed a new mouse model in which the *MYD88*<sup>L252P</sup> protein, the murine ortholog of human *MYD88*<sup>L265P</sup>, is continuously expressed in CD19 positive B-cells together with the Yellow Fluorescent Protein (*Myd88*<sup>L252P</sup> mice). In bone marrow, IgM B and plasma cells were expanded with a CD138 expression continuum from IgM<sup>high</sup> CD138<sup>low</sup> to IgM<sup>low</sup> CD138<sup>high</sup> cells and the progressive loss of the B220 marker. Serum protein electrophoresis (SPE) longitudinal analysis of 40 *Myd88*<sup>L252P</sup> mice (16 to 56 weeks old) demonstrated that ageing was first associated with serum polyclonal hyper gammaglobulinemia (hyper Ig) and followed by a monoclonal immunoglobulin (Ig) peak related to a progressive increase in IgM serum levels. All *Myd88*<sup>L252P</sup> mice exhibited spleen enlargement which was directly correlated with the SPE profile and was maximal for monoclonal Ig peaks. *Myd88*<sup>L252P</sup> mice exhibited very early increased IgM PC differentiation. Most likely due to an early increase in the Ki67 proliferation index, IgM lymphoplasmacytic (LP) and plasma cells continuously expanded with age being first associated with hyper Ig and then with monoclonal Ig peak. This peak was consistently associated with a spleen LP-like B-cell lymphoma. Clonal expression of both membrane and secreted  $\mu$  chain isoforms was demonstrated at the mRNA level by high throughput sequencing. The *Myd88*<sup>L252P</sup> tumor transcriptomic signature identified both proliferation and canonical NF- $\kappa$ B p65/RelA activation. Comparison with *MYD88*<sup>L265P</sup> WM showed that *Myd88*<sup>L252P</sup> tumors also

shared the typical lymphoplasmacytic transcriptomic signature of WM bone marrow purified tumor B-cells. Altogether these results demonstrate for the first time that continuous MYD88 activation is specifically associated with clonal transformation of differentiating IgM B-cells. Since MYD88<sup>L252P</sup> targets the IgM PC differentiation continuum, it provides an interesting preclinical model for development of new therapeutic approaches to both WM and aggressive MYD88 associated DLBCLs.

**Keywords:** MYD88 L265P mutation, lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström's macroglobulinemia, IgM secretion, monoclonal Ig peak, B-cell lymphoma, plasma cell

## INTRODUCTION

Waldenström's macroglobulinemia (WM) is an incurable indolent B-cell lymphoma of the elderly accounting for less than 5% of B-cell lymphomas with, as unique characteristics, a serum IgM peak and primary medullary localization of lymphoplasmacytic cells that exhibit continuous differentiation from mature B lymphocytes to IgM secretory plasma cells (1). Secondary lymphoid organ infiltration and/or a leukemic phase is found in 20% cases. Other manifestations include neuropathy, cryoglobulinemia, skin rash, cold-agglutinin hemolytic anemia, and amyloidosis (2). The discovery of the activating mutation of MYD88 (MYD88<sup>L265P</sup> being the far most frequent) in more than 90% of WM cases contributed to the concept that this entity is genetically distinct from other B-cell lymphomas (3, 4). Being present in 50% of IgM monoclonal gammopathies of undetermined significance (MGUS), MYD88 mutations are most likely a primary event in WM (5). Considered as secondary genetic events, activating mutations of CXCR4 (CXCR4<sup>S338X</sup> or CXCR4<sup>WHIM</sup>), a receptor implicated in migration and bone marrow (BM) homing of leucocytes, are found in 30% of WM cases (6). Additional mutations of CD79b, ARID1A or TP53 have been reported (7).

Despite these advances, WM pathophysiology is incompletely understood. Its treatment remains challenging and the exact role of MYD88 mutations in the emergence of lymphoplasmacytic B-cell clones is not known (7, 8). Indeed, MYD88 mutations are also found in 30% of activated B-cell type diffuse large B-cell lymphomas (ABC-DLBCL), more than half of primary cutaneous DLBCLs, leg type, and many DLBCLs at immune-privileged sites but not in plasma cell myelomas, even IgM types (9). It should be noted that IgM expression is a surrogate marker of ABC-DLBCLs (10). Moreover, all these aggressive B-cell tumors associated with MYD88, which often exhibit morphological features of plasma cell (PC) differentiation, are all associated with expression of the PC differentiation marker IRF4. MYD88 protein is the canonical adapter for inflammatory signaling pathways to downstream members of the Toll-like receptor (TLR) and interleukin-1 receptor (IL-1R) families. Forming the myddosome complex, MYD88 binds IL-1R or TLR family members to IRAK kinases family. IRAK activation leads to activation of the NF kappa B (NF-κB) transcription factor and interferon 3 and 7 regulatory factors (IRF3 and 7). MYD88<sup>L265P</sup> constitutively increases formation of the myddosome complex with downstream NF-κB activation (3, 11, 12).

Experimentally, MYD88<sup>L265P</sup> is essential for survival of ABC-DLBCL and WM cell lines (3, 11). A recent publication suggests the involvement of HOIP and LUBAC-dependent NF-κB activation in the transformation potential of MYD88 activation in a mouse model (13). The current published mouse models with continuous MYD88 activation in the B-cell lineage develop aggressive clonal B-cell lymphomas that resemble human ABC-DLBCLs (13–15). Although discussed by Jo et al. in the HOIP/LUBAC activation context, no IgM peak was reported in these models. Therefore, the question of a direct role for MYD88 in the development of a lymphoplasmacytic lymphoma with monoclonal IgM secretion is still open. Recently, K Schmidt et al. reported a mouse model in which MYD88 activation was responsible for an indolent lymphoproliferative disorder resembling to IgM monoclonal gammopathy of unknown significance (IgM MGUS), the asymptomatic preclinical stage of WM (16).

Here, we present a new mouse model in which the MYD88<sup>L252P</sup> protein, the murine ortholog of human MYD88<sup>L265P</sup>, is continuously expressed in the B-cell lineage together with Yellow Fluorescent Protein (YFP) (Myd88<sup>L252P</sup> mice). We show that these mice first developed early expansion of CD93<sup>neg</sup> IgM PCs with an increase in both IgM secretion and bone marrow relocalization of IgM B-cells. Moreover, these mice also had increased percentages of IgM<sup>high</sup> CD138<sup>low</sup> and IgM<sup>low</sup> CD138<sup>high</sup> cells with a CD138 expression continuum between both cell types. Then, these mice developed an oligoclonal or clonal IgM lymphoplasmacytic-like B-cell lymphoma together with a serum IgM monoclonal peak. These tumors had marked transcriptomic similarities to WM but they were located in the spleen and exhibited significant increased proliferation. Despite differences between Myd88<sup>L252P</sup> LP-like B-cell tumors and WM, our results demonstrate that the MYD88 transformation potential is strongly associated with a shift in B-cell peripheral differentiation toward plasma cells with IgM secretion. These results help explain why MYD88 activation is found in most WM and in various aggressive B-cell lymphomas with IgM PC differentiation engagement such as ABC DLBCLs.

## MATERIALS AND METHODS

### Generation of the Transgenic Mouse Line Myd88<sup>L252P</sup>

The transgenes (cDNA) Myd88<sup>WT</sup>-IRES-Yfp and Myd88<sup>L252P</sup>-IRES-Yfp were synthesized (Genecust, Dudelange, Luxembourg)

and inserted into the pcDNA3.1 vector. Sequences of these transgenes are given in **Supplementary Materials and Methods**. The *Myd88<sup>L252P</sup>-IRES-Yfp* insert was cloned into the pROSA26-1 vector (17) containing a LoxP-flanked region, consisting of a stop cassette and the *Neomycin* gene (18). The transgene *Myd88<sup>L252P</sup>-IRES-Yfp* was inserted downstream from the stop cassette. JM8 embryonic stem (ES) cells were transfected with the targeting vector according to a previously described protocol (19). Targeted ES cells were screened for homologous recombination by PCR. Genomic DNA (gDNA) extraction was performed using an in house protocol and consisted of gDNA precipitation with absolute ethanol. Twenty nanograms gDNA were used for each PCR (primer sequences in **Supplementary Materials and Methods**) using LongAmp<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA) according to the manufacturer's recommendations. Recombined ES cells were injected into C57BL/6J blastocysts which were transferred into foster mothers to obtain chimeric mice (Myd88<sup>L252P-flSTOP</sup> mice).

## Mice

Cd19<sup>Cre</sup> mice (20) and mice carrying the *Myd88<sup>L252P</sup>-IRES-Yfp* allele were crossed to induce the expression of the transgene in B cells (Myd88<sup>L252P</sup> mice). Offspring were routinely screened by PCR using specific primers for insertion of the transgene (**Supplementary Materials and Methods**). Animals were housed at 21–23°C with a 12-hour light/dark cycle. All procedures were conducted under an approved protocol according to European guidelines for animal experimentation (French national authorization number: 8708503 and French ethics committee registration number APAFIS#14581-2018041009469362 v3).

## Cell Transfection and NF-κB Dependent Dual-Luciferase Reporter Assay

A20 cells (5.10<sup>6</sup>) were co-transfected with 5 μg of either empty pcDNA3.1, pcDNA3.1-*Myd88<sup>WT</sup>* or pcDNA3.1-*Myd88<sup>L252P</sup>* vectors, plus 100 ng pRL-TK *Renilla luciferase* expression vector (Promega Corporation, Madison, WI) and 5 μg of either the 3X-κB-L vector with three copies of the major histocompatibility complex (MHC) class I κB element or its mutated counterpart, the 3X-mutκB-L vector (21) using Amaxa L013 program (AMAXA Biosystems, Cologne, Germany). Twenty four hours after transfection, cells were lysed and luciferase activities were measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System and the Turner Designs TD-20/20 Luminometer (Promega Corporation, Madison, WI).

## Sera Analyses

Serum was obtained from blood collected retro-orbitally. Specific ELISA and serum electrophoresis assay were performed as previously described (19, 22).

## Flow Cytometry and *In Vivo* Proliferation Assays

In order to collect BM cells of Cd19<sup>Cre</sup> and Myd88<sup>L252P</sup> mice, femurs from both hind legs were rinsed with PBS and sternum

was gently crushed and cells filtered on a nylon meshwork that was rinsed with PBS. Spleen cells from Cd19<sup>Cre</sup> and Myd88<sup>L252P</sup> were filtered through a sterile nylon membrane. Blood samples were collected retro-orbitally. Red cells were lysed by RBC Lysis Buffer (Biolegend, San Diego, CA). Cell suspensions were resuspended at 4°C in a labeling buffer (PBS, 1% BSA, 2mM EDTA) and labeled with fluorescent conjugated monoclonal antibodies listed in **Supplementary Materials and Methods**. Labeled cells were analyzed using a BD Fortessa SORP flow cytometer (BD Bioscience France, Le Pont de Claix, France). Results were analyzed using Kaluza Flow Cytometry software 1.2 (Beckman Coulter, Brea, CA).

## Immunohistochemistry

Paraffin embedded tissue sections (5μm) were deparaffinized as follows: slides were immersed successively in xylene twice for 3 min, 3 times for 3 min in 100% ethanol, once for 3 min in 95% ethanol and 3 times in PBS for 5 min. Then, slides were immersed in citrate buffer pH7 and heated 4 times for 5 min 40 sec in a microwave at 800W. Image acquisition was performed with the Nanozoomer 2.0RS Hamamatsu and NDP.scan software (812 Joko-cho, Higashi-ku, Hamamatsu City, 431-3196, Japan). Quantification of Ki67 nuclear labelling was performed with the imageJS and the Ki67 module: <http://imagejs.org/?http://module.imagejs.googlecode.com/git/mathbiol.chromomarkers.js&http://module.imagejs.googlecode.com/git/ki67> (23).

## Gene Expression Profiling

A series of seven mice (three Cd19<sup>Cre</sup> and four Myd88<sup>L252P</sup>) was studied in parallel with bone marrow purified tumor B-cells from a series of 11 patients with *MYD88<sup>L265P</sup>* WM (series 1) as well as lymph nodes from a series of 58 patients: 19 *MYD88<sup>WT</sup>* chronic lymphocytic leukemia, 15 *MYD88<sup>L265P</sup>* WM, 12 *MYD88<sup>wt</sup>* Nodal marginal zone lymphoma, 5 *MYD88<sup>wt</sup>* WM, 4 follicular lymphoma and 3 patients with benign follicular hyperplasia (series 2, **Supplementary Tables 1 and 2**). Approval of this protocol was obtained from the local IRB of the CHRU of Lille (CSTMT043). *MYD88* and *CXCR4* mutational status was determined as previously described (6). Total mRNA was extracted from whole infiltrated tissues and purified B-cells as reported (24). For humans and mice, RNA amplification and hybridization onto microarrays were performed on an Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array and on an Affymetrix Gene Atlas system<sup>®</sup> with the MoGene-2\_1-st-v1 Affymetrix chip (Affymetrix, Santa Clara, CA) respectively according to a previously described protocol (25) (GEO accession number GSE138273). Bioinformatic analyses are detailed in **Supplementary Materials and Methods**.

## Repertoire Analysis

RNA was extracted from total spleen, and 1μg was used for sequencing. Transcripts were amplified by 5'RACE PCR using reverse primers hybridizing within either the membrane or secreted exon of the μ or γ genes. ProtoScript<sup>®</sup> II Reverse Transcriptase (New England Biolabs, Ipswich, MA) was used for reverse transcription and amplicons were obtained using

Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA) according to the manufacturer's instructions. Primers used are listed in **Supplementary Materials and Methods**. Illumina sequencing adapter sequences were added by primer extension, and resulting amplicons were sequenced on an Illumina MiSeq sequencing system using MiSeq kit Reagent V2 500 cycles. Paired reads were merged using FLASH (26). Repertoire analysis was done using the IMGT/HighV-QUEST online tool ([http://www.imgt.org/IMGT\\_vquest/vquest](http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest)). The resulting output was parsed by in-house R script.

## RESULTS

### Generation of a Mouse Model With Insertion of the Mouse Mutation Myd88<sup>L252P</sup> Into the Rosa26 Locus

To study the effect of continuous MYD88 activation on B-cell differentiation, we created a transgene containing the mutant murine cDNA sequence of *Myd88* (*Myd88<sup>L252P</sup>*) which is orthologous to the human mutant sequence *MYD88<sup>L265P</sup>*, in frame with the Yellow Fluorescent Protein (*Yfp*) sequence and separated by an Internal Ribosome Entry Site (IRES) sequence (*Myd88<sup>L252P</sup>-IRES-Yfp*) (**Supplementary Figure 1A**). To validate this transgene, we checked that it induced expression of both MYD88<sup>L252P</sup> and YFP proteins in the murine A20 B-cell line (**Supplementary Figures 1B, C**) and that it was responsible for constitutive NF-κB activation (**Supplementary Figure 1D**). The *Myd88<sup>L252P</sup>-IRES-Yfp* insert was cloned into the pROSA26.1 vector (17) (**Supplementary Figure 1E**). In this construct, the insert was subcloned downstream from a *Neomycin-STOP* cassette flanked by LoxP sites. Chimeric mice were intercrossed to obtain stable germinal transmission of the *Myd88<sup>L252P</sup>-IRES-Yfp* transgene (*Myd88<sup>L252P</sup>-flSTOP* mice). *Myd88<sup>L252P</sup>-flSTOP* and *Cd19<sup>Cre</sup>* mice were crossed. Mice with both transgenes (*Myd88<sup>L252P</sup>* mice) were then studied, with their age matched *Cd19<sup>Cre</sup>* littermates as controls (*Cd19<sup>Cre</sup>* LMC). Specific B-cell expression of the transgene was found in more than 90% of blood and spleen B cells compared to virtually no expression in the T-cell compartment (**Supplementary Figure 1F**). As expected and as evidence of NF-κB activation, *Myd88<sup>L252P</sup>* splenocytes over-expressed the NF-κB target gene *Tnfrsf3* at the mRNA level (**Supplementary Figure 1G**).

### Serum Protein Electrophoresis Profiles Segregate Myd88<sup>L252P</sup> Mice According to Age

As a first exploratory step, serum protein electrophoresis (SPE) was systematically performed on a series of 40 *Myd88<sup>L252P</sup>* mice and 26 age matched *Cd19<sup>Cre</sup>* LMCs. As shown in **Figure 1A** three SPE profiles were seen: normal, polyclonal hyper gammaglobulinemia (hyper Ig) and a monoclonal Ig peak. All *Cd19<sup>Cre</sup>* LMCs exhibited normal SPE regardless of their age. In other words, SPEs with hyper Ig or Ig peaks were found only in *Myd88<sup>L252P</sup>* mice (**Figures 1A, B**). **Figure 1B** shows the relationship between the age of *Myd88<sup>L252P</sup>* mice and the SPE

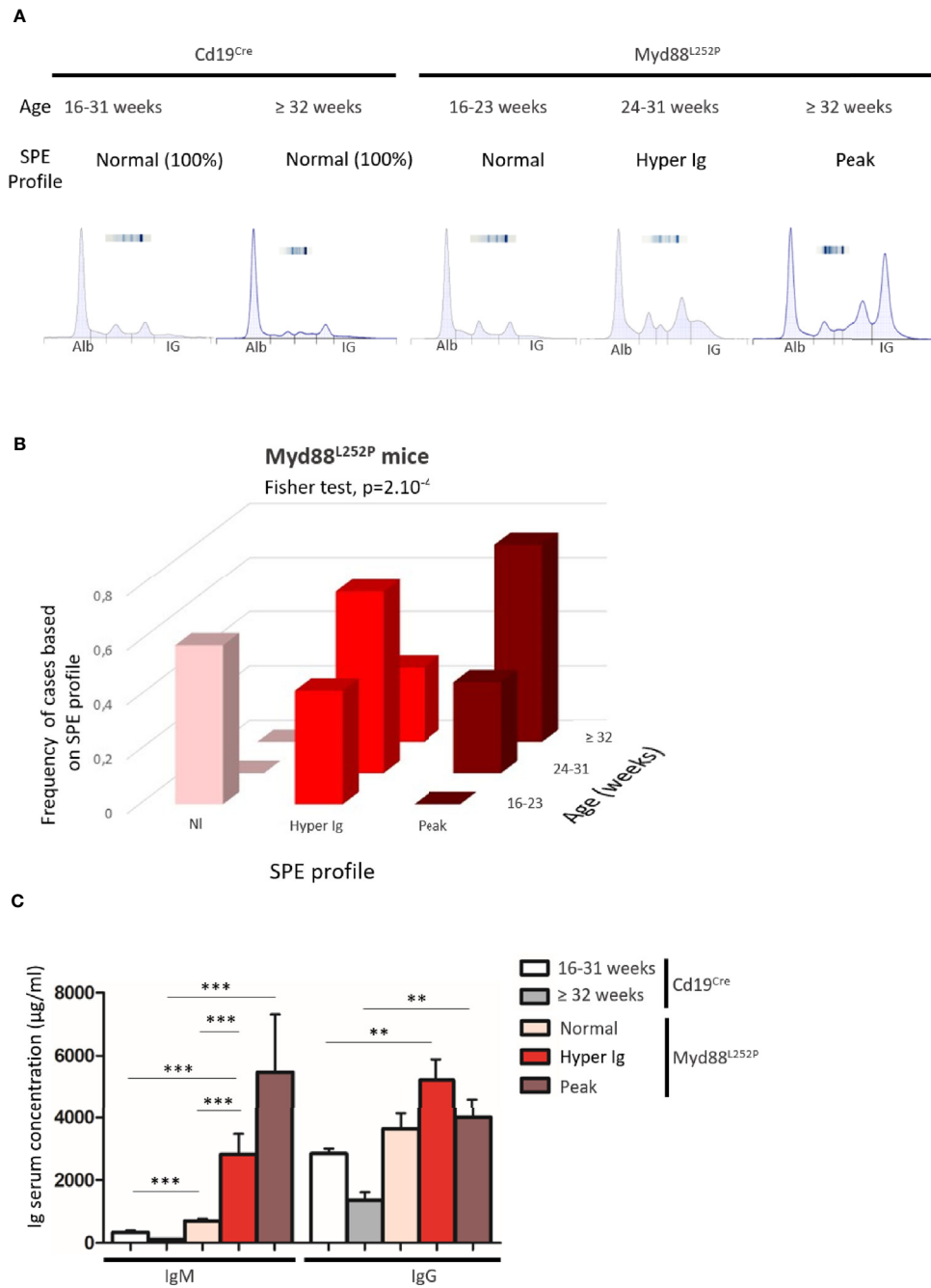
profile. Young *Myd88<sup>L252P</sup>* mice (16-23 weeks) had a normal or hyper Ig SPE profile. In contrast, most mice older than 32 weeks had an Ig peak. In between these two groups, 24 to 31 week old mice (middle age) had a hyper Ig or an Ig peak in 65% and 35% cases respectively (Fisher test,  $p=2.10^{-4}$ ). ELISA quantification of serum Ig revealed that young *Myd88<sup>L252P</sup>* mice with a normal SPE exhibited a moderate IgM and IgG hyper Ig when compared to their *Cd19<sup>Cre</sup>* LMC (**Figure 1C** and **Supplementary Figure 2**). Serum IgG levels of middle aged and old *Myd88<sup>L252P</sup>* mice were variable when compared to their young counterparts. This was in contrast to serum IgM levels that were significantly increased in middle aged mice and even more so in old mice and correlated with the SPE profile and age (**Figure 1C** and **Supplementary Figure 2**).

These results first indicate that continuous MYD88 activation in B cells was associated with a global increase in Ig secretion. Second, age related occurrence of polyclonal hyper Ig and then monoclonal Ig peaks correlated with the increase in serum IgM levels. This suggests that, after a polyclonal expansion phase, aging of *Myd88<sup>L252P</sup>* mice was associated with clonal restriction of IgM-secreting B-cells, very likely reflecting the MYD88<sup>L252P</sup> B-cell transformation power in these cells. Therefore, these first results point to a strong relationship between MYD88<sup>L252P</sup> and IgM-secreting B-cells.

### Myd88<sup>L252P</sup> Bone Marrow IgM Plasma Cell Content Was Increased and Displayed a CD138 Expression Continuum

As shown in **Figure 2A**, *Myd88<sup>L252P</sup>* bone marrow global B-cell content was comparable to that of *Cd19<sup>Cre</sup>* LMCs in terms of percentages in 16 week old mice with normal SPE. Transgene expression was mainly found in *Myd88<sup>L252P</sup>* *CD19<sup>high</sup>* B-cells. Indeed, with an on/off effect, percentages of YFP positive cells (*i.e.* of LoxP rearranged cells) was directly correlated with *CD19* mean fluorescence intensity (**Figure 2B**). Comparison of *CD19<sup>Cre</sup>* LMC and *Myd88<sup>L252P</sup>* mice did not reveal any significant bone marrow B-cell increase with age. However older *Myd88<sup>L252P</sup>* mice had increased levels of IgM<sup>pos</sup> *CD19<sup>high</sup>* B-cells (**Figures 3A, B**, left panel and **Supplementary Figure 3** for the gating strategy). Strikingly, a CD138 expression continuum was clearly evident in a triple parametric B220/CD138/IgM histogram gated on mature B-cells and/or PCs in *Myd88<sup>L252P</sup>* mice only (**Figure 3A**, lower panel see in red the decrease in B220 and the increase in CD138 expression). This CD138 expression continuum, that we recently showed to be characteristics of MYD88<sup>L265P</sup> WM bone marrow tumor B-cells (Gayet et al, Cytometry B 2021), started from IgM<sup>high</sup> CD138<sup>low</sup> and ended at IgM<sup>low</sup> CD138<sup>high</sup> cells (**Figure 3A**, lower panel). This CD138 expression continuum was absent in *Cd19<sup>Cre</sup>* LMCs. Consequently, *Myd88<sup>L252P</sup>* mice showed increased percentages of both IgM<sup>high</sup> CD138<sup>low</sup> B-cells (most likely precursors of IgM PCs) and total bone marrow PCs (**Figure 3B**, right panel). Moreover, the proportion of bone marrow IgM PCs was significantly increased in young *Myd88<sup>L252P</sup>* mice and even more in older *Myd88<sup>L252P</sup>* mice (**Figure 3C**). Indeed, *Myd88<sup>L252P</sup>* *CD19<sup>pos</sup>/YFP<sup>pos</sup>* B cells tended to accumulate in the



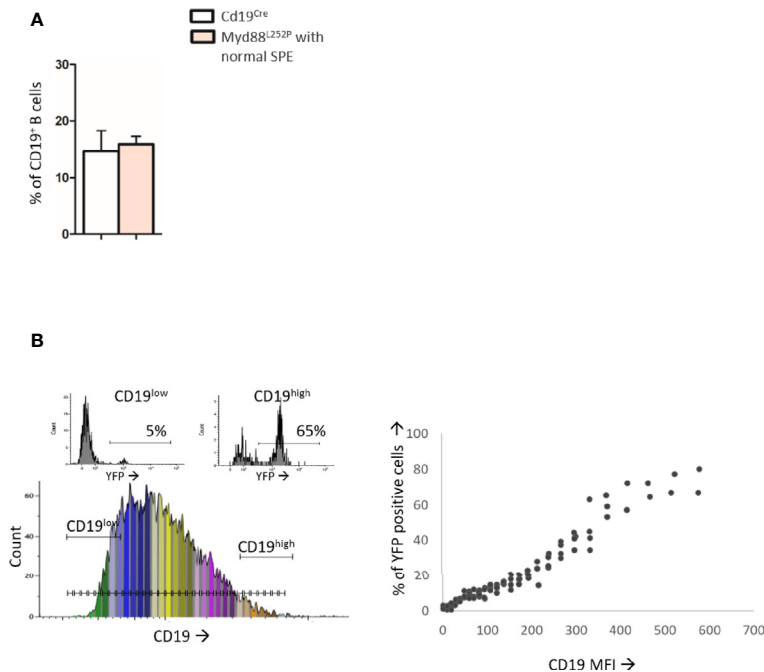


**FIGURE 1** | Myd88<sup>L252P</sup> transgenic mice exhibited serum IgM hypergammaglobulinemia and then monoclonal IgM peaks when ageing. **(A)** Examples of serum protein electrophoresis of Cd19<sup>Cre</sup> mice (respectively 16 and 36 weeks-old) and three Myd88<sup>L252P</sup> mice (16, 24 and 36 week-old) with normal, polyclonal hypergammaglobulinemia (hyper Ig) and monoclonal Ig peaks respectively. **(B)** Frequencies of cases according to SPE profile and age for Myd88<sup>L252P</sup> mice (n = 40). **(C)** IgM and IgG serum levels in Cd19<sup>Cre</sup> and Myd88<sup>L252P</sup> mice. For Cd19<sup>Cre</sup> (n = 15), Myd88<sup>L252P</sup> (n = 36). Results are expressed as the mean ± SEM. Mann Whitney test p-value < 0.01 and < 0.001 are symbolized by \*\* and \*\*\* respectively.

IgM<sup>high</sup> B-cell compartment when compared to its Myd88<sup>L252P</sup> CD19<sup>pos</sup>/YFP<sup>neg</sup> counterpart (**Supplementary Figure 4**).

Altogether, these results indicate that transgene expression started in a minority of CD19<sup>weak</sup> B-cell precursors and was

mainly expressed at the latest stages of B-cell lymphopoiesis when CD19 expression was high. Evidence for bone marrow increase in both IgM<sup>high</sup> CD138<sup>low</sup> and PCs with the characteristic CD138 expression continuum may either suggest



**FIGURE 2** | Analysis of B-cell differentiation in bone marrow from 16 week-old Cd19<sup>Cre</sup> and Myd88<sup>L252P</sup> mice. **(A)**: Percentage of CD19<sup>pos</sup> and/or B220<sup>pos</sup> B-cells in bone marrow from 16 week-old Cd19<sup>Cre</sup> (n = 9) and Myd88<sup>L252P</sup> mice (n = 9). Results are expressed as the mean ± SEM. **(B)**: Flow cytometry analysis of the transgene expression according to CD19 expression levels (n=9). Left panel: CD19 monoparametric histogram sliced according to CD19 MFI intervals. For each CD19 MFI interval, the percentage of bone marrow B220<sup>pos</sup> YFP positive cells was noted. Two examples of YFP monoparametric histograms are presented in the upper part, one for CD19<sup>low</sup> B220<sup>pos</sup> B-cells and one for CD19<sup>high</sup> B220<sup>pos</sup> B-cells with their respective percentages of YFP<sup>pos</sup> cells. Right panel: percentage of YFP<sup>pos</sup> B220<sup>pos</sup> B-cells (Y axis) according to CD19 MFI (X axis).

that the bone marrow of Myd88<sup>L252P</sup> mice had the ability to home IgM PC precursors and PCs and/or a shift in peripheral B-cell differentiation toward IgM PC in Myd88<sup>L252P</sup> mice.

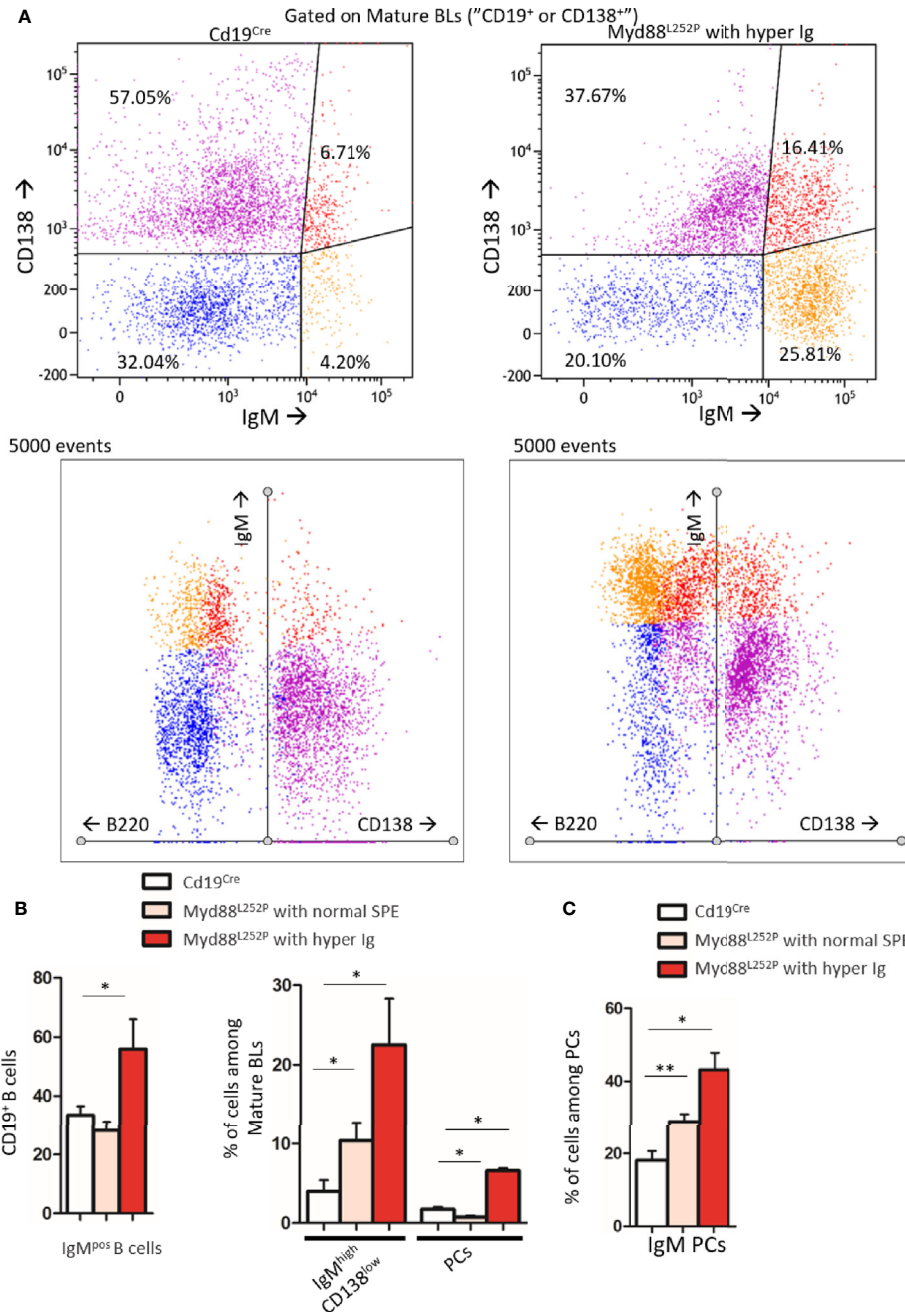
## MYD88<sup>L252P</sup> First Induced Peripheral Early Lymphoplasmacytic and Plasma Cells Expansion and Then B-Cell Transformation Into a Lymphoplasmacytic-Like Lymphoma

Extended white blood cell differential was not altered and mice did not exhibit any palpable/visible peripheral lymphadenopathy (data not shown) regardless of the SPE profile. Young Myd88<sup>L252P</sup> mice with normal SPE tended to have spleen enlargement when compared to their age related Cd19<sup>Cre</sup> LMCs (**Figure 4**). Spleen enlargement was dramatically increased in Myd88<sup>L252P</sup> mice with hyper Ig and even more so in those with an IgM peak, a feature that was most likely related to B-cell transformation. Indeed, the B/T cell ratio was markedly increased in these latter mice (**Supplementary Figure 5**).

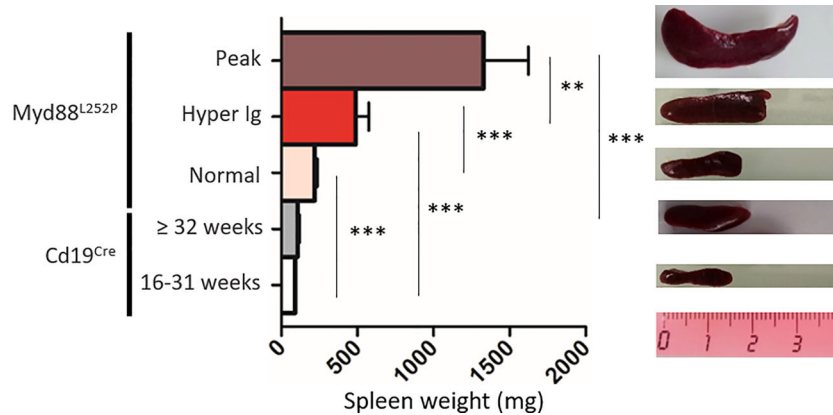
While spleen histology of young Myd88<sup>L252P</sup> mice was comparable to that of their Cd19<sup>Cre</sup> LMCs, with an apparent normal spleen architecture, Myd88<sup>L252P</sup> mice with hyper Ig or an Ig peak exhibited enlarged and congruent lymphoid nodules (**Figures 5A–E**). At high magnification, a marked lymphoplasmacytic aspect

consisting of a mixture of small to large lymphocytes with numerous lymphoplasmacytic cells (LP cells) and PCs was noted in all Myd88<sup>L252P</sup> mice whatever their SPE profile (**Figures 5F–J**). This spleen aspect was particularly striking for mice with Ig peaks, and was characterized by massive and diffuse infiltration of lymphoplasmacytic cells that evoked human B-cell lymphomas with features of PC differentiation, further called “LP-like lymphoma” or “LP-like tumors”. (see also the cytological imprint in **Supplementary Figure 6**). Presence of LP cells and PCs in Myd88<sup>L252P</sup> spleen was invariably confirmed by immunohistochemistry after intracellular Ig labeling regardless of SPE status, with numerous LP cells and terminally differentiated PCs (cells with intermediate or strong intracytoplasmic Ig labeling respectively). Noteworthy, cell densities were markedly increased in Myd88<sup>L252P</sup> mice with hyper Ig or with an Ig peak (**Figures 5K–O**).

Based on B-cell expression of CD21 and CD23, frequencies of CD21<sup>pos</sup> CD23<sup>high</sup> follicular B-cells were not significantly altered in Myd88<sup>L252P</sup> mice regardless of their SPE status (**Figure 6A** and **Supplementary Figure 7**). In contrast, a decrease of CD21<sup>high</sup> CD23<sup>pos</sup> marginal zone B-cells was observed. This cell content nearly disappeared in Myd88<sup>L252P</sup> mice with an Ig peak. Only total PCs were increased in these mice (**Figure 6B**). However, among total spleen PCs, percentages of IgM PCs were increased in a similar manner in all Myd88<sup>L252P</sup> mice no matter what their SPE status was (**Figure 6C** and **Supplementary**



**FIGURE 3 |** Increase in the IgM PC compartment in bone marrow from Myd88<sup>L252P</sup> transgenic mice. **(A)** Example of bi and triple parametric flow cytometry histograms gated on mature B or plasma cells for expression of IgM, B220 and CD138 for Cd19<sup>Cre</sup> and Myd88<sup>L252P</sup> mice (left and right panels respectively). Upper panels: IgM<sup>low</sup> or neg CD138<sup>neg</sup>, IgM<sup>high</sup> CD138<sup>low</sup>, IgM<sup>high</sup> CD138<sup>high</sup> and IgM<sup>low</sup> CD138<sup>high</sup> cells are colored in blue, orange, red and purple respectively using a hinged quadstat of the Kaluza software and an IgM/CD138 2-dimensional plot. The hinged quadstat was set-up for one Cd19<sup>Cre</sup> mouse. Lower panels: triple parametric histograms using the radar function of the Kaluza software. Note the CD138 expression continuum on Myd88<sup>L252P</sup> bone marrow B-cells that correlated with a progressive decrease in B220 expression. This CD138 expression continuum was virtually absent in Cd19<sup>Cre</sup> mice. **(B)** Percentages of total IgM<sup>pos</sup> B cells and IgM<sup>high</sup> CD138<sup>low</sup> pre PCs and B220<sup>low</sup> CD138<sup>high</sup> PCs in bone marrow from 16-24 week-old Cd19<sup>Cre</sup> (n = 6) and Myd88<sup>L252P</sup> mice with normal SPE or hyper Ig (n = 6 and n = 3 respectively). Results are shown as the mean ± SEM. Mann Whitney test p-value < 0.05 is symbolized by \*. **(C)** Percentages of IgM<sup>pos</sup> CD138<sup>high</sup> PCs among total PCs in bone marrow from 16-31 week-old Cd19<sup>Cre</sup> (n = 6) and Myd88<sup>L252P</sup> mice with normal SPE or hyper Ig (n = 6 and n = 3 respectively). Results are shown as the mean ± SEM. Mann Whitney test p-value < 0.05 and < 0.01 are symbolized by \* and \*\* respectively.



**FIGURE 4** | Myd88<sup>L252P</sup> mice exhibited a progressively increasing splenomegaly consistently related to the SPE profile. Spleen size of Cd19<sup>Cre</sup> and Myd88<sup>L252P</sup> age-paired mice. Myd88<sup>L252P</sup> mice were sacrificed together with at least one Cd19<sup>Cre</sup> mouse of the same age. Left panel: distribution of spleen weights; right panel: examples of spleen macroscopy (Cd19<sup>Cre</sup> n = 9 for 16-31 weeks-old and n = 16 for ≥ 32 weeks; Myd88<sup>L252P</sup> with normal SPE: n = 9; with hyper Ig: n = 13; with Ig peak: n = 19). Results are given as the mean ± SEM. Mann Whitney test p-value < 0.01 and p-value < 0.001 are symbolized by \*\* and \*\*\* respectively.

**Figure 7**). Moreover IgM PCs were predominantly CD93<sup>neg</sup> suggesting that they belonged to the proliferating PC compartment (27) (**Figure 6C** and **Supplementary Figure 7**).

Therefore, morphological and immunophenotypic results indicated that continuous MYD88 activation was associated with continuous peripheral IgM PC differentiation very early on and that these LP and PC subsets continuously expanded with age first being associated with hyper Ig and then with an Ig monoclonal peak and a LP-like lymphoma aspect in the spleen.

### Proliferation Index of Myd88<sup>L252P</sup> LP-Like Tumors Was Moderately Increased in Myd88<sup>L252P</sup> Tumors With an LP-Aspect

To better study these Myd88<sup>L252P</sup> LP-like tumors, we compared their Ki67 proliferation index to that of Cd19<sup>Cre</sup> LMCs as well as to L.CD40, L.CD40/Δc-MYC mice as controls. L.CD40 mice are a model of marginal zone spleen B cell indolent lymphomas without plasma cell differentiation but with NF-κB activation (28). L.CD40/Δc-MYC mice are a model of ABC-DLBCLs with both c-Myc and NF-κB activation in B-cells (24). Very few Ki67 positive cells were seen outside germinal centers in spleen sections from Cd19<sup>Cre</sup> mice (**Figure 7A** panel A). The Ki67 index was weak in L.CD40 mice (**Figure 7A** panel B). By contrast, the vast majority of cells from L.CD40/Δc-MYC tumors were Ki67 positive (**Figure 7A** panel C). Being moderately increased in young mice with a normal SPE, the Ki67 proliferative index was further enhanced in mice with hyper Ig and even higher in those with an Ig peak, but never reached the proliferation index levels of L.CD40/Δc-MYC tumors (**Figures 7A**, panels D–7 and **7B**). *In vivo* incorporation of BrdU was tested for four mice with an Ig peak and one with polyclonal hyper Ig. Results confirmed that the proliferation index was consistently increased (**Supplementary Figure 8**) albeit always less than 30% with this technique.

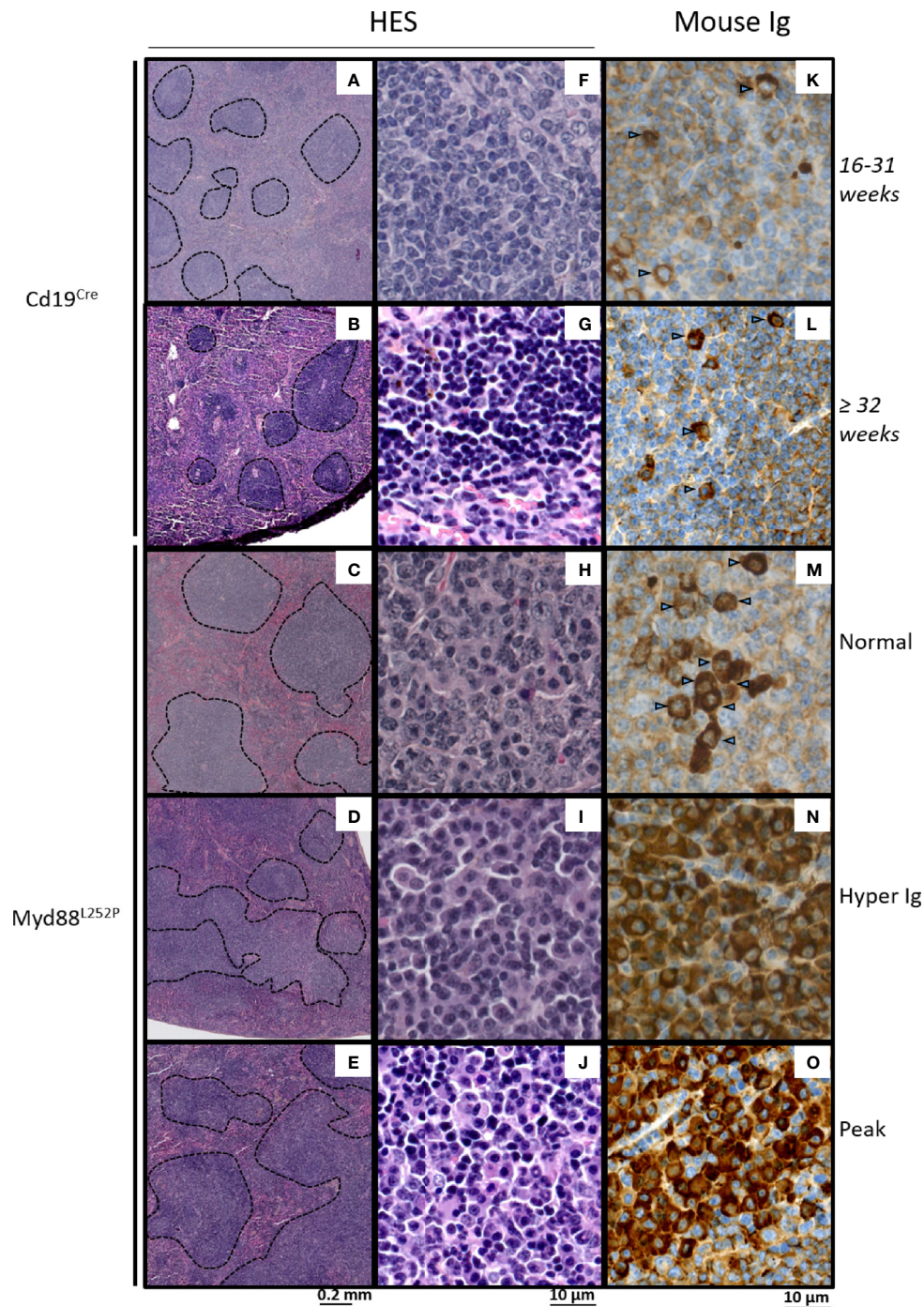
Altogether, these results show that MYD88<sup>L252P</sup> expression in B-cells was responsible for progressive peripheral B-cell

expansion related to an early increase in B-cell proliferation. Mice with an Ig peak clearly exhibited a lymphoproliferative disease with a marked increase in proliferation index but with features of an LP-like lymphoma such as the presence of numerous LP cells and PCs.

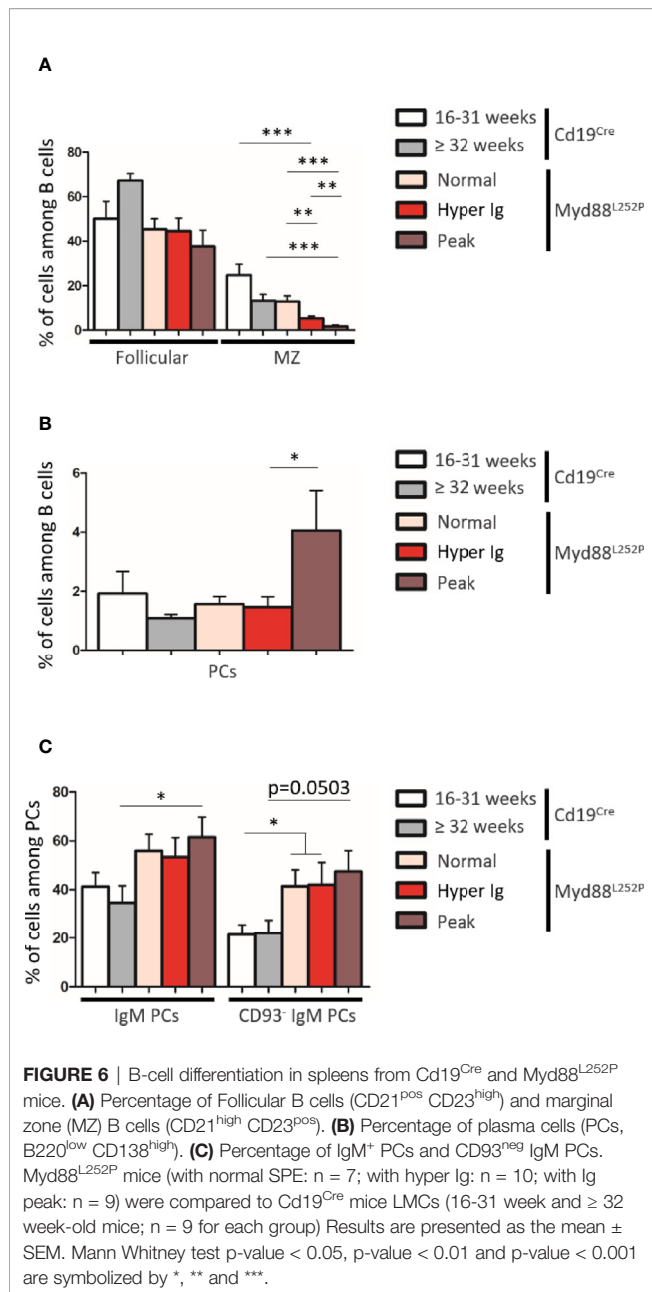
### Myd88<sup>L252P</sup> Mice With Ig Peaks Developed IgM but Not IgG Monoclonal or Oligoclonal B-Cell Lymphomas With Expression of Both Membrane and Secretory Heavy Chain mRNA

Since Myd88<sup>L252P</sup> mice had a global hyper Ig even if predominantly IgM, it was important to assess μ or γ chain clonality of tumor surface and secreted immunoglobulins at the molecular level. Six LP-like cases with monoclonal Ig peaks and five Cd19<sup>Cre</sup> mice were studied. mRNA reverse transcription followed by RACE PCR with primers specific for either the membrane or secreted forms of mouse μ or γ heavy chains was performed, followed by high throughput sequencing (HTS) of the VDJ-Cμ or VDJ-Cγ region (**Figure 8A**). **Figures 8B, C** show the relative frequency of the five most abundant mRNA clones for the μ or γ heavy chains respectively. RACE PCR and HTS results indicate that Myd88<sup>L252P</sup> mice developed clonal or oligoclonal B-cell expansion with expression of both secreted and membrane forms of the μ heavy chain that had the same VDJ-Cμ clonal rearrangement (**Figure 8B**), without any bias in terms of V segment usage (not shown). The same RACE PCR technique with primers specific for either the membrane or secreted form of the mouse γ heavy chain did not identify any significant B-cell clonal expansion in Myd88<sup>L252P</sup> tumors (**Figure 8C**).

These results indicate that, despite initial IgM and IgG hyper Ig in young Myd88<sup>L252P</sup> mice, MYD88<sup>L252P</sup> specifically promoted IgM B-cell lymphomagenesis with clonal expression of both membrane and secreted μ chain isoforms identical VDJ gene rearrangements. These results are in full agreement with the



**FIGURE 5** | Morphological and immunophenotypic plasma cell engagement of Myd88<sup>L252P</sup> tumors. Hematein eosin morphological aspect (**A–J**) and intracytoplasmic Ig labeling (**K–O**) of Cd19<sup>Cre</sup> and Myd88<sup>L252P</sup> spleens: one 16–31 week-old Cd19<sup>Cre</sup> (**A, F, K**), one ≥ 32 week-old Cd19<sup>Cre</sup> (**B, G, L**) and three Myd88<sup>L252P</sup> (**C, H, M**) for Normal group, (**D, I, N**) for Hyper Ig group and **E, J, O** for Peak group) mice are shown. Panels (**A–E**) at low magnification, Myd88<sup>L252P</sup> tumors often exhibited a nodular pattern (**C–E**). Panels (**F–J**): at high magnification, most Myd88<sup>L252P</sup> tumors had small B-cell aspects with marked lymphoplasmacytic engagement (panels **H–J**). Panels (**K–O**) Myd88<sup>L252P</sup> tumors with a lymphoplasmacytic aspect exhibited marked plasma cell differentiation as revealed by the presence of intracytoplasmic Ig in numerous cells (arrows) with various labeling intensities (**M–O**).



lymphoplasmacytic aspect Myd88<sup>L252P</sup> tumors and the persistent IgM plasma cell differentiation continuum.

## Transcriptomic Signature of Myd88<sup>L252P</sup> LP-like Tumors Revealed NF- $\kappa$ B RelA Activation, Proliferation and Plasma Cell Differentiation and Overlapped With Waldenström's Macroglobulinemia Gene Expression Profile (GEP)

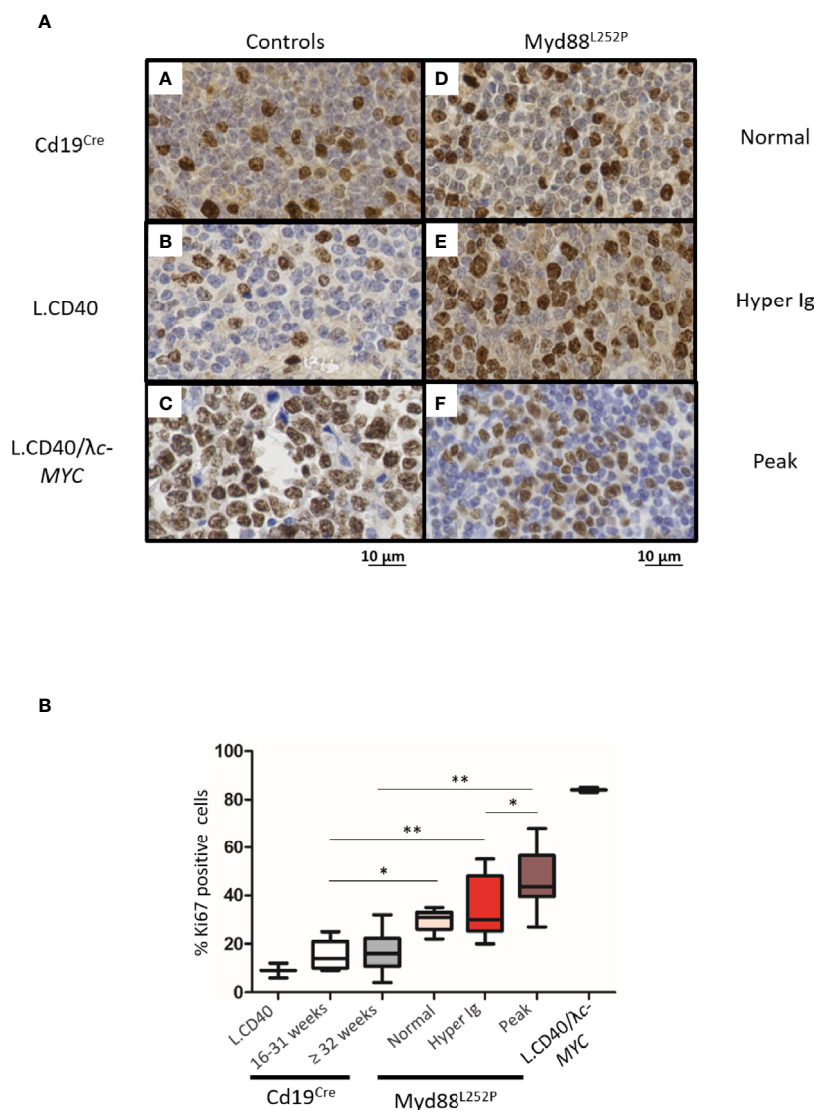
To explore the transcriptomic signature of Myd88<sup>L252P</sup> LP-like tumors in conditions similar to those of most studies on human B-cell lymphomas and to look for common features with WM,

we selected a short series of massively invaded Myd88<sup>L252P</sup> spleen tumors with monoclonal Ig peaks. Comparisons were first done with their Cd19<sup>Cre</sup> LMCs, and then with WM patients.

With a fold change of 2, a set of 1515 differentially expressed genes were found in Myd88<sup>L252P</sup> spleen tumors when compared to spleens from Cd19<sup>Cre</sup> LMCs (**Supplementary Table 3**). To analyze this set of genes, we combined both K-mean and hierarchical clustering and principal component analysis, as already published (29). Following this methodology, deregulated genes in Myd88<sup>L252P</sup> spleen tumors could be segmented into 14 classes of co-regulated genes (**Figure 9** with methodological details in **Supplementary Materials and Methods, Supplementary Figure 9** and **Supplementary Table 4**). Consistent with increased B/T ratios in Myd88<sup>L252P</sup> LP-like tumors, expression of genes belonging to the T-cell lineage, as well as T-cell signaling and activation signatures was down-regulated in Myd88<sup>L252P</sup> spleen tumors (**Figure 9**, see clusters I, K and L). Of note, RelB signature was associated with that of T-cells and was decreased in Myd88<sup>L252P</sup> spleen tumors. In contrast, expression of genes belonging to the proliferation, RelA NF- $\kappa$ B activation pathway and plasma cell differentiation signatures were up-regulated (**Figure 9**, cluster J mainly as well as cluster B, G and M for proliferation).

To identify MYD88<sup>L252P</sup> deregulated genes in common with those of WM patients having the MYD88<sup>L265P</sup> mutation, transcriptomes of Myd88<sup>L252P</sup> tumors were compared to those of purified WM bone marrow B-cells from a series of 11 MYD88<sup>L265P</sup> WM patients. A subset of 319 coherently dysregulated genes in both Myd88<sup>L252P</sup> LP-like tumors and WM tumor B-cells (163 up and 156 down, **Supplementary Tables 5, 6**) was extracted from the 1515 differentially expressed genes in Myd88<sup>L252P</sup> LP-like tumors. Unsupervised hierarchical clustering showed a 95% coherency between the branches of up and down regulated genes in both WM tumor B-cells and LP-like Myd88<sup>L252P</sup> spleen tumors (**Figure 10A**, left and middle panels and **Supplementary Tables 5, 6**). To check whether this Myd88<sup>L252P</sup>/WM signature could discriminate WM from other indolent NHLs, an independent series of 58 patients, including 15 MYD88<sup>L265P</sup> WM, five MYD88<sup>wt</sup> WM, 12 MYD88<sup>wt</sup> NMZLs and 19 MYD88<sup>wt</sup> CLL was analyzed (**Supplementary Tables 2, 7**). All MYD88<sup>L265P</sup> WM patients clustered together after unsupervised hierarchical clustering (**Figure 10A**, right panel and **Supplementary Tables 7, 8**). Also belonging to the MYD88<sup>L265P</sup> WM cluster were 3/5 (60%) MYD88<sup>wt</sup> WM and 2/12 (17%) MYD88<sup>wt</sup> NMZLs. We used the linear predicting score described by Wright et al. (31) to estimate the informativeness of the Myd88<sup>L252P</sup>/WM signature for WM diagnosis. As shown in **Figure 10B**, as set of 174 genes (84 up and 90 down, **Figure 10B**) was found to predict WM with over 90% probability (**Supplementary Tables 9, 10**).

The plasma cell signature was the main component of the Myd88<sup>L252P</sup>/WM GEP. Genes such as *EDEM1* and 2, *IRF4* or *XBPI* were over-expressed while others such as *PAX5* or *BCL6* were markedly down-regulated (**Figure 10**). Consistently, functions revealed by Gene Set Enrichment analysis mainly corresponded to endoplasmic reticulum and Golgi apparatus

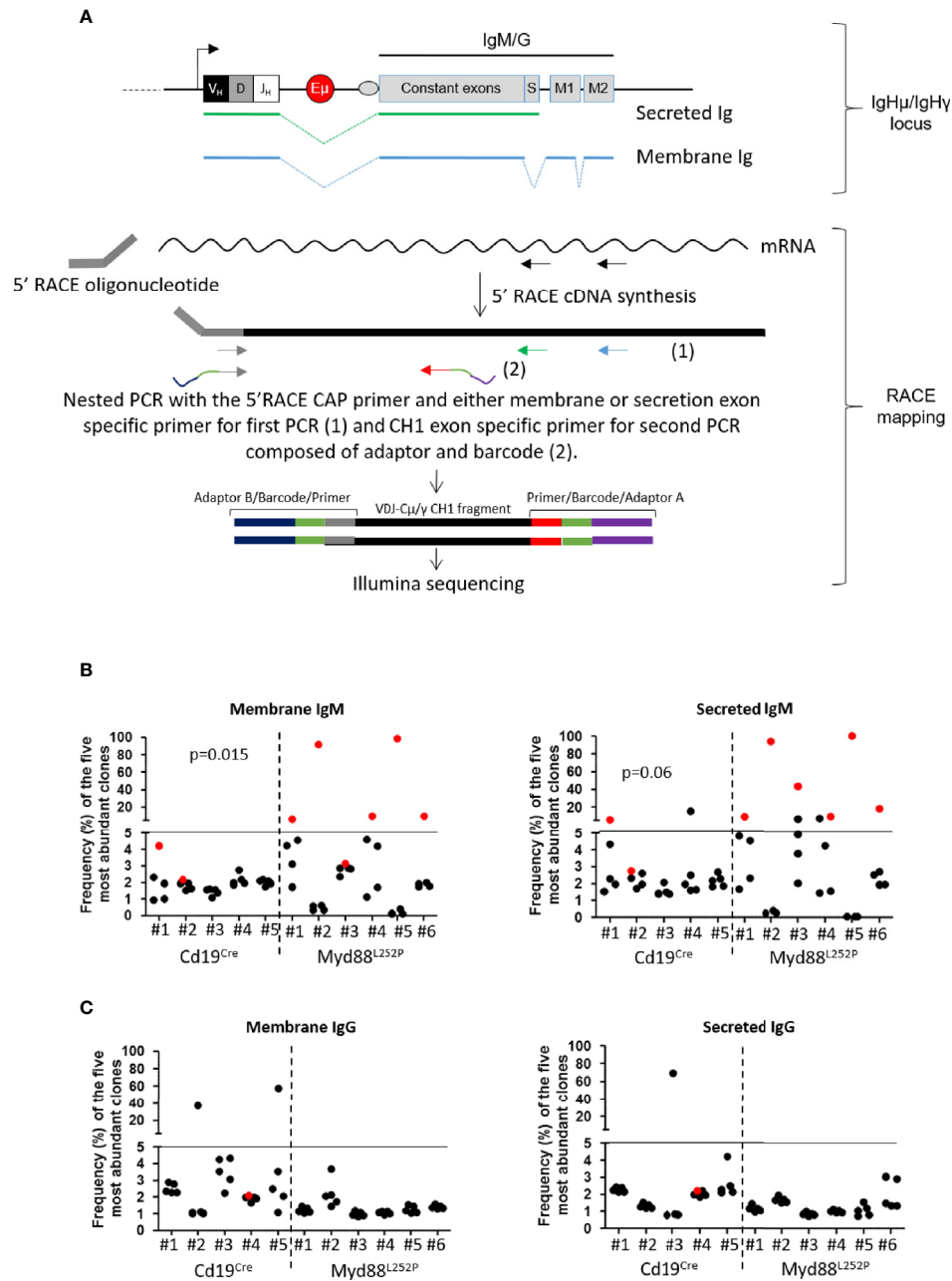


**FIGURE 7** | Intermediate increase in Myd88<sup>L252P</sup> tumor proliferation rate. **(A)** Examples of Ki67 labeling in spleen sections from three controls (panels A-C) and three Myd88<sup>L252P</sup> mice (panels D-F, n=28). Controls were Cd19<sup>Cre</sup> LMCs (panel A, n = 5 for 16-31 week-old mice and n = 8 for ≥ 32 week-old mice), L.CD40 mice (panel B) with indolent splenic lymphomas of marginal zone B-cells (n=2), as well as L.CD40/λc-Myc mice (panel C, n=2) with a ABC-DLBCL lymphomas (24, 28). The three Myd88<sup>L252P</sup> tumors (panels D-F) are one representative example of each group defined according the SPE profile (normal n = 5, hyper Ig n = 8 and Ig peak n = 15). Here, L.CD40 mice were used as a model of indolent B-cell lymphoma with a low proliferation index while L.CD40/λc-Myc mice were a model of aggressive B-cell lymphoma with a high proliferation index. **(B)** Quantification of Ki67 labeling. Box plots represent the median and quartile of percentages of Ki67 positive cells. Mann Whitney test p-value < 0.05, p-value < 0.01 are symbolized by \* and \*\* respectively.

(not shown). In accordance with results published by Hunter et al. (30), expression of genes such as *CXCR4*, *DUSP22*, *PIM1* and 2 or *TRAM1* was increased while expression of *SNED1* was decreased. Few genes of the Myd88<sup>L252P</sup>/WM signature overlapped with those of ABC/GC DLBCLs published by Wright et al. (31). These overlapping genes, corresponding only to those that are overexpressed in ABC DLBCLs, were *IRF4*, *IGHM*, *CXCR4*, *P2RX5*, *PIM1* and *PIM2*. In other words, the Myd88<sup>L252P</sup>/WM signature did not significantly overlap with that of GCB DLBCLs. Among other deregulated genes were cyclin kinase inhibitors *CDKN1B* (*p27<sup>kip1</sup>*) and *CDKN2C* (*p18/*

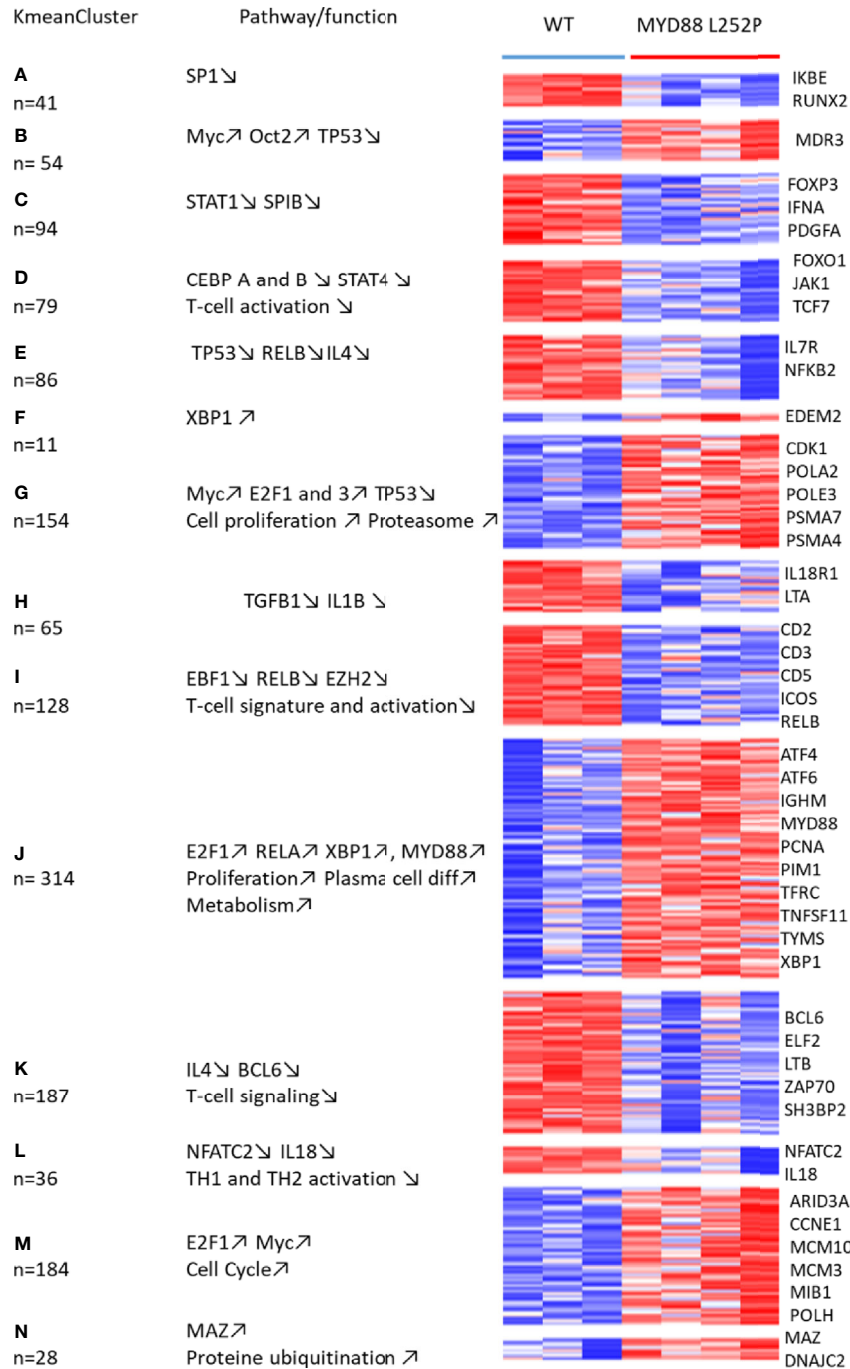
*INK4AC*), mutations of the former being found in hairy cell leukemias (32). *RASSF3* and *KRAS* were also up-regulated. *RASSF3* belongs to the Ras association domain family (RASSF).

Altogether, the Myd88<sup>L252P</sup> tumor signature highlights proliferation as well as canonical NF-κB p65/RelA activation (but not RelB), which is in agreement with the known fact that MYD88 activates the classical NF-κB pathway. The Myd88<sup>L252P</sup> tumor signature also strikingly confirms that lymphoplasmacytic differentiation is at the heart of MYD88 related B-cell transformation in mice, a feature shared with WM tumors with the MYD88<sup>L265P</sup> mutation.

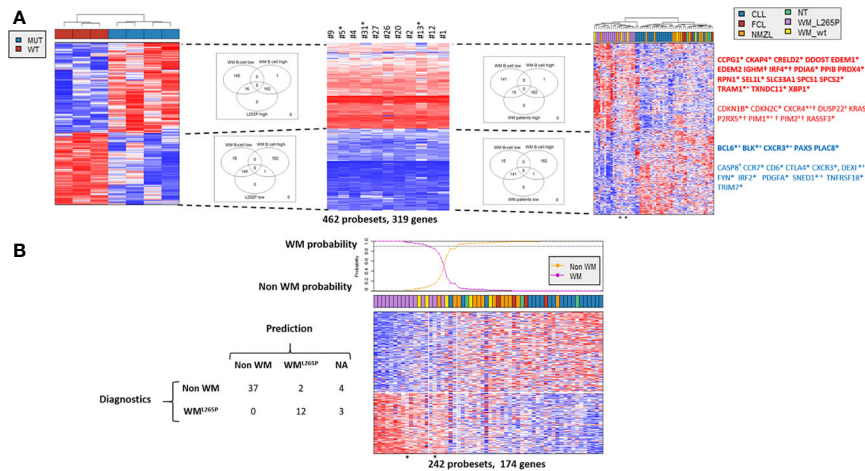


**FIGURE 8** |  $\mu$  and  $\gamma$  heavy chain mRNA clonal abundance: **(A)** RACE PCR technique quantifying clonal mRNA abundance of membrane and secreted forms of mouse  $\mu$  and  $\gamma$  heavy chains. *Igh $\mu$ /Igh $\gamma$*  locus (upper panel): *Igh* locus with variable regions (VDJ), the enhancer E $\mu$  and constant genes (for IgM or IgG). Box “S” represents the secreted exon used for the secreted form of Ig, “M1 and M2” represent the membrane exons for the membrane form of Ig. Green or blue dotted lines show RNA splicing respectively for secreted and membrane Ig. RACE mapping (lower panel): 5’RACE PCR followed by preparation of libraries for Illumina sequencing. First, we amplified cDNA between the primer specific for the membrane or the secreted form (black arrows) and the 5’RACE oligonucleotide. Amplicons for Illumina sequencing were obtained after two nested PCRs; the first with the 5’ RACE CAP primer and either membrane (blue arrow) or secretion (green arrow) exon specific primer, and the second with the same 5’ primer and a CH1 exon specific primer (grey arrow) and reverse (red) primers used for the second PCR contained adaptors (blue and purple) and a barcode (orange); each barcode sequence was specific for one sample only. **(B, C)** Relative frequency of the five most abundant mRNA clones coding for membrane (left) and secreted (right) forms of  $\mu$  **(B)** and  $\gamma$  **(C)** heavy chains for Cd19<sup>Cre</sup> (n = 5) and Myd88<sup>L252P</sup> (n = 6) mice. The most abundant clones are highlighted in red when VDJ sequences of the dominant membrane and secreted clones were identical. Myd88<sup>L252P</sup> mice exhibited IgM but not IgG clonal expansion with expression of both secreted and membrane form of the  $\mu$  chain. Wilcoxon’s test p-value are given in the figure.





**FIGURE 9** | Whole transcriptome analysis of Cd19<sup>Cre</sup> and Myd88<sup>L252P</sup> mice: total mRNA was extracted from whole spleen tissues. Gene expression profiles were obtained using the MoGene-2\_1-st-v1 Affymetrix chip. mRNA transcripts (3236) were selected to be differentially expressed using the Limma R package. Expressed genes that were too heterogeneous were eliminated, resulting in a final selection of 1515 genes. These genes were segregated into 40 Kmean clusters. The closest Kmean clusters were merged 2 by 2 according to their proximity by principal component analysis of the mean vectors. This was repeated until maximization of the absolute value of Chi2 (29). This resulted in 14 aggregated clusters. Functional annotation of the aggregated Kmean clusters was performed using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software. Annotated heatmap of the 1515 genes are segregated into the 14 aggregated clusters. Left: the aggregated Kmean clusters with the corresponding number of genes; middle: main pathways and or function identified with the IPA software; right: some relevant genes.



**FIGURE 10** | Comparison of gene expression profile (GEP) of *Myd88*<sup>L252P</sup> mice and patients with WM or other indolent B-cell NHL. Affymetrix differential gene expression profiles (GEP) between four *Myd88*<sup>L252P</sup> mice (MUT, n=4) and three *Cd19*<sup>Cre</sup> mice (WT, n=3) were compared to the Affymetrix GEP of purified bone marrow tumor B-cells from 11 WM patients with the *MYD88*<sup>L265P</sup> mutation, resulting in selection of 462 probesets (319 genes). This selection was used on the Affymetrix transcriptome of an independent series of lymph node biopsies from 58 patients: 19 *MYD88*<sup>wt</sup> chronic lymphocytic leukemias (CLL), 15 *MYD88*<sup>L265P</sup> WM (*WM*<sub>L265P</sub>), 12 *MYD88*<sup>wt</sup> nodal marginal zone lymphomas (NMZL), 5 *MYD88*<sup>wt</sup> WM with IgM peaks (*WM*<sub>WT</sub>), 4 follicular lymphomas (FCL) and 3 patients with follicular hyperplasia (NT). **(A)** Hierarchical clustering and heatmap of the 462 selected probesets for mice (left), purified bone marrow *MYD88*<sup>L265P</sup> WM B-cells (middle) and lymph nodes (right). Down and up-regulated genes are in blue and red respectively. Branches of down and up regulated genes in *Myd88*<sup>L252P</sup> mice, *MYD88*<sup>L265P</sup> WM bone marrow B-cells and *MYD88*<sup>L265P</sup> WM lymph nodes are delineated by dashed lines. Venn diagrams of the intersections between the branches are shown, highlighting the consistency between branches across the different clustering. Some genes of interest are noted on the right. In bold are those of the plasma cell signature; \*: genes in the predictor (see **Figure 7B**); +: genes reported by Hunter et al. in WM (30); †: genes of the ABC/GC DLBCL signature (31). **(B)**: Informativeness of *MYD88*<sup>L265P</sup> WM diagnosis using the 462 selected probesets defined in **Figure 8A**. The 462 probesets defined from *MYD88*<sup>L252P</sup> mice and bone marrow tumor B-cells from *MYD88*<sup>L265P</sup> WM patients were used to predict *MYD88*<sup>L265P</sup> WM diagnosis (*WM*<sup>L265P</sup> versus non WM) from other lymphomas within the series of 58 lymph node biopsies. Probabilities that each sample belongs to *WM*<sup>L265P</sup> versus non WM group are indicated. The *WM*<sup>L265P</sup> versus non WM or not attributed (NA) assignment is shown on the left.

## DISCUSSION

Different mouse preclinical models with continuous MYD88 activation in B-cells have been published; All but one demonstrate the B-cell transformation potential of MYD88 but without presenting evidence for a correlation between IgM B-cell LP and PC differentiation (13–15). The first report was published by Knittel et al. (14). The authors generated a mouse model that allows B-cell conditional expression of the *Myd88*<sup>L252P</sup> allele from the endogenous *Myd88* locus. In this model, expression of *Myd88*<sup>L252P</sup> would be regulated in a manner similar to that of the wild type allele. At least three regulatory levels of MYD88 activity have been reported. The MYD88 regulatory region harbors various transcription binding sites such as those for NF-κB, IRF1, SP1 or STAT factors and it was shown that this gene is regulated by IL-6 (33), which suggests a role for its expression in either plasma cell differentiation or inflammation. An alternative splice variant of *MYD88*, *MYD88s*, lacks exon 2 and is unable to activate NF-κB. This variant is also able to form a heterodimer with the full length MYD88 protein, resulting in decreased formation of the myddosome complex (34). *MYD88s* is increased during sepsis and is thought to ensure robust termination of MYD88 dependent inflammation (35, 36). As a third regulation mechanism, hypomethylation and upregulation of MYD88 are important for NF-κB activation (37). MYD88 promoter demethylation is important in glioblastoma and

is associated with increased MYD88 protein expression in lung cancers (38, 39). Mice from Knittel's model occasionally developed DLBCLs when they aged. Therefore, the Knittel mouse model raises the question of the relationship between B-cell lymphomagenesis and regulation of the endogenous *Myd88* locus throughout B-cell life. In addition, this model also showed hyper Ig, even if polyclonal, which may suggest that expansion of Ig secreting B-cells could precede the lymphoma development. In that view, K Schmidt et al. recently published a mouse model with a transgene closed to the one of the Knittel's model. But, after exploring the effect of MYD88 activation in three different Cre context, *Cd19*-Cre, *Cγ1*-Cre and *Cd19*-Cre<sup>ERT2</sup>, as well as analyzing the effect of NP-immunization, the authors concluded that MYD88 continuous activation promotes survival of long term IgM expressing B-cells with clonal restriction a monoclonal serum IgM paraprotein resulting in an IgM MGUS-like disorder (16).

To our knowledge, two papers, from Wang et al. and Sewastianik et al. reported the effect of the human MYD88<sup>L265P</sup> protein in murine B-cells (15, 40). In the model of Wang et al, primary murine B-cells were retrovirally infected *ex vivo* before reinjection. In this model, an initial boost of B-cell proliferation was seen followed by B-cell apoptosis in a Bim-dependent manner. Importantly, no increase in immunoglobulin secretion was reported. Beside the fact that retroviral infection of B-cells may have its own interfering effects, this model raises the question of whether the human MYD88<sup>L265P</sup> protein may have exactly the

same activation properties on a mouse B-cell background as in human B-lymphocytes. In the model of Sewastianik et al, the human loxP-flanked-stop-MYD88<sup>L265P</sup> transgene was inserted downstream from the mouse *Collagen type I alpha 1 chain* (*Col1A1*) gene and MYD88<sup>L265P</sup> expression was induced by crossing with *Aid<sup>Cre</sup>* mice (15). In addition to focal skin rashes, some WM features were noted such as expansion of lymphoplasmacytic cells and increased IgM serum levels. However, only DLBCL clonal transformation was seen. Because AID is mainly expressed in germinal center B-cells and because the promoter of the *Col1A1* gene is highly active in fibroblasts and osteoblasts (41), this model raises the question whether temporality and/or expression pattern could be important in MYD88 driven B-cell lymphomagenesis.

The *Rosa26* locus has been solidly proven to be valuable for expression of numerous oncogenes in the B-cell lineage (see reference (42) for discussion as well as the literature of the K Rajewsky's group). By inserting our *Myd88<sup>L252P</sup>-IRES-Yfp* transgene in this locus, we forced continuous expression of the mutated MYD88 protein in a heterozygous-like context while respecting the native MYD88 activation pathways of mouse B-cells. Moreover, we were able to monitor our transgene expression by flow cytometry due to YFP. Thereby, we created a conditional *Myd88<sup>L252P</sup>* mouse model closed to the one published by Jo et al. (13). However, these authors mainly focused their work on the synergy between MYD88 and the catalytic subunit HOIP which increases LUBAC ligase activity that in turns promotes NF- $\kappa$ B canonical activation; only four so-called CD19-cre-MYD88LP have been studied at the tumor stage.

Here, a longitudinal analysis of a series of 40 *Myd88<sup>L252P</sup>* mice compared to their age matched Cd19<sup>Cre</sup> LMCs demonstrated that IgM plasma cell expansion is at the heart of MYD88 dependent B-cell transformation. Indeed, by examining clonal restriction of IgM secreting B-cells, we first showed that ageing of *Myd88<sup>L252P</sup>* mice was associated with polyclonal hyper Ig followed by monoclonal Ig peak due to increased serum IgM. Second, we provide evidence indicating that bone marrow relocation of IgM B-cells, IgM<sup>high</sup> CD138<sup>low</sup> cells and IgM PCs was increased in *Myd88<sup>L252P</sup>* mice with a CD138 expression continuum, that is a characteristic of WM tumor B-cells. Third, analysis of spleen morphology and spleen B-cell subsets by flow cytometry indicated that continuous MYD88 activation was associated very early with peripheral LP cell and CD93<sup>neg</sup> IgM PC expansion and that these cell subsets were markedly increased at the time of the Ig monoclonal peak. Fourth, appearance of a monoclonal Ig peak was constantly associated with a B-cell lymphoma with marked features of lymphoplasmacytic differentiation, so-called *Myd88<sup>L252P</sup>* LP-like lymphoma. Fifth, at the molecular level, *Myd88<sup>L252P</sup>* specifically promoted IgM B-cell lymphomagenesis with mRNA clonal expression of both membrane and secreted  $\mu$  (but not  $\gamma$ ) chain isoforms. Finally, the *Myd88<sup>L252P</sup>* tumor gene expression profile not only highlights the canonical NF- $\kappa$ B p65/RelA activation pathway and proliferation, but also strikingly shares an *Xbp1* centered lymphoplasmacytic B-cell differentiation signature with

MYD88<sup>L265P</sup> WM. This signature differentiates MYD88<sup>L265P</sup> WM from other indolent B-cell tumors including marginal zone lymphomas. Our results contradict the conclusions of Sewastianik et al. (15), and, being in line with those of K Schmidt et al. (16), firmly demonstrate the specific transforming effect of MYD88 activation in IgM PC differentiating B-cells.

To establish the gene expression signature from bulk *Myd88<sup>L252P</sup>* spleen tumors rather than from purified B-cells is matter of discussion. The very obvious disadvantage of working on bulk tumors is certainly that all mRNA species from all cell types present in the tissue are mixed together. Even if massively invaded, both stromal and other residual immune cells (T-cells, macrophages, dendritic cells...) persist constantly in the tumor. In these conditions, specifically assigning a given mRNA expression pattern to tumor cells is always hazardous. However, because tumors were immediately snap-frozen, all mRNA species are supposed to be well preserved without any significant experimental bias. On the other hand, working on purified cells may also induce artefacts since the abundance of different mRNA species may vary during the time of purification which can also stress the cells. Above all, in the specific case of *Myd88<sup>L252P</sup>* spleen tumors, which exhibit an LP aspect with continuous PC differentiation, the key question would have been to choose the right negative selection marker. Indeed, tumor cells are phenotypically heterogeneous with variable expression of B220, surface Ig or CD138 for example. Should we have selected B220<sup>high</sup> versus B220<sup>low</sup> B-cells or CD138<sup>low</sup> versus CD138<sup>high</sup> cells? Rather than make wrong or partial choices concerning which tumor cells to purify, we chose to work on bulk *Myd88<sup>L252P</sup>* spleen tumors with well-preserved total mRNA and to compare this bulk signature to that of WM, including purified WM bone marrow tumor B-cells.

One characteristic feature of *Myd88<sup>L252P</sup>* B-cells was the strong reduction of the marginal zone B-cell compartment. While also characterized by continuous activation of NF- $\kappa$ B, the L.CD40 mouse model published by Hömig-Hözel et al. (28), in which B-cells are submitted to continuous CD40 activation signaling, showed expansion of marginal zone B-lymphocytes. This points out the differences between TLRs and CD40 in terms of NF- $\kappa$ B activation. Indeed, CD40 is able to activate both the classical and alternative pathways, i.e. to induce the nuclear translocation of RelA and RelB NF- $\kappa$ B containing complexes while TLRs only activate the classical pathway. The effect of both pathways as well as the strength of NF- $\kappa$ B activation on B-cell fate has been extensively discussed by Pillai et al. (43). In this review, the authors also indicate that BTK activation blocks the Notch signaling pathway that is essential for marginal zone B-cell differentiation. It turns out that Hunter et al. have shown that *Myd88* is able to activate BTK in a BCR independent manner (30), which consequently could repress B-cell maturation toward the marginal zone B-cell lineage.

Gene expression profiles of LP-like *Myd88<sup>L252P</sup>* tumors distinctly suggest the involvement of RelA rather than RelB. RelA, but not RelB, is clearly associated with EBV-dependent B-cell immortalization and with EBV-associated DLBCL tumors, which exhibit a phenotype close to that of ABC-DLBCLs (25).

RelA is also essential for development of GC-derived PCs (44) and immunohistochemistry detected nuclear RelA in WM B-cells (45). Indeed, LP-like Myd88<sup>L252P</sup> B-cell tumors shared strong overlaps with human WM in terms of gene expression profile. Even if a few genes were in common with the ABC-DBCL signature such as *IGHM*, *CXCR4* or *PIM1* and *PIM2*, the Myd88<sup>L252P</sup>/WM signature points to dysregulation of plasma cell differentiation as the keystone of MYD88 transforming physiopathology. It also suggests that *KRAS* activation could be important. *RASSF3* and *KRAS* itself were up-regulated in both Myd88<sup>L252P</sup> B-cell tumors and human WM. Consistently, and in agreement with results from the group of Treon (30), we also found *RASSF6* overexpression in WM patients (NG and JF unpublished results). *CXCR4*, whose expression is increased in WM, may activate the RAS pathway through RasGAP-associated proteins (46). The most frequent mutations involve *KRAS* and *NRAS* genes in multiple myeloma (47). Even if such mutations have not been reported in WM (6), our results highlight the putative role of the Ras activating pathway in WM, which may lead to the design of novel therapies.

Despite similarities between WM and Myd88<sup>L252P</sup> LP-like tumors such as serum Ig monoclonal peak, increase in IgM prePCs, PC bone marrow relocation and marked lymphoplasmacytic differentiation of tumor cells some major differences exist. The first difference, is the predominant site of tumor involvement. Even if splenomegaly is found in 20% of bona fide WM patients, it is largely admitted that bone marrow is the primary tumor site. In contrast, Myd88<sup>L252P</sup> LP-like mouse tumors mainly developed in the spleen. Physiologically, IgM PCs tend to reside mainly in the spleen whereas switched IgG PCs migrate to the bone marrow (48). This raises the question of why WM IgM tumor B-cells migrate to bone marrow. In that view, it is largely suspected that *CXCR4* mutation could play a role in bone marrow homing. Further studies could also evaluate the transforming potential of Myd88 by adoptive transfer of LP-like tumor B-cells. Whether the transferred tumor will retain the lymphoplasmacytic aspect would also be interesting.

Another significant difference is the presence of large cells and increased proliferation in Myd88<sup>L252P</sup> LP-like mouse tumors. The increased proliferation index was an early event since it was also found in young Myd88<sup>L252P</sup> mice with normal SPE. As we previously discussed (24), only three mouse models for indolent lymphomas of the spleen have been published, one mimicking TRAF3 inactivation, the second with constitutive expression of BCL10 and the last one with continuous CD40 signaling (the L.CD40 model that we used as a control in **Figure 7**) (28, 49, 50). These three models are characterized by increased RelB activation. We previously demonstrated that immune surveillance may influence morphology and proliferation in the L.CD40 model. In this model, immunosuppression led to transformation of small indolent B-cell L.CD40 tumors into large B-cells with increased proliferation. Reactivating the anti-tumor response using anti-PD-L1 immunotherapy led to tumor regression (51, 52). These results on this mouse model suggest that the immunologically silent “indolent phenotype” of a B-cell tumor could be related to the immune pressure exerted on tumor B-cells. Whether and how activation of the alternative and canonical NF-κB pathways

differently disturb immune surveillance remains to be determined, and comparison of both L.CD40 and Myd88<sup>L252P</sup> mouse models could provide answers. However, as in the L.CD40 tumor model and in spleen marginal zone lymphomas (52, 53), the PD1/PD-L1 axis is most likely playing a role in the immune escape of aggressive tumor B-cells with MYD88 activation. Using Eμ-*MYC* transgenic hematopoietic stem cells (HSC) stably transduced with naturally occurring NF-κB mutants to generate various primary mouse lymphomas, Reimann et al. recently showed that MYD88 tumors express high levels of PD-L1 and that anti-PD-1 therapies induce T-cell dependent senescence of tumor cells (54). PD-L1 surface expression is weak or absent on WM tumor B-cells. However soluble PD-L1 serum levels are increased in WM patients and PD-L1 is upregulated by IL6 (55).

In summary, our longitudinal study of Myd88<sup>L252P</sup> mice demonstrated that continuous MYD88 activation is able to promote early expansion of IgM LP cells and PCs with, first, serum polyclonal hyper Ig and then a monoclonal Ig peak. Ig peaks were constantly associated with B-cell lymphomas sharing characteristics with WM. Two major differences with WM were the spleen localization of Myd88<sup>L252P</sup> tumors and increased proliferation. Here, we showed for the first time that IgM lymphoplasmacytic B-cell differentiation is at the heart of Myd88<sup>L252P</sup> transforming potential. Thus, we also provide an interesting preclinical model for development of new therapeutic approaches or to study immune surveillance for example not only in WM but also in others B-cell lymphomas with features of plasma cell differentiation. Indeed, a better understanding of the underlying molecular mechanisms is necessary in order to develop new therapies for these incurable B-cell cancers.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, GSE138273.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the local IRB of the CHRU of Lille (CSTMT043). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study. The animal study was reviewed and approved by French national authorization number: 8708503 and French ethics committee registration number APAFIS#14581-2018041009469362 v3.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

COu and LR contributed equally to this work. COu and LR performed and analyzed experiments. AS helped to perform the

repertoire analysis. COB performed and analyzed ELISA. MD and NG performed the transcriptomic experiments. JF, SP, AS and LR performed the bioinformatics analyses. QL and CC performed flow cytometry analysis of bone marrow B-cell subsets. NF participated in the design of the project. KB and ME participated in the development of this study. CV-F created the mouse model, contributed to the experiments and analyzed the results. JF and CV-F directed the study and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

The group of JF is supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée Ligue), the Comité Orientation Recherche Cancer (CORC), the France Lymphome Espoir association, the Nouvelle Aquitaine Region and the Haute-Vienne and Corrèze committees of the Ligue Nationale Contre le Cancer. CV-F was supported by the France Lymphome Espoir association of patients. SP is supported by the Septentrion committee of Ligue contre le Cancer. ME is supported by an ANR @RAction grant (ANR-14-ACHN-0008), an ANR JCJC

## REFERENCES

- Preud'homme JL, Seligmann M. Immunoglobulins on the Surface of Lymphoid Cells in Waldenström's Macroglobulinemia. *J Clin Invest* (1972) 51(3):701–5. doi: 10.1172/JCI106858
- Ghobrial IM. Are You Sure This is Waldenstrom Macroglobulinemia? *Hematol Am Soc Hematol Educ Prog* (2012) 2012:586–94. doi: 10.1182/asheducation.V2012.1.586.3798562
- Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. Myd88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med* (2012) 367(9):826–33. doi: 10.1056/NEJMoa1200710
- Gachard N, Parrens M, Soubeyran I, Petit B, Marfak A, Rizzo D, et al.IGHV Gene Features and MYD88 L265P Mutation Separate the Three Marginal Zone Lymphoma Entities and Waldenström Macroglobulinemia/Lymphoplasmacytic Lymphomas. *Leukemia* (2013) 27(1):183–9. doi: 10.1038/leu.2012.257
- Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC, Giraldo P, Mariano Hernández J, Escalante F, et al. Myd88 L265P is a Marker Highly Characteristic of, But Not Restricted to, Waldenström's Macroglobulinemia. *Leukemia* (2013) 27(8):1722–8. doi: 10.1038/leu.2013.62
- Poulain S, Roumier C, Venet-Caillault A, Figeac M, Herbaux C, Marot G, et al. Genomic Landscape of CXCR4 Mutations in Waldenström Macroglobulinemia. *Clin Cancer Res* (2016) 22(6):1480–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0646
- Baron M, Simon L, Poulain S, Leblond V. How Recent Advances in Biology of Waldenström's Macroglobulinemia may Affect Therapy Strategy. *Curr Oncol Rep* (2019) 21(3):27. doi: 10.1007/s11912-019-0768-4
- Leblond V, Kastiris E, Advani R, Ansell SM, Buske C, Castillo JJ, et al. Treatment Recommendations From the Eighth International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Blood* (2016) 128(10):1321–8. doi: 10.1182/blood-2016-04-711234
- Onaindia A, Medeiros LJ, Patel KP. Clinical Utility of Recently Identified Diagnostic, Prognostic, and Predictive Molecular Biomarkers in Mature B-cell Neoplasms. *Mod Pathol* (2017) 30(10):1338–66. doi: 10.1038/modpathol.2017.58
- Ruminy P, Etancelin P, Couronné L, Parmentier F, Rainville V, Mareschal S, et al. The Isotype of the BCR as a Surrogate for the GCB and ABC Molecular Subtypes in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Leukemia* (2011) 25(4):681–8. doi: 10.1038/leu.2010.302

grant (ANR-19-CE15-0019-01), an IDEX Université de Paris grant, a Fondation Arthritis grant and a Fondation ARC grant (PJA20181208173). KB is supported by an ANR PRC grant (ANR-17-CE14-0019), an INCa grant (PRT-K 2017) and the Association Saint Louis pour la Recherche sur les Leucémies.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the animal, histology and cytometry facilities of the BISCEM US 42 INSERM/UMS 2015 CNRS technological platform of the University of Limoges as well as the immunology laboratory of the Limoges University Hospital Center for their technical assistance. We thank Dr Jeanne Cook Moreau (UMR CNRS 7276/INSERM 1276) for careful English editing.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.641692/full#supplementary-material>

- Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, et al. Oncogenically Active MYD88 Mutations in Human Lymphoma. *Nature* (2011) 470(7332):115–9. doi: 10.1038/nature09671
- de Groen RAL, Schrader AMR, Kersten MJ, Pals ST, Vermaat JSP. MYD88 in the Driver's Seat of B-cell Lymphomagenesis: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Haematologica* (2019) 104(12):2337–48. doi: 10.3324/haematol.2019.227272
- Jo T, Nishikori M, Kogure Y, Arima H, Sasaki K, Sasaki Y, et al. LUBAC Accelerates B-cell Lymphomagenesis by Conferring Resistance to Genotoxic Stress on B Cells. *Blood* (2020) 136(6):684–97. doi: 10.1182/blood.2019002654
- Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, Seeger JM, Al-Baldawi Y, Al-Maarri M, et al. B-Cell-Specific Conditional Expression of Myd88p.L252P Leads to the Development of Diffuse Large B-cell Lymphoma in Mice. *Blood* (2016) 127(22):2732–41. doi: 10.1182/blood-2015-11-684183
- Sewastianik T, Guerrero ML, Adler K, Dennis PS, Wright K, Shanmugam V, et al. Human MYD88L265P is Insufficient by Itself to Drive Neoplastic Transformation in Mature Mouse B Cells. *Blood Adv* (2019) 3(21):3360–74. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000588
- Schmidt K, Sack U, Graf R, Winkler W, Popp O, Mertins P, et al. B-Cell-Specific Myd88 L252p Expression Causes a Premalignant Gammopathy Resembling Igm MGUS. *Front Immunol* (2020) 11:602868. doi: 10.3389/fimmu.2020.602868
- Soriano P. Generalized LacZ Expression With the ROSA26 Cre Reporter Strain. *Nat Genet* (1999) 21(1):70–1. doi: 10.1038/5007
- Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, et al. Targeted Oncogene Activation by Site-Specific Recombination in Transgenic Mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89(14):6232–6. doi: 10.1073/pnas.89.14.6232
- Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, et al. Genomic Deletion of the Whole IgH 3' Regulatory Region (hs3a, hsl2, hs3b, and hs4) Dramatically Affects Class Switch Recombination and Ig Secretion to All Isotypes. *Blood* (2010) 116(11):1895–8. doi: 10.1182/blood-2010-01-264689
- Rickert RC, Roes J, Rajewsky K. B Lymphocyte-Specific, Cre-mediated Mutagenesis in Mice. *Nucleic Acids Res* (1997) 25(6):1317–8. doi: 10.1093/nar/25.6.1317
- Faumont N, Chanut A, Benard A, Cogne N, Delsol G, Feuillard J, et al. Comparative Analysis of Oncogenic Properties and Nuclear Factor-KappaB Activity of Latent Membrane Protein 1 Natural Variants From Hodgkin's Lymphoma's Reed-Sternberg Cells and Normal B-Lymphocytes. *Haematologica* (2009) 94(3):355–63. doi: 10.3324/haematol.13269

22. Chauzeix J, Laforêt M-P, Deveza M, Crowther L, Marcellaud E, Derouault P, et al. Normal Serum Protein Electrophoresis and Mutated IGHV Genes Detect Very Slowly Evolving Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *Cancer Med* (2018) 7(6):2621–8. doi: 10.1002/cam4.1510
23. Almeida JS, Iriabho EE, Gorrepati VL, Wilkinson SR, Grüneberg A, Robbins DE, et al. Imagejs: Personalized, Participated, Pervasive, and Reproducible Image Bioinformatics in the Web Browser. *J Pathol Inform* (2012) 3:25. doi: 10.4103/2153-3539.98813
24. David A, Arnaud N, Fradet M, Lascaux H, Ouk-Martin C, Gachard N, et al. c-Myc Dysregulation is a Co-Transforming Event for Nuclear Factor- $\kappa$ B Activated B Cells. *Haematologica* (2017) 102(5):883–94. doi: 10.3324/haematol.2016.156281
25. Chanut A, Duguet F, Marfak A, David A, Petit B, Parrens M, et al. RelA and RelB Cross-Talk and Function in Epstein-Barr Virus Transformed B Cells. *Leukemia* (2014) 28(4):871–9. doi: 10.1038/leu.2013.274
26. Magoč T, Salzberg SL. FLASH: Fast Length Adjustment of Short Reads to Improve Genome Assemblies. *Bioinformatics* (2011) 27(21):2957–63. doi: 10.1093/bioinformatics/btr507
27. Chevrièr S, Genton C, Kallies A, Karnowski A, Otten LA, Malissen B, et al. CD93 is Required for Maintenance of Antibody Secretion and Persistence of Plasma Cells in the Bone Marrow Niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106(10):3895–900. doi: 10.1073/pnas.0809736106
28. Hömig-Hölzel C, Hojer C, Rastelli J, Casola S, Strobl LJ, Müller W, et al. Constitutive CD40 Signaling in B Cells Selectively Activates the Noncanonical NF- $\kappa$ B Pathway and Promotes Lymphomagenesis. *J Exp Med* (2008) 205(6):1317–29. doi: 10.1084/jem.20080238
29. Faumont N, Durand-Panteix S, Schlee M, Grömminger S, Schuhmacher M, Hölzel M, et al. c-Myc and Rel/NF- $\kappa$ B are the Two Master Transcriptional Systems Activated in the Latency III Program of Epstein-Barr Virus-Immortalized B Cells. *J Virol* (2009) 83(10):5014–27. doi: 10.1128/JVI.02264-08
30. Hunter ZR, Xu L, Yang G, Tsakmaklis N, Vos JM, Liu X, et al. Transcriptome Sequencing Reveals a Profile That Corresponds to Genomic Variants in Waldenström Macroglobulinemia. *Blood* (2016) 128(6):827–38. doi: 10.1182/blood-2016-03-708263
31. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A Gene Expression-Based Method to Diagnose Clinically Distinct Subgroups of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100(17):9991–6. doi: 10.1073/pnas.1732008100
32. Durham BH, Getta B, Dietrich S, Taylor J, Won H, Bogenberger JM, et al. Genomic Analysis of Hairy Cell Leukemia Identifies Novel Recurrent Genetic Alterations. *Blood* (2017) 130(14):1644–8. doi: 10.1182/blood-2017-01-765107
33. Harroch S, Gothelf Y, Revel M, Chebath J. 5' Upstream Sequences of MyD88, an IL-6 Primary Response Gene in M1 Cells: Detection of Functional IRF-1 and Stat Factors Binding Sites. *Nucleic Acids Res* (1995) 23(17):3539–46. doi: 10.1093/nar/23.17.3539
34. Janssens S, Burns K, Tschopp J, Beyaert R. Regulation of interleukin-1- and Lipopolysaccharide-Induced NF- $\kappa$ B Activation by Alternative Splicing of Myd88. *Curr Biol* (2002) 12(6):467–71. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00712-1
35. Adib-Conquy M, Adrie C, Fitting C, Gattolliat O, Beyaert R, Cavaillon J-M. Up-Regulation of MyD88s and SIGIRR, Molecules Inhibiting Toll-like Receptor Signaling, in Monocytes From Septic Patients. *Crit Care Med* (2006) 34(9):2377–85. doi: 10.1097/01.CCM.0000233875.93866.88
36. Lee FF-Y, Davidson K, Harris C, McClendon J, Janssen WJ, Alper S. NF- $\kappa$ B mediates lipopolysaccharide-induced alternative pre-mRNA splicing of MyD88 in mouse macrophages. *J Biol Chem* (2020) 295(18):6236–48. doi: 10.1074/jbc.RA119.011495
37. Meng R, Li D, Feng Z, Xu Q. MyD88 Hypermethylation Mediated by DNMT1 is Associated With LTA-induced Inflammatory Response in Human Odontoblast-Like Cells. *Cell Tissue Res* (2019) 376(3):413–23. doi: 10.1007/s00441-019-02993-0
38. Šutić M, Motzek A, Bubanović G, Linke M, Sabol I, Vugrek O, et al. Promoter Methylation Status of ASC/TMS1/PYCARD is Associated With Decreased Overall Survival and TNM Status in Patients With Early Stage non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Transl Lung Cancer Res* (2019) 8(6):1000–15. doi: 10.21037/tlcr.2019.12.08
39. Wang W, Zhao Z, Wu F, Wang H, Wang J, Lan Q, et al. Bioinformatic Analysis of Gene Expression and Methylation Regulation in Glioblastoma. *J Neurooncol* (2018) 136(3):495–503. doi: 10.1007/s11060-017-2688-1
40. Wang JQ, Jeelall YS, Beutler B, Horikawa K, Goodnow CC. Consequences of the Recurrent MYD88(L265P) Somatic Mutation for B Cell Tolerance. *J Exp Med* (2014) 211(3):413–26. doi: 10.1084/jem.20131424
41. Komori T. Mouse Models for the Evaluation of Osteocyte Functions. *J Bone Metab* (2014) 21(1):55–60. doi: 10.11005/jbm.2014.21.1.55
42. Schmidt-Suppran M, Rajewsky K. Vagaries of Conditional Gene Targeting. *Nat Immunol* (2007) 8(7):665–8. doi: 10.1038/nri0707-665
43. Pillai S, Cariappa A. The Follicular Versus Marginal Zone B Lymphocyte Cell Fate Decision. *Nat Rev Immunol* (2009) 9(11):767–77. doi: 10.1038/nri2656
44. Heise N, De Silva NS, Silva K, Carette A, Simonetti G, Pasparakis M, et al. Germinal Center B Cell Maintenance and Differentiation are Controlled by Distinct NF- $\kappa$ B Transcription Factor Subunits. *J Exp Med* (2014) 211(10):2103–18. doi: 10.1084/jem.20132613
45. Merzianu M, Jiang L, Lin P, Wang X, Weber DM, Vadhan-Raj S, et al. Nuclear BCL-10 Expression is Common in Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldenström Macroglobulinemia and Does Not Correlate With P65 NF- $\kappa$ B Activation. *Mod Pathol* (2006) 19(7):891–8. doi: 10.1038/modpathol.3800609
46. Okabe S, Fukuda S, Kim Y-J, Niki M, Pelus LM, Ohyashiki K, et al. Stromal Cell-Derived factor-1 $\alpha$ /CXCL12-induced Chemotaxis of T Cells Involves Activation of the RasGAP-associated Docking Protein p62Dok-1. *Blood* (2005) 105(2):474–80. doi: 10.1182/blood-2004-03-0843
47. Perrot A, Corre J, Avet-Loiseau H. Risk Stratification and Targets in Multiple Myeloma: From Genomics to the Bedside. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* (2018) 38:675–80. doi: 10.1200/EDBK\_200879
48. Bohannon C, Powers R, Satyabhama L, Cui A, Tipton C, Michaeli M, et al. Corrigendum: Long-lived Antigen-Induced IgM Plasma Cells Demonstrate Somatic Mutations and Contribute to Long-Term Protection. *Nat Commun* (2016) 7:12687. doi: 10.1038/ncomms12687
49. Li Z, Wang H, Xue L, Shin D-M, Roopenian D, Xu W, et al. Emu-BCL10 Mice Exhibit Constitutive Activation of Both Canonical and Noncanonical NF- $\kappa$ B Pathways Generating Marginal Zone (MZ) B-cell Expansion as a Precursor to Splenic MZ Lymphoma. *Blood* (2009) 114(19):4158–68. doi: 10.1182/blood-2008-12-192583
50. Moore CR, Liu Y, Shao C, Covey LR, Morse HC, Xie P. Specific Deletion of TRAF3 in B Lymphocytes Leads to B-lymphoma Development in Mice. *Leukemia* (2012) 26(5):1122–7. doi: 10.1038/leu.2011.309
51. Vincent-Fabert C, Saintamand A, David A, Alizadeh M, Boyer F, Arnaud N, et al. Reproducing Indolent B-cell Lymphoma Transformation With T-cell Immunosuppression in LMP1/CD40-expressing Mice. *Cell Mol Immunol* (2019) 16(4):412–4. doi: 10.1038/s41423-018-0197-6
52. Vincent-Fabert C, Roland L, Zimber-Strobl U, Feuillard J, Faumont N. Pre-Clinical Blocking of PD-L1 Molecule, Which Expression is Down Regulated by NF- $\kappa$ B, JAK1/JAK2 and BTK Inhibitors, Induces Regression of Activated B-cell Lymphoma. *Cell Commun Signal* (2019) 17(1):89. doi: 10.1186/s12964-019-0391-x
53. Vincent-Fabert C, Soubeyran I, Velasco V, Parrens M, Jeannot R, Lereclus E, et al. Inflamed Phenotype of Splenic Marginal Zone B-cell Lymphomas With Expression of PD-L1 by Intratumoral Monocytes/Macrophages and Dendritic Cells. *Cell Mol Immunol* (2019) 16(6):621–4. doi: 10.1038/s41423-019-0228-y
54. Reimann M, Schrezenmeier JF, Richter-Pechanska P, Dolnik A, Hick TP, Schleich K, et al. Adaptive T-cell Immunity Controls Senescence-Prone MyD88- or CARD11-mutant B-Cell Lymphomas. *Blood* (2020). doi: 10.1182/blood.2020005244
55. Jalali S, Price-Troska T, Paludo J, Villasboas J, Kim H-J, Yang Z-Z, et al. Soluble PD-1 Ligands Regulate T-cell Function in Waldenström Macroglobulinemia. *Blood Adv* (2018) 2(15):1985–97. doi: 10.1182/bloodadvances.2018021113

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

Copyright © 2021 Ouk, Roland, Gachard, Poulain, Oblet, Rizzo, Saintamand, Lemasson, Carrion, Thomas, Balabanian, Espéli, Parrens, Soubeyran, Boulin, Faumont, Feuillard and Vincent-Fabert. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Annexe 2. Article préliminaire publié dans BioRxiv (B-cell specific expression of the murine *Myd88L252P* mutation correlates with the establishment of an immunosuppressive microenvironment in Waldenström macroglobulinemia lymphoplasmacytic lymphoma).**

1 **B-cell specific expression of the murine *Myd88*<sup>L252P</sup> mutation correlates with the establishment of an**  
2 **immunosuppressive microenvironnement in Waldenström macroglobulinemia lymphoplasmacytic**  
3 **lymphoma**

4

5 Quentin Lemasson<sup>1</sup>, Ophélie Tétéau<sup>1</sup>, Mina Chabaud<sup>1</sup>, Laurie Jeanson<sup>1</sup>, Jean Feuillard<sup>1</sup>, Christelle  
6 Vincent-Fabert<sup>1,\*</sup>

7 <sup>1</sup> UMR CNRS 7276/INSERM U1262 CRIBL, University of Limoges, and Hematology Laboratory of  
8 Dupuytren Hospital University Center (CHU) of Limoges, Limoges, France.

9 \* Corresponding author [christelle.vincent-fabert@unilim.fr](mailto:christelle.vincent-fabert@unilim.fr)



10 **Abstract**

11 Waldenström macroglobulinemia is a rare and indolent lymphoproliferative disorder genetically  
12 characterized by the presence of the L265P mutation in the *MYD88* gene in nearly each case. Despite  
13 its slow progression, Waldenström macroglobulinemia remain incurable due to the lack of specific  
14 treatments. The importance of the tumour microenvironment was well documented since the last  
15 decade especially concerning the study of solid tumours, but the failures of the immune  
16 microenvironment are also experiencing growing interest for B cell lymphomas. In this study, we  
17 investigated the implication of some dysregulations of the immune microenvironment in Waldenström  
18 macroglobulinemia through our *Myd88<sup>L252P</sup>* mutated transgenic model, which may explain its  
19 progression. In essence, we highlighted the existence of multiple immune escape mechanisms that  
20 lead to T-cell exhaustion and participate to Waldenström disease progression. This work in animals  
21 opens up new prospects for the development of new therapeutic combinations in WM targeting  
22 reactivation of the immune system.

## 23 Introduction

24 Waldenström's disease (WM), described by Jan G. Waldenström in 1944, is an incurable, indolent  
25 lymphoplasmacytic lymphoma (LPL) of the elderly that accounts for less than 5% of B-cell lymphomas.  
26 This slowly evolving lymphoma is characterized by expansion of a lymphoplasmacytic clone of  
27 medullary localization with secretion of a monoclonal immunoglobulin type M (IgM). Being specific of  
28 WM, clonal cells exhibit a continuous differentiation between the small mature lymphocyte and the  
29 mature plasma cell (PC). We recently demonstrated that this unique characteristic may be used as a  
30 biological marker for WM diagnosis by evidencing the B-cell clonality in both lymphocytes and plasma  
31 cell by flow cytometry [1]. Similar to other lymphomas, cytogenetic and molecular abnormalities have  
32 been identified and can be used as prognostic factors. Indeed, the main chromosomal aberrations are  
33 6q deletions (in 20-40% of patients), 13q deletions (10-15%), trisomy 18 (10%), trisomy 4 and 17p  
34 deletions (8%) [2]. Using Next-Generation Sequencing (NGS), the discovery of the L265P mutation in  
35 *MYD88* (an adaptor protein involved in Toll Like Receptor signalling and activating the NF-kappa B (NF-  
36 κB) pathway) has demonstrated that WM is a true entity genetically distinct from other indolent  
37 lymphomas with IgM secretion [3]–[5]. Indeed, WM is associated with an activating mutation of  
38 *MYD88* in more than 90% of cases (*MYD88 L265P*, the most frequent). Another frequent mutation  
39 (30% of WM patients), almost specific of WM, is the WHIM-like mutation of *CXCR4*, which results in a  
40 lack of desensitisation of this receptor, which would explain why WM B cells reside in the bone marrow  
41 [6].

42

43 Despite current progress and the development of new therapies, WM remains still incurable [7]. It is  
44 therefore important to develop new approaches in this field. Until recently, adequate preclinical  
45 models, which is an important step to develop these new approaches were lacking. With few other  
46 groups, we have created an animal model which intends to mimic WM [8]–[11]. Our strategy consisted  
47 in inserting the *Myd88*<sup>L252P</sup> mutation (mouse orthologue of the human mutation) in the *Rosa26* locus.

48 These mice were then crossed with *Cd19<sup>Cre</sup>* mice to induce expression of the mutation only in B cells  
49 using the Cre/LoxP system (*Myd88<sup>L252P</sup>* model, respecting the endogenous mouse MYD88 signalling and  
50 forcing expression of the mutant in B cells in a pseudo-heterozygote manner) [11]. Our *Myd88<sup>L252P</sup>*  
51 mice developed at 9-13 months of age (i) an indolent, (ii) lymphoplasmacytic B-cell lymphoma in the  
52 spleen (iii) with, in the blood, secretion of a monoclonal IgM and (iv) a lymphoplasmocytic B-cell  
53 expansion in the bone marrow. For the first time, we have created a mouse model that recapitulates  
54 the main features of WM [11]. This is a unique opportunity to both understand how MYD88 induces  
55 WM and to identify new therapeutic perspectives.

56

57 Escape from the immune response is a crucial step in the emergence of lymphomas, especially for  
58 those with NF- $\kappa$ B activation [12]–[15]. For this reason, tumour escape has been a popular area of study  
59 over the past decade, enabling the emergence of innovative therapies whose aim is no longer to target  
60 the tumour directly, but to reactivate the immune system. Indeed, in order to survive and proliferate,  
61 cancer cells often reprogram the tumour microenvironment (TME) to protect themselves from the  
62 defense mechanisms of the host immune system. Alterations in direct cell-cell interactions or cytokine  
63 production have been reported in many cancers, including lymphomas [16]. Among the mechanisms  
64 of escape from the immune response, LT exhaustion through overexpression of immune checkpoints  
65 and/or secretion of immunosuppressive cytokines have been reported in some indolent lymphomas  
66 [17]–[21]. However, when it comes to WM, the role of the immune microenvironment in its  
67 development remains poorly understood. Knowing the pathways deregulated in WM cases (TLR/NF-  
68  $\kappa$ B, JAK/STAT, BCR and PI3K/AKT signalling) and their consequences in terms of cytokines secretion,  
69 the tumour microenvironment should be disturbed. Moreover, the indolent form of this disorder  
70 suggests that WM cells should develop many mechanisms for shutting down the immune system. In  
71 2013, Grote D. et al. showed for the first time that PD-L1 and PD-L2 were overexpressed not only on  
72 the surface of WM tumour cells, but also on the surface of cells in the tumour microenvironment  
73 (dendritic cells, monocytes and macrophages), promoting their proliferation [22]. In 2018, Jalali S. et

74 al. showed in patients that CD19<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> WM cells overexpressed PD-1 ligands (PD-L1 and PD-L2) and,  
75 in addition, secreted large quantities of them, which were found in blood and bone marrow. Moreover,  
76 this work showed that lymphocytes cultured in the presence of serum from WM patients had their  
77 proliferation severely compromised [23]. Finally, in 2021 and 2022, two works presented results  
78 concerning the immune microenvironment in WM. In the first, Kaushal A. et al. combined mass  
79 cytometry with the CITE-seq technique to demonstrate that a tumour clone-specific T immune  
80 response was established very early in the MGUS phase, and that throughout disease development T  
81 lymphocytes will progressively acquire an exhausted phenotype with loss of the naive T compartment  
82 and desensitization to IFN $\gamma$  [24]. A little later, Sun H. et al. performed a high-throughput study of the  
83 WM microenvironment by analysing bone marrow samples in single cell RNAseq, and demonstrated a  
84 loss of NK cell cytotoxic activity [25]. In addition, he observed the presence of depleted CD4 and CD8  
85 expressing T cells with loss of the naive compartment and increase in Regulatory T cells (Tregs) [25].  
86 These recent studies demonstrate that immune escape seems to take place during the development  
87 of WM, leading to T-cell exhaustion and inactivity. While these studies are promising in terms of their  
88 therapeutic potential, they remain to be confirmed, and they raise the question of the exact  
89 mechanisms involved. In that view and based on our results on the mouse model *Myd88*<sup>L252P</sup> which  
90 developed WM-like tumours, we have started to study the immune microenvironment in tumour  
91 spleen. Our results showed the presence of several immune escape mechanisms in our mouse model  
92 of *Myd88* mutated lymphoplasmacytic lymphoma. These new data strongly suggest that the immune  
93 microenvironment plays an important role in the development of the disease but that it could also be  
94 one of the actors of their transformation, opening up perspectives for therapeutics trials targeting a  
95 reactivation of the immune system.

96 **Material and methods**

97 **Mouse model**

98 The mouse model used in this work is the *Myd88<sup>L252P</sup>-Cd19<sup>Cre</sup>* model developed by the  
99 laboratory and previously described (Ouk et al., 2021). For B-cell expression of the transgene,  
100 *Myd88<sup>L252P</sup> tg/tg* animals (C57Bl6/J genetic background) were crossed with *Cd19<sup>Cre</sup> tg/tg* mice  
101 (Balb/c background). The animals used in this study are *Myd88<sup>L252P</sup> tg/+ - Cd19<sup>Cre</sup> tg/+*. These mice  
102 will hereafter be referred to as *Myd88<sup>L252P</sup>* mice. Animals were housed at 21–23°C with a 12-  
103 hour light/dark cycle. All procedures were conducted under an approved protocol according  
104 to European guidelines for animal experimentation (French national authorization number:  
105 8708503 and French ethics committee registration number APAFIS#14581-  
106 2018041009469362 v3).

107

108 **Flow cytometry**

109 Spleen cells from *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L252P</sup>* were filtered through a sterile nylon membrane. Cell  
110 suspensions were resuspended at 4°C in a labelling buffer (PBS, 1% BSA, 2mM EDTA) and labelled with  
111 fluorescent conjugated monoclonal antibodies listed in Supplementary Materials and Methods. The  
112 "Mouse Tregs detection kit" (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Germany) was used for  
113 regulatory T-cell staining. Membrane labeling (CD4 2μL + CD25 2μL, 20 min at 4°C) was  
114 performed on 1 million cells. Cells were then fixed-permeabilized (30 min at 4°C) before  
115 intracellular FoxP3 labeling (30 min at 4°C).

116 Labelled cells were analysed using a Cytoflex LX (Beckman Coulter®, Brea, CA). Results were  
117 analysed using Kaluza Flow Cytometry software 2.1 (Beckman Coulter®, Brea, CA).

118

119 **Immunochemistry**

120 Paraffin embedded tissue sections (5µm) were carried out on the histology platform of the Biscem  
121 collaborative services unit at the University of Limoges (Inserm 042, CNRS 2015, Hospital University  
122 Center of Limoges) and were deparaffinized as follows: slides were immersed successively in xylene  
123 twice for 3 min, 3 times for 3 min in 100% ethanol, once for 3 min in 95% ethanol and 3 times in PBS  
124 for 5 min. Then, slides were immersed in citrate buffer pH7 and heated 4 times for 5 min 40 sec in a  
125 microwave at 800W. For T-cell staining a primary antibody against CD3 (SP7, Abcam®, Cambridge, UK)  
126 was used. Primary antibody revelation was performed with Zytochem Plus (HRP) Anti-Rabbit (DAB) kit  
127 (Zytomed systems®, Berlin, Germany) following supplier instructions. Image acquisition was performed  
128 with the Nanozoomer 2.0RS Hamamatsu Photonics and NDP.scan software (Hamamatsu City, Japan).

129

### 130 **Immunofluorescence**

131 Immunofluorescent staining was performed on 8 µm tissue sections cryostained from OCT-  
132 frozen blocks. The slides were fixed in cold acetone (-20°C) for 20 minutes before a saturation  
133 step in PBS 3% BSA for 45 minutes. The labeling mix contained B220-FITC (REA755, Miltenyi  
134 Biotec®, Bergisch Gladbach, Germany) and CD3-PE (REA641, Miltenyi Biotec®, Bergisch  
135 Gladbach, Germany) antibodies diluted 1:100 and 1:167 respectively, and was incubated  
136 overnight at 4°C in the dark. The following day, DAPI staining was performed BD Biosciences®,  
137 Franklin Lakes, NJ). Slides were mounted and scanned using an epifluorescence microscope Nikon  
138 NiE (Nikon®, Tokyo, Japan). Labels were analyzed and quantified using QPath software.

139

### 140 **Cytokines production**

141 Cytokine secretion levels were analyzed by flow cytometry. 2 million cells were cultured in complete  
142 RPMI medium (Eurobio Scientific, Essonnes, France) supplemented with 10% of FBS, 2 mM of L-  
143 Glutamine, 1% of Na pyruvate, 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin (ThermoFisher  
144 Scientific Waltham, MA) in 24-well plates. In each well, 4 µL of cocktail containing PMA/ionomycin +  
145 Brefeldin A (Biolegend, San Diego, CA) was added, as well as 2 µL of Monensin (Biolegend, San Diego,

146 CA). Cells were cultured for 6 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Cells were then harvested and stained with  
147 surface CD19, CD3, CD4, CD8, and CD25 antibodies, followed by fixation and permeabilization using a  
148 commercial cytofix/cytoperm kit (BD Biosciences, USA) at 4°C for 30 min. Subsequently, intracellular  
149 FoxP3, IL-2, IFN $\gamma$ , Granzyme B, IL-10, IL-6 and TNF $\alpha$  were stained at 4°C for another 30 min before  
150 proceeding to flow cytometry. Cells with no stimulation were set as negative controls (Supplementary  
151 Materials and Methods).

152

153 **Statistical analysis.**

154 Mann Whitney two-tailed tests were used for statistical analysis using GraphPad Prism software  
155 (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

156

157

158 **Results**

159 **The global proportion of immune B and T compartments was disturbed in *Myd88*<sup>L252P</sup> mice.**

160 From 6 months of age, blood samples were taken, every month, from the animals to monitor  
161 the presence of an Ig peak in the serum using serum protein electrophoresis. When animals  
162 show a monoclonal Ig peak in serum (10-12 months of age), they were euthanized for analysis.  
163 To study the tumour immune microenvironment and particularly the T-cell compartment, we  
164 first performed immunohistochemistry (IHC) staining with a CD3 antibody. In comparison with  
165 normal spleen from *Cd19*<sup>Cre</sup> control mice, we observed a reduction of CD3<sup>+</sup> cells in *Myd88*<sup>L252P</sup>  
166 mice (Figure 1A). By using flow cytometry, we then evaluated the proportions of lymphoid  
167 cells in the spleens of *Cd19*<sup>Cre</sup> control and *Myd88*<sup>L252P</sup> mice. We confirmed an increase in the  
168 percentage of CD19<sup>+</sup> B cells in tumours, representing 90% of spleen lymphocytes versus 60%  
169 under normal conditions. This was associated with a high decrease in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells  
170 (Figure 1B). These first results show that the B specific expression of *Myd88* mutation  
171 disturbed the immune compartment in spleen.

172

173 **Tumour B cells displayed the hallmarks of an immunomodulatory phenotype**

174 Analysis of *Myd88*<sup>L252P</sup> tumour B cells showed abnormal activity characterised by the  
175 overexpression of the activation markers CD80 and CD86 (Figure 2A-B). In addition, we  
176 analysed by flow cytometry the expression of two molecules strongly involved in the control  
177 of the anti-tumour immune response: the well-known immune checkpoint PD-L1; and the  
178 MHC class II complex, which enables antigen presentation to T cells. We then observed that  
179 tumour B cells overexpressed PD-L1, with 40% of them expressing it on average, compared  
180 with 10% for normal B cells (Figure 2C). In addition, B cells expressing the *Myd88*<sup>L252P</sup> mutation



181 partially lost MHC class II expression (Figure 2D). Finally, we also characterized the cytokine  
182 secretion of these cells by flow cytometry. Interestingly, we found increased secretion of  
183 immunosuppressive cytokines like IL-10, IL-6 and TNF $\alpha$ , clearly demonstrating that splenic B  
184 cells of *Myd88*<sup>L252P</sup> mice exhibited an immunosuppressive phenotype (Figure 2E-H).

185

#### 186 **An anti-tumour immune response was induced with signs of T cell activation**

187 The immunosuppressive phenotype of tumour B cells should disrupt the anti-tumour immune  
188 response by affecting their recognition by T cells. Therefore, we continued the immune  
189 microenvironment study by looking at the localization of lymphoid compartments in the  
190 spleen comparing tumours from *Myd88*<sup>L252P</sup> mice with normal spleens. In contrast to our  
191 previous IHC analysis, immunofluorescence staining allowed us to distinguish these two  
192 populations using B220 and CD3 surface markers in the same spleen section. We then  
193 observed, in *Cd19*<sup>Cre</sup> control mice, a very close but distinct spatial distribution of B and T cells  
194 (Figure 3A-D). Indeed, B cells were organized in follicles, with T cells on the outside (Figure 3B-  
195 C). However, in tumour spleens of *Myd88*<sup>L252P</sup> mice, localization of B and T cells was  
196 disorganized with a mix of these two populations, suggesting migration of T cells towards the  
197 tumour area (Figure 3E-H). The presence of both CD4 and CD8-expressing T cells suggests that  
198 immune phenotype of cancer is an inflamed phenotype characterized by a pre-existing anti-  
199 tumour response that has been arrested by immunosuppressive processes.

200 Given the close proximity between T cells and tumour B cells, CD4 and CD8 populations were  
201 further characterized by flow cytometry. Double CD44-CD62L staining performed on CD4 and  
202 CD8 T cells distinguished three subpopulations: naive T cells (CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>), memory T cells  
203 (CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>) and effector T cells (CD62L<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup>). In *Myd88*<sup>L252P</sup> mice, both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>

204 populations showed a decrease in naive and memory compartments, with a high increase in  
205 effectors (Figure 4A-B). This increase was associated with activation of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>  
206 populations, revealed by increased expression of CD134 and CD137 markers (Figure 4C). We  
207 then investigated the activity of T cells at the functional level. *Ex vivo* experiments for the  
208 measurement of cytokine production were performed on splenocytes from *Cd19<sup>Cre</sup>* and  
209 *Myd88<sup>L252P</sup>* mice. We first focused our analysis on cytokines known responsible for the T-cell  
210 activation. Regarding the CD4-expressing T cells, no difference was observed in IL-2 secretion  
211 between *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L252P</sup>* mice (Figure 5A). However, we detected an increase in IFN $\gamma$   
212 secretion in *Myd88<sup>L252P</sup>* mice (Figure 5B). CD8-expressing T cells, on the other hand, expressed  
213 significant amounts of both IL-2 and IFN $\gamma$  (Figure 5C-D). We also found a higher secretion of  
214 granzyme B-type cytotoxic molecule (Figure 5E). In conclusion, these results show that tumour  
215 infiltrated T cells were mainly activated effector T cells with some features of Th1 polarization  
216 (high secretion of IL-2 and INF- $\gamma$ ), which confirm an engagement in an anti-tumour immune  
217 response with secretion of activating and cytotoxic cytokines.

218

#### 219 **Tumour-infiltrated T cells were exhausted in *Myd88<sup>L252P</sup>* mice**

220 The immunomodulatory phenotype of B cells and the involvement of T cells in an anti-tumour immune  
221 response suggested that the tumour must have developed mechanisms to limit T cell activity. To  
222 identify them, we better characterized T cells by studying surface expression of the four main  
223 checkpoints molecules that reflected T-cell exhaustion: Programmed cell Death-1 (PD-1), Cytotoxic T-  
224 Lymphocyte-Associated protein-4 (CTLA-4), T-cell Immunoglobulin and Mucin containing protein-3  
225 (TIM-3) and Lymphocyte-Activation Gene-3 (LAG-3). Since B cells strongly expressed the PDL-1  
226 molecule, we first investigated PD1 expression on CD4 and CD8-expressing T cells. We found a clear  
227 overexpression of PD-1 on the surface of both T-cell populations, with around 90% of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T

228 cells expressing it in *Myd88*<sup>L252P</sup> mice, compared with 15% and 5%, respectively for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>  
229 cells, in *Cd19*<sup>Cre</sup> control mice (Figure 6A). We completed this analysis by exploring other known  
230 markers of exhaustion. CTLA-4 expression was more heterogeneous, but overexpression can be found  
231 on both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells (Figure 6B). Finally, TIM-3 and LAG-3 were expressed in far greater  
232 numbers by CD4 and CD8-expressing T cells in spleen of *Myd88*<sup>L252P</sup> mice than in *Cd19*<sup>Cre</sup> healthy  
233 tissue, where they are almost non-existent (Figure 6C-D). Moreover, analysis of cytokine secretion  
234 revealed overexpression of TNF $\alpha$  and IL-10 by both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in *Myd88*<sup>L252P</sup> mice (Figure  
235 6E-F). These results demonstrate the presence of CD4 and CD8 T-cell exhaustion in our mouse model.  
236 This exhaustion impaired the anti-tumour immune response, and appeared to be partly caused by the  
237 tumour cells themselves, which displayed an immunosuppressive phenotype.

238

### 239 **Increase of regulatory T cell population in *Myd88*<sup>L252P</sup> mice**

240 Being known to be potent mediators of the inhibition of T-cell immune response, we finally  
241 focused on regulatory Tregs in our mouse model. Murine Tregs were defined by the  
242 simultaneous expression of CD4, CD25 and FoxP3 markers. Triple-positive cells were therefore  
243 analysed by flow cytometry. As a result, we found a significantly increased proportion of Tregs  
244 in *Myd88*<sup>L252P</sup> mice with 25% of Tregs among CD4<sup>+</sup> versus 10% in healthy spleens (Figure 7A).  
245 The primary role of Tregs is to inhibit the T-cell immune response, notably by secreting anti-  
246 inflammatory cytokines. Thus, while Tregs normally express IL-6 and IL-10, we demonstrated  
247 that in the *Myd88*<sup>L252P</sup> mice, Tregs overexpressed these two cytokines (Figure 7B-C). Finally, our  
248 results show that the percentage of Tregs expressing the TIM-3 marker was increased by a  
249 factor of 5 to 6 in tumours, compared with normal splenic tissue (Figure 7D). Moreover, TIM-  
250 3-positive Tregs secrete more IL-6 and IL-10 than TIM-3-negative Tregs (Figure 7E-F) revealing  
251 an increase immunomodulatory activity compared to TIM-3 negative Treg. In conclusion,

252 these data have highlight an additional mechanism of immune escape through the expansion  
253 of the Treg population expressing the TIM-3 molecule.

254

## 255 Discussion

256 The pressure of the immune surveillance is certainly one of the major driving forces in the emergence  
257 of B-cell lymphomas. Tumour cells are able to evade immune response by developing an  
258 immunosuppressive microenvironment through the dysregulation of immune checkpoint proteins  
259 expression, such proteins being essential in the negative control of activated immune cells. In our  
260 *Myd88*<sup>L252P</sup> mouse model that developed WM-like lymphoplasmacytic lymphoma, the TME study  
261 highlights the development of several immune escape mechanisms. First, tumour B cells displayed the  
262 hallmarks of immunosuppressive cells. As previously described, the B-cell expression of the *Myd88*<sup>L252P</sup>  
263 mutation led to the expansion of activated B cells which highly expressed the CD80 and CD86 markers;  
264 and this was associated with the overexpression of the PD-L1 molecule and the loss of MHC-II  
265 expression, sign of some loss of tumour-cell immunogenicity. We also confirm this immunosuppressive  
266 character by showing that tumour cells secreted large amounts of the immunosuppressive cytokines  
267 IL-10, IL-6 and TNF $\alpha$ . These results were consistent with the constitutive activation of several pathways  
268 such as NF- $\kappa$ B and JAK/STAT in our mouse model due to the expression of the *Myd88*<sup>L252P</sup> mutation.  
269 Moreover, these first results suggest that anti-tumour immune response should be disturbed and in  
270 particularly the T-cell functions. We actually detect some alterations in T-cell organisation and activity.  
271 First, we detected a migration of T cells close to the tumour B cells, suggesting the presence of a pre-  
272 existing anti-tumour immune response that was arrested, the exact definition of the immune-inflamed  
273 phenotype reviewed by Chen and Mellman [26]. In a second step, we characterized those T cells in  
274 details and we found that both CD4 and CD8 expressing T cells were mainly effector T cells with a loss  
275 in T-cell memory compartment. Moreover, those T cells showed all the signs of a Th1-type anti-tumour  
276 immune response with IL2, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  secretion. In parallel, we also demonstrated the existence  
277 of a T-cell exhaustion with an overexpression of the four main immune checkpoint molecules PD-1,  
278 CTLA-4, TIM-3 and LAG-3, associated with an increase in TNF $\alpha$  and d'IL-10 secretion. In our  
279 mouse model, we confirmed what was suspected in WM patients: the presence of the

280 constitutively active mutated MYD88 protein seems to induce the emergence of an  
281 immunosuppressive tumour phenotype responsible for T-cell exhaustion with age [25], [27].  
282 Furthermore, it would be particularly interesting to determine exactly which antigens are  
283 recognized by the exhausted T cells in our model, as this would perhaps enable us to draw up  
284 a list of antigens favouring T-cell exhaustion and tumour escape. Searching for these antigens  
285 in the patient would provide a predictive element for T-cell exhaustion, and they could also  
286 constitute new therapeutic targets, since it is conceivable that blocking these antigens would  
287 prolong the efficacy of the anti-tumour immune response.

288

289 Moreover, similar to the observations made in WM patients, we demonstrated in our mouse model  
290 an increase in the population of Tregs in splenic tumours [25]. Tregs are immunosuppressive cells, and  
291 deregulation of their functions is known to be involved in many cancers. We showed here that Tregs  
292 from MW-like tumours overexpressed the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-6. This is in  
293 agreement with a recent study showing, in another mouse model and in patient, the existence of a  
294 Treg-mediated immunosuppressive phenotype in WM [28]. We also discovered in our mouse model,  
295 in comparison to control mice, an expansion of TIM-3<sup>+</sup> Tregs cells which secreted higher amounts of  
296 immunosuppressive IL-6 and IL-10 cytokines than do TIM-3<sup>-</sup> Tregs. To note, TIM3 positive Tregs are  
297 shown to be associated with non-favourable prognostic in many cancers due to their huge secretion  
298 of IL-10 [29]. Targeting this population would then be a therapeutic prospect for WM. In this sense,  
299 Sacco et al. propose to target the CD40/CD40L axis after having identified its role in the WM cell-Tregs  
300 interaction [28].

301

302 All these results contribute to better understand tumour microenvironment in WM with the aim to  
303 identify novel mechanisms of B-cell immune escape, which may be the keystone of future therapies.

304 Targeting immune checkpoints and especially PD-L1 gave spectacular results in various solid cancers  
305 such as those of lung or colon [30]–[32]. Apart Hodgkin lymphomas, such therapies did not reach the  
306 hopes in B-cell lymphomas, especially for those with NF- $\kappa$ B activation. This lack of curative effect in  
307 these patients, despite PD-L1 expression by tumour cells in most cases, is to date poorly understood.  
308 In WM, such therapies could be of great help because of the *MYD88* mutation that constitutively  
309 activates NF- $\kappa$ B. However, failures in other B-cell cancers prevent any attempts of such new  
310 therapeutic proposal until immune surveillance escape will be deciphered and understood. Mouse  
311 models are thus useful for the preclinical study of these therapies, evidencing the interest of  
312 combinations that include treatments able to restore the anti-tumour immune response. Before trying  
313 such strategies in Humans, this is testable in genetically engineered mouse models. Our *Myd88*<sup>L252P</sup>  
314 model would then be of interest and will be a very good pre-clinic tool for testing new therapeutic  
315 combinations combining current therapies with those targeting immune system reactivation, such as  
316 anti-PD-1 or anti-TIM-3 immunotherapies or those directly targeting the binding of  
317 immunosuppressive cytokines IL-6 or IL-10 to their receptors.

318

### 319 **Author Contributions**

320 QL, OT, MC and LJ performed and analysed experiments. QL performed flow cytometry analysis. CV-F  
321 contributed to the experiments and analysed the results. JF and CV-F directed the study. QL and CV-F  
322 wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

323

### 324 **Funding**

325 QL was supported by the ‘Fondation pour la recherche Médicale (FRM) “. CV-F, OT and JF were  
326 supported by the “Fondation ARC pour la recherche sur la cancer”. CVF was supported by the  
327 International Waldenström Macroglobulinemia Foundation.

328

### 329 **Conflict of Interest**

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

332

### 333 **Acknowledgments**

334 We thank the animal, histology, cytometry and microscopy facilities of the technological platform of  
335 the University of Limoges BISCEM (Inserm 042, CNRS 2015, Hospital University Center of Limoges).

336

### 337 **References**

- 338 [1] M. Gayet *et al.*, « Flow cytometry detection of CD138 expression continuum between  
339 monotypic B and plasma cells is associated with both high IgM peak levels and MYD88 mutation  
340 and contributes to diagnosis of Waldenström macroglobulinemia », *Cytometry B Clin. Cytom.*,  
341 févr. 2021, doi: 10.1002/cyto.b.21995.
- 342 [2] F. Nguyen-Khac *et al.*, « Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174  
343 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia », *Haematologica*, vol. 98, n° 4, p.  
344 649-654, avr. 2013, doi: 10.3324/haematol.2012.070458.
- 345 [3] S. P. Treon *et al.*, « MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia », *N.*  
346 *Engl. J. Med.*, vol. 367, n° 9, p. 826-833, août 2012, doi: 10.1056/NEJMoa1200710.
- 347 [4] N. Gachard *et al.*, « IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three  
348 marginal zone lymphoma entities and Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic  
349 lymphomas », *Leukemia*, vol. 27, n° 1, p. 183-189, janv. 2013, doi: 10.1038/leu.2012.257.
- 350 [5] C. Buske et V. Leblond, « How to manage Waldenström's macroglobulinemia », *Leukemia*, vol.  
351 27, n° 4, p. 762-772, avr. 2013, doi: 10.1038/leu.2013.36.
- 352 [6] S. P. Treon, Y. Cao, L. Xu, G. Yang, X. Liu, et Z. R. Hunter, « Somatic mutations in MYD88 and  
353 CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström  
354 macroglobulinemia », *Blood*, vol. 123, n° 18, p. 2791-2796, mai 2014, doi: 10.1182/blood-2014-  
355 01-550905.
- 356 [7] L. Simon, M. Baron, et V. Leblond, « How we manage patients with Waldenström  
357 macroglobulinaemia », *Br. J. Haematol.*, vol. 181, n° 6, p. 737-751, juin 2018, doi:  
358 10.1111/bjh.15202.
- 359 [8] G. Knittel *et al.*, « B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the  
360 development of diffuse large B-cell lymphoma in mice », *Blood*, vol. 127, n° 22, p. 2732-2741,  
361 02 2016, doi: 10.1182/blood-2015-11-684183.



- 362 [9] T. Sewastianik *et al.*, « Human MYD88L265P is insufficient by itself to drive neoplastic  
363 transformation in mature mouse B cells », *Blood Adv.*, vol. 3, n° 21, p. 3360-3374, 12 2019, doi:  
364 10.1182/bloodadvances.2019000588.
- 365 [10] K. Schmidt *et al.*, « B-Cell-Specific Myd88 L252P Expression Causes a Premalignant  
366 Gammopathy Resembling IgM MGUS », *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 602868, 2020, doi:  
367 10.3389/fimmu.2020.602868.
- 368 [11] C. Ouk *et al.*, « Continuous MYD88 Activation Is Associated With Expansion and Then  
369 Transformation of IgM Differentiating Plasma Cells », *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 641692, 2021,  
370 doi: 10.3389/fimmu.2021.641692.
- 371 [12] B. Zhang *et al.*, « Immune surveillance and therapy of lymphomas driven by Epstein-Barr virus  
372 protein LMP1 in a mouse model », *Cell*, vol. 148, n° 4, p. 739-751, févr. 2012, doi:  
373 10.1016/j.cell.2011.12.031.
- 374 [13] C. Vincent-Fabert *et al.*, « Inflamed phenotype of splenic marginal zone B-cell lymphomas with  
375 expression of PD-L1 by intratumoral monocytes/macrophages and dendritic cells », *Cell. Mol.*  
376 *Immunol.*, vol. 16, n° 6, p. 621-624, 2019, doi: 10.1038/s41423-019-0228-y.
- 377 [14] C. Vincent-Fabert, L. Roland, U. Zimmer-Strobl, J. Feuillard, et N. Faumont, « Pre-clinical blocking  
378 of PD-L1 molecule, which expression is down regulated by NF- $\kappa$ B, JAK1/JAK2 and BTK inhibitors,  
379 induces regression of activated B-cell lymphoma », *Cell Commun. Signal. CCS*, vol. 17, n° 1, p.  
380 89, 05 2019, doi: 10.1186/s12964-019-0391-x.
- 381 [15] C. Vincent-Fabert *et al.*, « Reproducing indolent B-cell lymphoma transformation with T-cell  
382 immunosuppression in LMP1/CD40-expressing mice », *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 16, n° 4, p.  
383 412-414, 2019, doi: 10.1038/s41423-018-0197-6.
- 384 [16] Q. Lemasson, H. Akil, J. Feuillard, et C. Vincent-Fabert, « Genetically Engineered Mouse Models  
385 Support a Major Role of Immune Checkpoint-Dependent Immunosurveillance Escape in B-Cell  
386 Lymphomas », *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 669964, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.669964.
- 387 [17] G. Görgün, T. A. W. Holderried, D. Zahrieh, D. Neuberg, et J. G. Gribben, « Chronic lymphocytic  
388 leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells », *J. Clin. Invest.*, vol.  
389 115, n° 7, p. 1797-1805, juill. 2005, doi: 10.1172/JCI24176.
- 390 [18] S. P. Hilchey, A. De, L. M. Rimsza, R. B. Bankert, et S. H. Bernstein, « Follicular lymphoma  
391 intratumoral CD4+CD25+GITR+ regulatory T cells potently suppress CD3/CD28-costimulated  
392 autologous and allogeneic CD8+CD25- and CD4+CD25- T cells », *J. Immunol. Baltim. Md 1950*,  
393 vol. 178, n° 7, p. 4051-4061, avr. 2007, doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4051.
- 394 [19] Z.-Z. Yang *et al.*, « IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients  
395 with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma », *J. Clin. Invest.*, vol. 122, n° 4, p. 1271-1282, avr.  
396 2012, doi: 10.1172/JCI59806.
- 397 [20] J. C. Riches *et al.*, « T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain  
398 capacity for cytokine production », *Blood*, vol. 121, n° 9, p. 1612-1621, févr. 2013, doi:  
399 10.1182/blood-2012-09-457531.
- 400 [21] M. Palma *et al.*, « T cells in chronic lymphocytic leukemia display dysregulated expression of  
401 immune checkpoints and activation markers », *Haematologica*, vol. 102, n° 3, Art. n° 3, mars  
402 2017, doi: 10.3324/haematol.2016.151100.
- 403 [22] D. M. Grote *et al.*, « Interactions Between PD-1 and PD-L1 and PD-L2 Promote Malignant B-Cell  
404 Growth in Waldenstrom Macroglobulinemia », *Blood*, vol. 122, n° 21, p. 4334, nov. 2013, doi:  
405 10.1182/blood.V122.21.4334.4334.
- 406 [23] S. Jalali *et al.*, « Soluble PD-1 ligands regulate T-cell function in Waldenstrom  
407 macroglobulinemia », *Blood Adv.*, vol. 2, n° 15, p. 1985-1997, 14 2018, doi:  
408 10.1182/bloodadvances.2018021113.
- 409 [24] A. Kaushal *et al.*, « Aberrant Extrafollicular B Cells, Immune Dysfunction, Myeloid Inflammation,  
410 and MyD88-Mutant Progenitors Precede Waldenstrom Macroglobulinemia », *Blood Cancer*  
411 *Discov.*, vol. 2, n° 6, p. 600-615, nov. 2021, doi: 10.1158/2643-3230.BCD-21-0043.

- 412 [25] H. Sun *et al.*, « Single-cell profiles reveal tumor cell heterogeneity and immunosuppressive  
413 microenvironment in Waldenström macroglobulinemia », *J. Transl. Med.*, vol. 20, n° 1, p. 576,  
414 déc. 2022, doi: 10.1186/s12967-022-03798-6.
- 415 [26] D. S. Chen et I. Mellman, « Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point »,  
416 *Nature*, vol. 541, n° 7637, p. 321-330, 18 2017, doi: 10.1038/nature21349.
- 417 [27] D. Cholujoval *et al.*, « Dysfunctions of innate and adaptive immune tumor microenvironment in  
418 Waldenström macroglobulinemia », *Int. J. Cancer*, vol. 152, n° 9, p. 1947-1963, mai 2023, doi:  
419 10.1002/ijc.34405.
- 420 [28] A. Sacco *et al.*, « Targeting the immune microenvironment in Waldenström macroglobulinemia  
421 via halting the CD40/CD40-ligand axis », *Blood*, vol. 141, n° 21, p. 2615-2628, mai 2023, doi:  
422 10.1182/blood.2022019240.
- 423 [29] H. Banerjee *et al.*, « Expression of Tim-3 drives phenotypic and functional changes in Treg cells  
424 in secondary lymphoid organs and the tumor microenvironment », *Cell Rep.*, vol. 36, n° 11, p.  
425 109699, sept. 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2021.109699.
- 426 [30] Y. Li *et al.*, « Efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 therapy in the treatment of advanced  
427 colorectal cancer: a meta-analysis », *BMC Gastroenterol.*, vol. 22, n° 1, p. 431, oct. 2022, doi:  
428 10.1186/s12876-022-02511-7.
- 429 [31] X. Yu *et al.*, « Evolving perspectives regarding the role of the PD-1/PD-L1 pathway in gastric  
430 cancer immunotherapy », *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, vol. 1870, n° 1, p. 166881,  
431 sept. 2023, doi: 10.1016/j.bbadis.2023.166881.
- 432 [32] S. Kumar, M. Chatterjee, P. Ghosh, K. K. Ganguly, M. Basu, et M. K. Ghosh, « Targeting PD-1/PD-  
433 L1 in cancer immunotherapy: An effective strategy for treatment of triple-negative breast  
434 cancer (TNBC) patients », *Genes Dis.*, vol. 10, n° 4, p. 1318-1350, juill. 2023, doi:  
435 10.1016/j.gendis.2022.07.024.
- 436

437 **Legends for figures**

438 **Figure 1: Splenic lymphocytes homeostasis from *Myd88<sup>L252P</sup>* mice was disrupted**

439 Figure 1A: Anti-CD3 labelling was realised on paraffin-embed spleen sections and compared  
440 between *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L252P</sup>* mice.

441

442 Figure 1B: Percentages of CD19<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells among total splenic lymphocytes. *Cd19<sup>Cre</sup>*  
443 n=5 ; *Myd88<sup>L252P</sup>* n=5. Mann Whitney test p-value < 0.05 and p-value < 0.01 are symbolized by  
444 \* and \*\* respectively.

445

446

447 **Figure 2: Tumor B cells from *Myd88<sup>L252P</sup>* mice presented an immunomodulatory phenotype**

448 Figure 2A: Percentage of CD80 positive cells among CD19<sup>+</sup> splenic population is shown on left  
449 panel. On the right panel, example of a single-parameter histogram showing the mean  
450 fluorescence intensity of the CD80 marker for *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L252P</sup>* groups.

451 Figure 2B: Percentage of CD86 positive cells among CD19<sup>+</sup> splenic population is shown on left  
452 panel. On the right panel, example of a single-parameter histogram showing the mean  
453 fluorescence intensity of the CD86 marker for *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L252P</sup>* groups.

454 Figure 2C: Percentage of PD-L1 positive cells among B220<sup>+</sup> splenic population is shown on left  
455 panel. On the right panel, example of a single-parameter histogram showing the mean  
456 fluorescence intensity of the PD-L1 marker for *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L252P</sup>* groups.

457 Figure 2D: Percentage of MHC-II positive cells among B220<sup>+</sup> splenic population is shown on  
458 left panel. On the right panel, example of a single-parameter histogram showing the mean  
459 fluorescence intensity of the MHC-II marker for *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L252P</sup>* groups.

460 Figure 2E: Percentage of IL-10 positive cells among CD19<sup>+</sup> splenic population.

461 Figure 2F: Percentage of CD80 positive cells among CD19<sup>+</sup> splenic population.

462 Figure 2G: Percentage of TNF $\alpha$  positive cells among CD19<sup>+</sup> splenic population.

463 Figure 2H: Percentage of IFN $\gamma$  positive cells among CD19<sup>+</sup> splenic population.

464

465 For all panels *Cd19<sup>Cre</sup>* n= 5 or 10 ; *Myd88<sup>L252P</sup>* n=5. Mann Whitney test p-value < 0.05, p-value  
466 < 0.01 and < 0.001 are symbolized by \*, \*\* and \*\*\* respectively.

467

468 **Figure 3: Immunofluorescence staining showed a disruption of spleen organisation in**  
469 ***Myd88*<sup>L252P</sup> mice**

470 Figure 3A and E: DAPI counter stain of *Cd19*<sup>Cre</sup> and *Myd88*<sup>L252P</sup> spleens respectively.

471

472 Figure 3B and F: B cells of *Cd19*<sup>Cre</sup> and *Myd88*<sup>L252P</sup> mice are revealed with anti-B220-FITC  
473 antibody.

474

475 Figure 3C and G: T cells of *Cd19*<sup>Cre</sup> and *Myd88*<sup>L252P</sup> mice are revealed with anti-CD3-PE antibody.

476

477 Figure 3D and H: Visualisation of merged channels (DAPI + FITC + PE).

478

479 **Figure 4: Tumor infiltrated T cells from *Myd88<sup>L252P</sup>* tumors presented an over-activated**  
480 **phenotype**

481

482 Figure 4A: Left panel, percentages of naive (CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>), memory (CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>) and  
483 effector (CD62L<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup>) CD4 T cells are compared between *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L252P</sup>* mice. Right  
484 panel, example of bi parametric flow cytometry histograms gated on CD4 positive T cells for  
485 expression of CD62L and CD44 for *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L252P</sup>* mice.

486

487 Figure 4B: Left panel, percentages of naive (CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>), memory (CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>) and  
488 effector (CD62L<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup>) CD8 T cells are compared between *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L252P</sup>* mice. Right  
489 panel, example of bi parametric flow cytometry histograms gated on CD8 positive T cells for  
490 expression of CD62L and CD44 for *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L252P</sup>* mice.

491

492 Figure 4C: Percentages of CD4 and CD8 T cells expression both activation markers CD134 and  
493 CD137 are compared between *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L252P</sup>* groups.

494

495 For all panels, *Cd19<sup>Cre</sup>* n=10 ; *Myd88<sup>L252P</sup>* n=5. Mann Whitney p-value < 0.01 and < 0.001 are  
496 symbolized by \*\* and \*\*\* respectively.

497

498 **Figure 5: Over-activated T cells from *Myd88<sup>L252P</sup>* tumors presented a Th1 polarization**

499 Figure 5A: Percentage of IL-2 positive CD4 T cells compared between *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L52P</sup>*  
500 groups.

501

502 Figure 5B: Percentage of IFN $\gamma$  positives CD4 T cells compared between *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L52P</sup>*  
503 groups.

504

505 Figure 5C: Percentage of Granzyme B positives CD8 T cells compared between *Cd19<sup>Cre</sup>* and  
506 *Myd88<sup>L52P</sup>* groups.

507

508 Figure 5D: Percentage of IL-2 positives CD8 T cells compared between *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L52P</sup>*  
509 groups.

510

511 Figure 5E: Percentage of IFN $\gamma$  CD8 T cells compared between *Cd19<sup>Cre</sup>* and *Myd88<sup>L52P</sup>* groups.

512

513 For all panels, *Cd19<sup>Cre</sup>* n=10 ; *Myd88<sup>L252P</sup>* n=5. Mann Whitney test p-value < 0.05 and p-value <  
514 0.01 are symbolized by \* and \*\* respectively.

515

516 **Figure 6: Infiltrated T cells from *Myd88*<sup>L252P</sup> tumors were exhausted**

517 Figure 6A: Percentage of CD4 and CD8 T cells expressing PD-1 compared between *Cd19*<sup>Cre</sup> and  
518 *Myd88*<sup>L252P</sup> groups. Comparison of PD-1 MFI is shown on the right side of this panel.

519

520 Figure 6B: Percentage of CD4 and CD8 T cells expressing CTLA-4 compared between *Cd19*<sup>Cre</sup>  
521 and *Myd88*<sup>L252P</sup> groups. Comparison of CTLA-4 MFI is shown on the right side of this panel.

522

523 Figure 6C: Percentage of CD4 and CD8 T cells expressing TIM-3 compared between *Cd19*<sup>Cre</sup>  
524 and *Myd88*<sup>L252P</sup> groups. Comparison of TIM-3 MFI is shown on the right side of this panel.

525

526 Figure 6D: Percentage of CD4 and CD8 T cells expressing LAG-3 compared between *Cd19*<sup>Cre</sup>  
527 and *Myd88*<sup>L252P</sup> groups. Comparison of LAG-3 MFI is shown on the right side of this panel.

528

529 Figure 6E and F: Percentages of CD4 and CD8 T cells secreting TNF $\alpha$  and IL-10 compared  
530 between *Cd19*<sup>Cre</sup> and *Myd88*<sup>L252P</sup>.

531

532 For all panels *Cd19*<sup>Cre</sup> n = 10 ; *Myd88*<sup>L252P</sup> n = 5. Mann Whitney test p-value < 0.05, p-value <  
533 0.01 and < 0.001 are symbolized by \*, \*\* and \*\*\* respectively.

534



535 **Figure 7: abnormal proportion of Tregs associated to a dysregulated anti-inflammatory**  
536 **phenotype support *Myd88*<sup>L252P</sup> tumor progression**

537 Figure 7A: Left panel, percentage of CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs among CD4<sup>+</sup> T cells compared  
538 between *Cd19*<sup>Cre</sup> and *Myd88*<sup>L252P</sup> groups. Right panel, example of bi parametric flow cytometry  
539 histograms gated on CD4 positive T cells for expression of CD25 and FoxP3 for *Cd19*<sup>Cre</sup> and  
540 *Myd88*<sup>L252P</sup> mice.

541 Figure 7B: Percentage of IL-6 secreting Tregs compared between *Cd19*<sup>Cre</sup> and *Myd88*<sup>L252P</sup>  
542 groups.

543 Figure 7C: Percentage of IL-10 secreting Tregs compared between *Cd19*<sup>Cre</sup> and *Myd88*<sup>L252P</sup>  
544 groups.

545 Figure 7D: Percentage of Tregs expressing TIM-3 compared between *Cd19*<sup>Cre</sup> and *Myd88*<sup>L252P</sup>  
546 groups.

547 Figure 7E: Percentage of IL-6 secreting cells compared between TIM-3 positives and TIM-3  
548 negatives Tregs.

549 Figure 7F: Percentage of IL-10 secreting cells compared between TIM-3 positives and TIM-3  
550 negatives Tregs.

551

552 For all panels *Cd19*<sup>Cre</sup> n=5 ; *Myd88*<sup>L252P</sup> n=5. Mann Whitney test p-value < 0.05, p-value < 0.01  
553 and < 0.001 are symbolized by \*, \*\* and \*\*\* respectively.

554

Figure 1

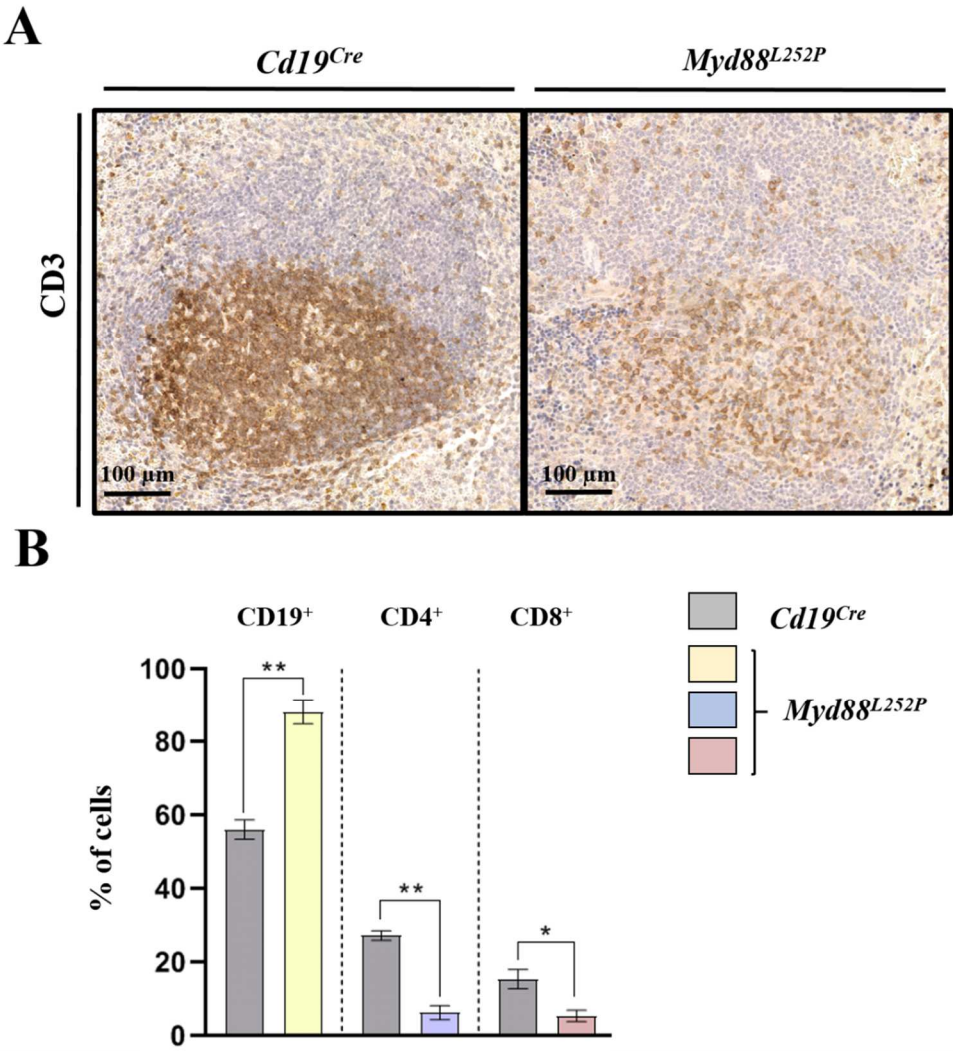


Figure 2

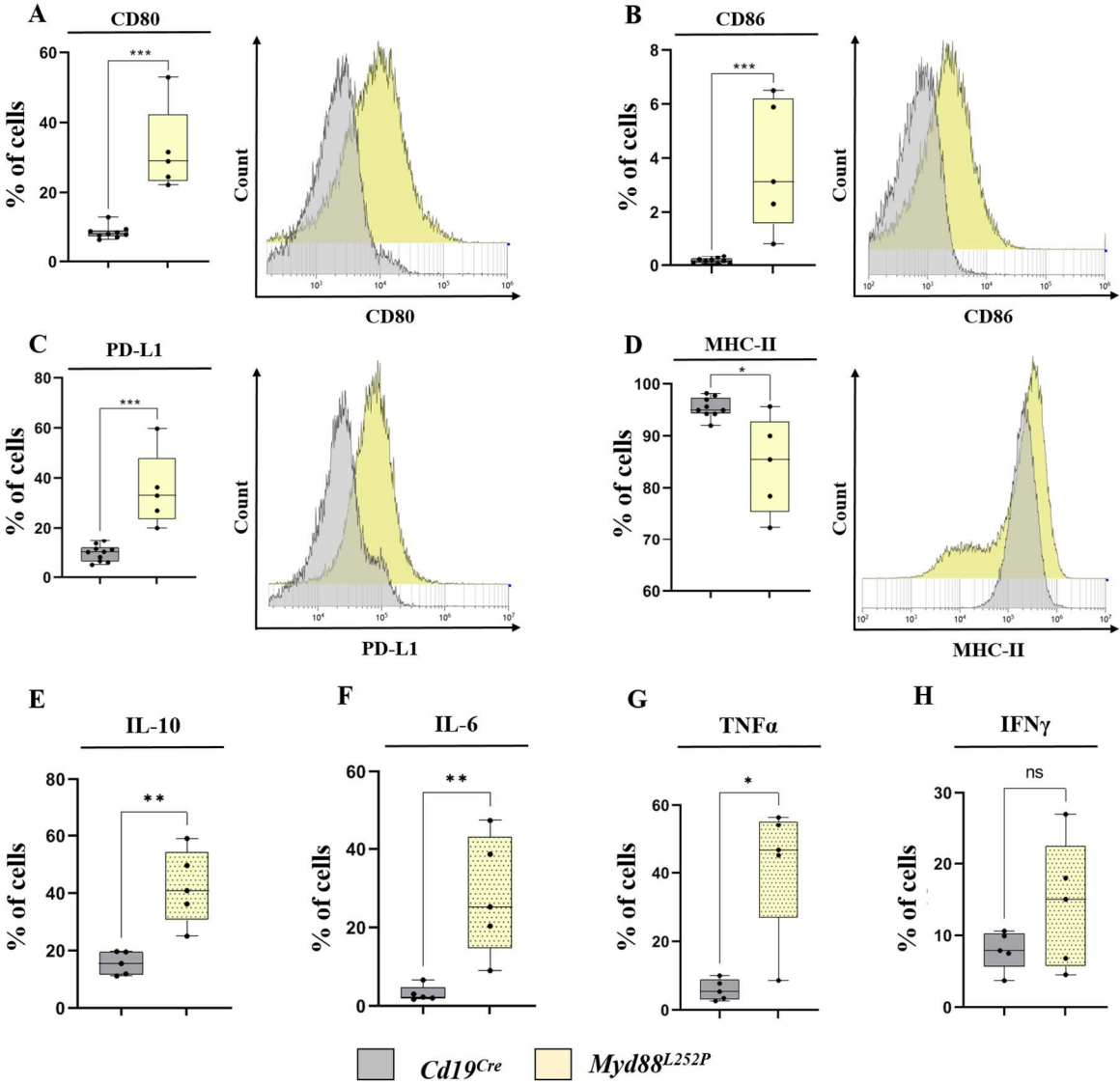
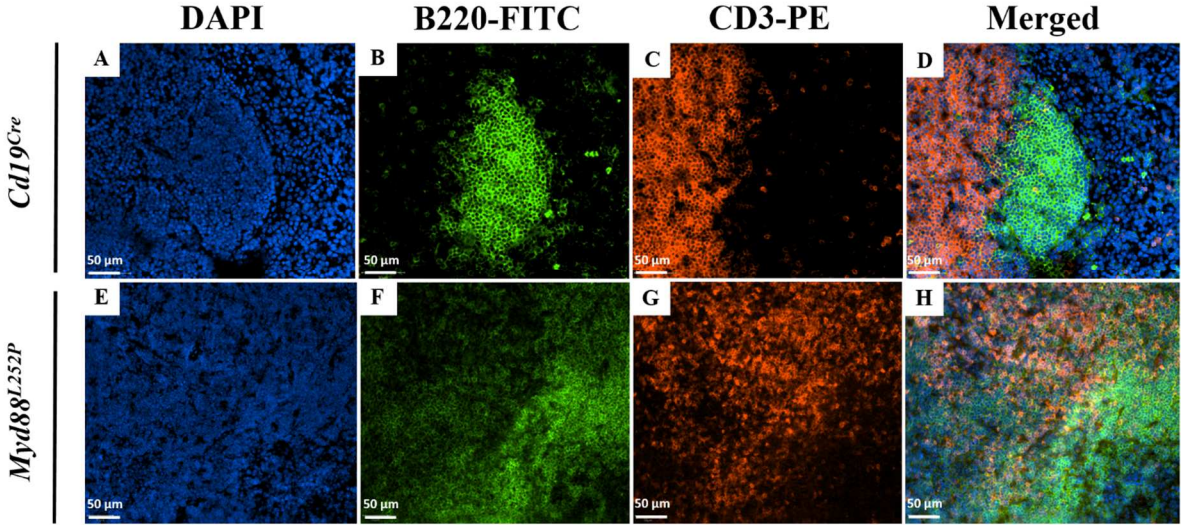


Figure 3



**Figure 4**

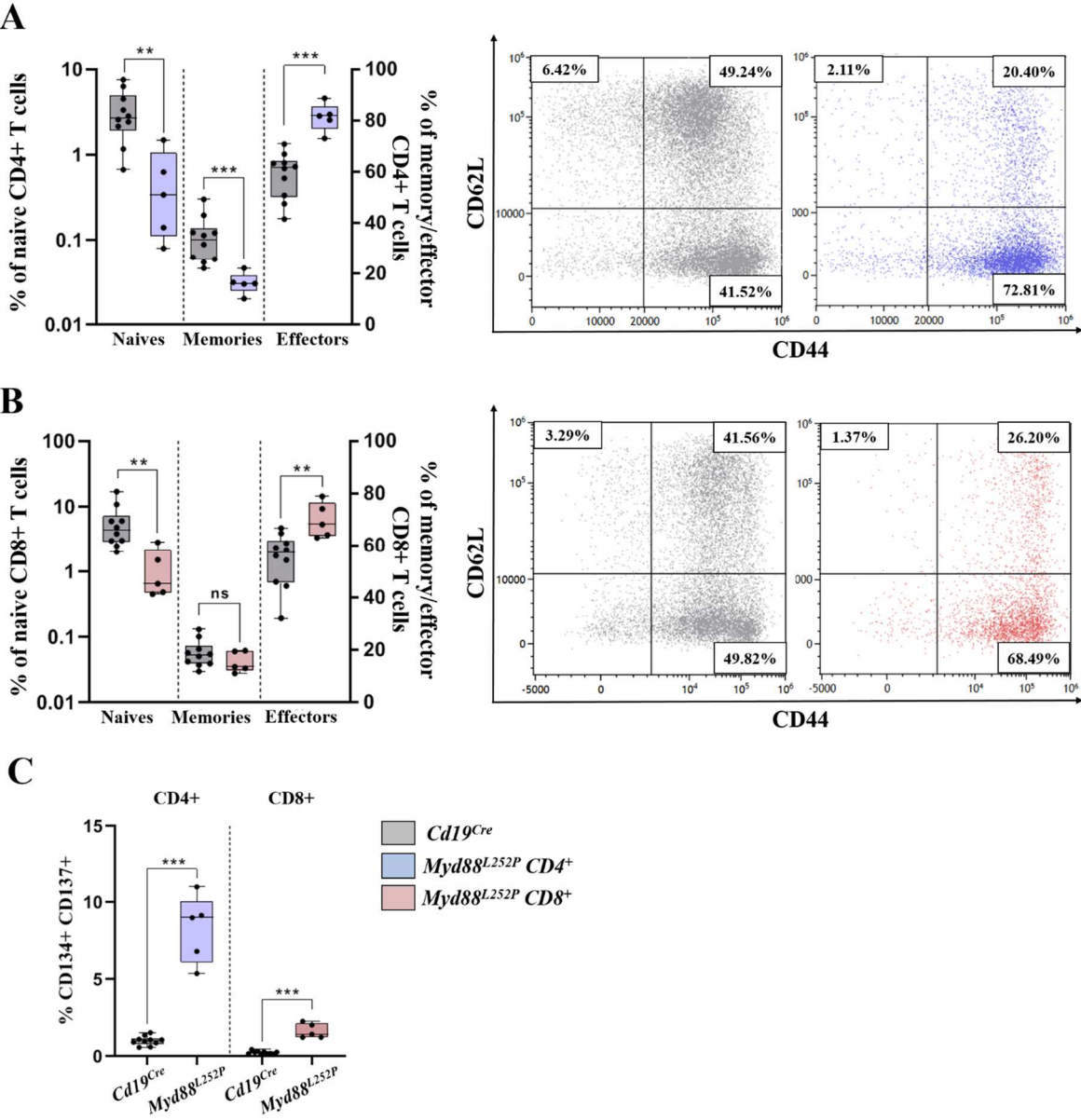
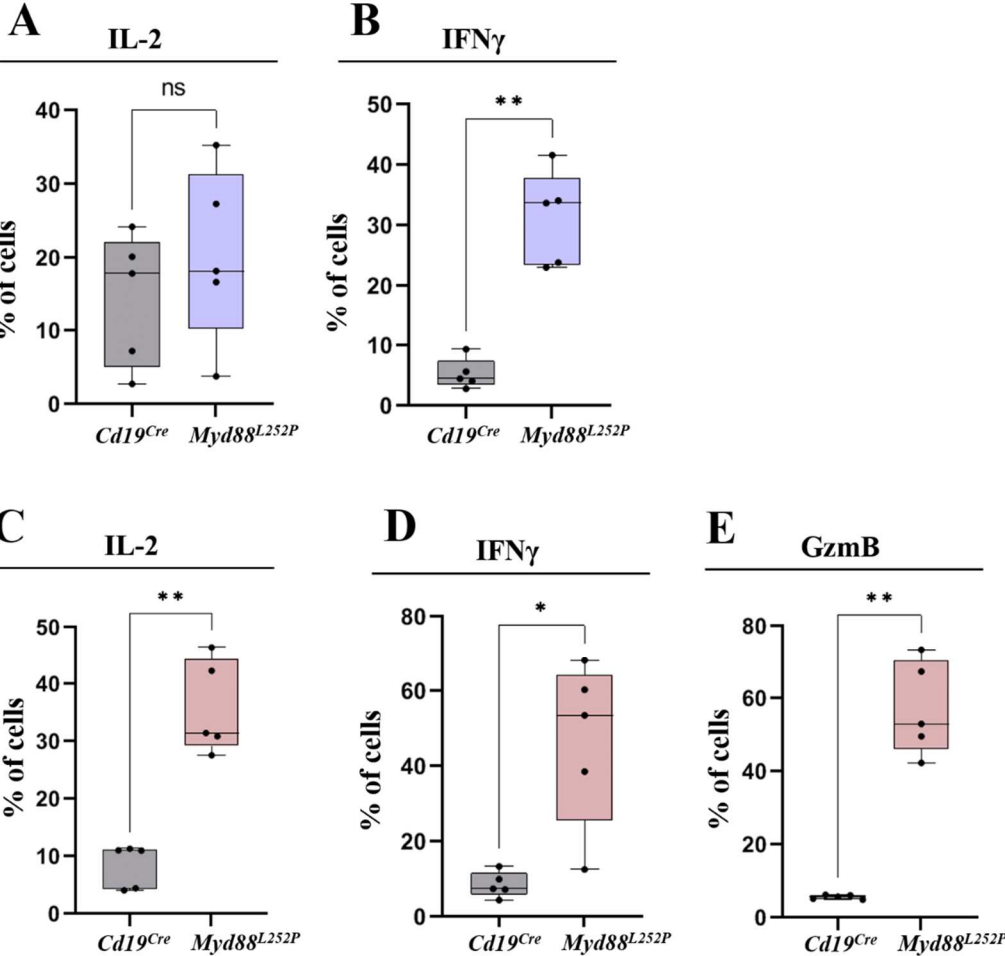


Figure 5



**Figure 6**

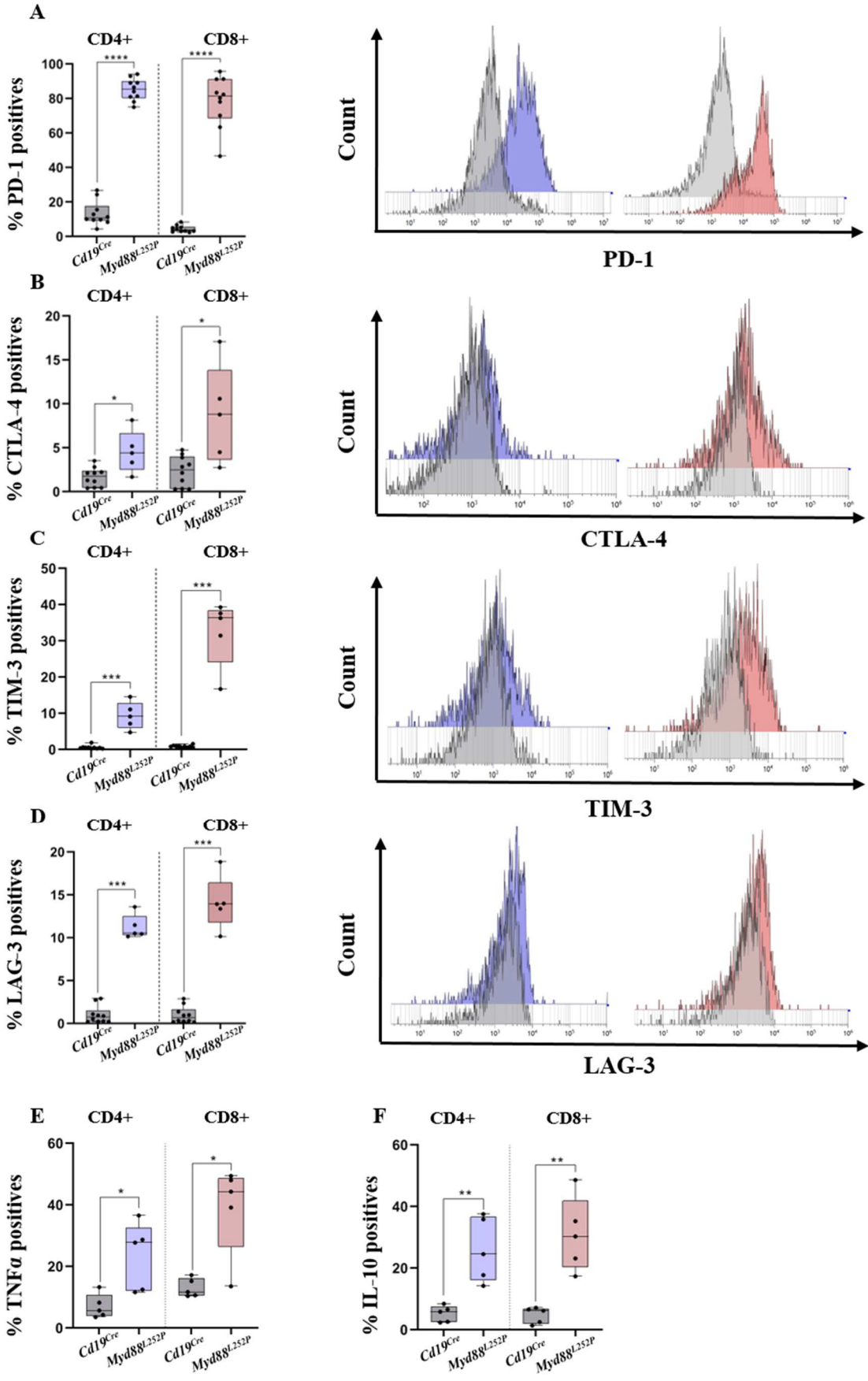
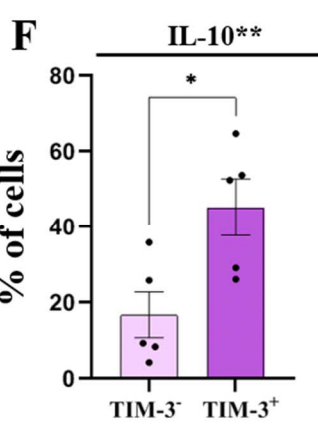
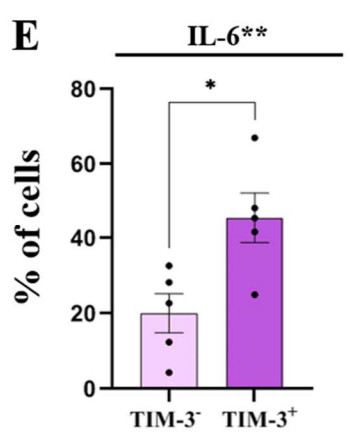
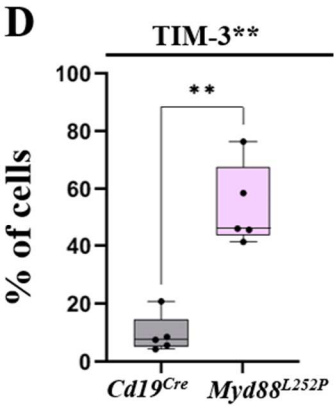
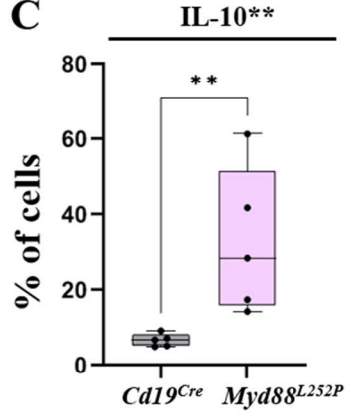
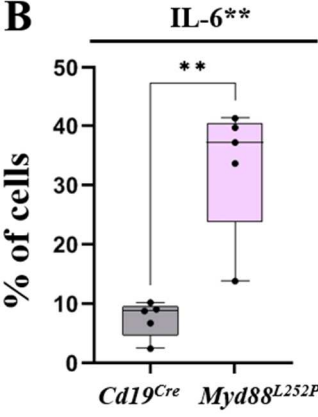
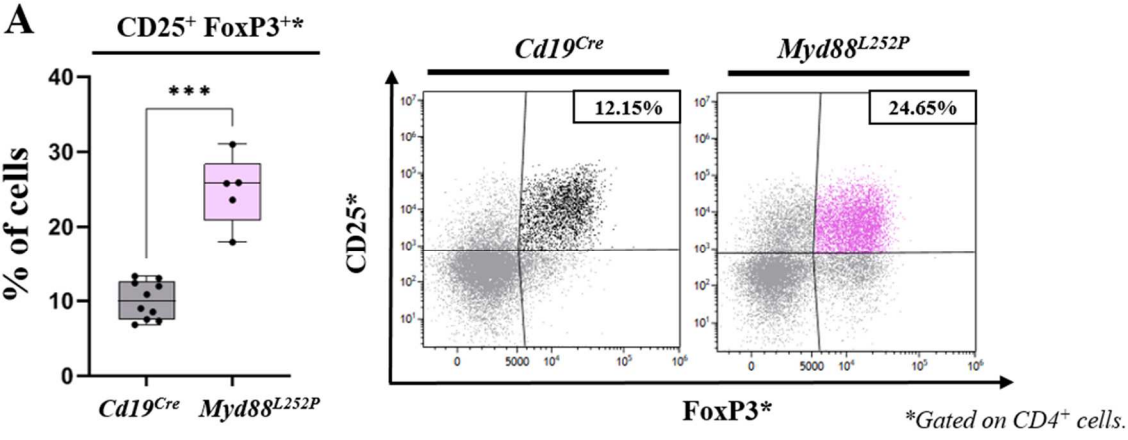
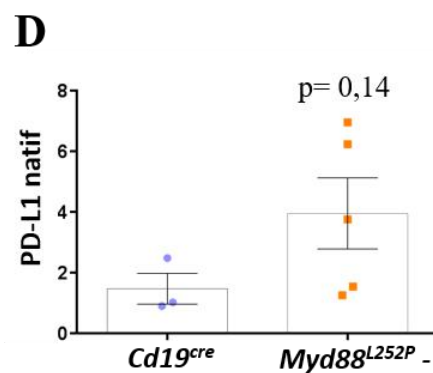
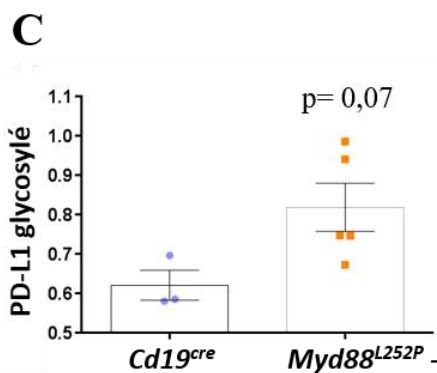
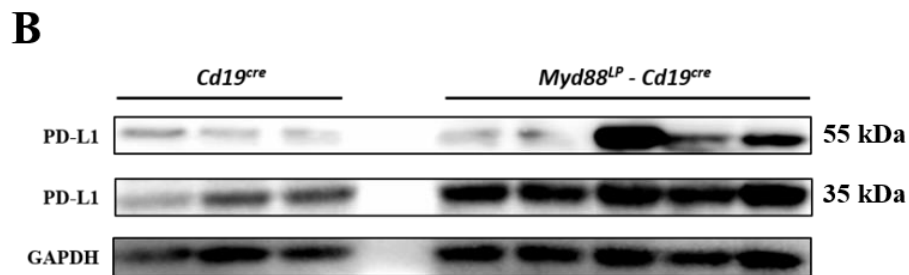
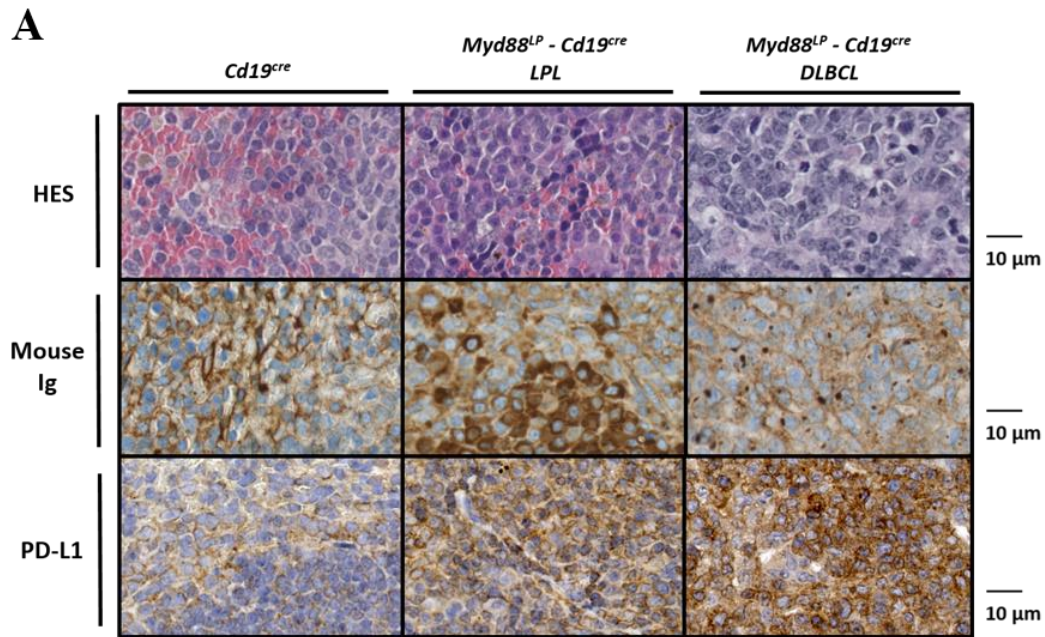


Figure 7



\*\*Gated on CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells.





### Annexe 3. Analyse du niveau d'expression de PD-L1 en IHC et Western Blot

**A** : En IHC sur coupe de rates incluses en paraffine, un marquage anti-PD-L1 est réalisé suivant le protocole décrit en Matériel et Méthode section V.A. La révélation des épitopes est ici réalisée en tampon citrate-EDTA. Le marquage PD-L1 semble plus prononcé sur les coupes de rates DLBCL-like. **B** : Western Blot réalisé sur protéines issues de LB spléniques triés (Pan B Cells isolation kit, Miltenyi®). L'anticorps primaire anti-PD-L1 (#sc50298, Santa Cruz®) est utilisé au 1/200<sup>ème</sup>. **C** : Quantification de la forme glycosylée de PD-L1 (55 kDa). **D** : Quantification de la forme native de PD-L1 (35 kDa).



## Mise en évidence des mécanismes d'échappement à la réponse immune dans la maladie de Waldenström au travers de l'étude du microenvironnement immunitaire dans un modèle pré-clinique Myd88 muté et perspectives thérapeutiques.

---

La maladie de Waldenström est un syndrome lymphoprolifératif B indolent et rare se développant dans la moelle osseuse, dont la principale caractéristique est la présence quasi-systématique de la mutation L265P de la protéine *MYD88*. Les thérapies utilisées en clinique ne parviennent malheureusement pas à contenir cette maladie, qui est par conséquent toujours incurable à l'heure actuelle. Grâce à un modèle transgénique murin mimant la maladie de Waldenström, nous avons démontré la présence de mécanismes d'échappement immunitaire associés à un épuisement fonctionnel des lymphocytes T. Ces mécanismes semblent participer au développement du lymphome indolent et sont plus accentués encore lors de sa transformation en lymphome agressif. Si ces résultats permettent d'en apprendre plus sur le développement de la maladie, ils permettent également d'ouvrir la voie à de nombreuses perspectives thérapeutiques. Une des parties de ce travail consiste d'ailleurs à utiliser le modèle murin comme modèle d'étude préclinique, ce qui nous a permis de démontrer un bénéfice certain apporté par des thérapies ciblées réactivant le système immunitaire telles que les anti-PD-1 ou encore les anti-IL-10R.

---

**Mots-clés :** Maladie de Waldenström, Epuisement T, Immunomodulation, échappement, thérapie.

## Characterisation of multiple immune escape mechanisms in Waldenström macroglobulinemia through the study of the immune microenvironment in a Myd88 mutated pre-clinical model and therapeutic perspectives.

---

Waldenström disease is a rare, indolent B lymphoproliferative syndrome of the bone marrow, whose main feature is the almost systematic presence of the L265P mutation of the *MYD88* protein. Unfortunately, clinical therapies are unable to contain this disease, which remains incurable to this day. Using a transgenic mouse model mimicking Waldenström's disease, we have demonstrated the presence of immune escape mechanisms associated with functional exhaustion of T lymphocytes. These mechanisms appear to be involved in the development of indolent lymphoma, and are even more accentuated during its transformation into aggressive lymphoma. While these results provide new insights into the development of the disease, they also help open the way to numerous therapeutic perspectives. In fact, part of this work involves using the mouse model as a pre-clinical-preclinical study model, enabling us to demonstrate the clear benefit of targeted immune reactivating therapies such as anti-PD-1 or anti-IL-10R.

---

**Keywords :** Waldenström macroglobulinemia, T cell exhaustion, Immunomodulation, Immune escape, Therapy.

