



HAL
open science

Modélisation de la réponse thérapeutique du lymphome folliculaire grâce à un modèle 3D organoïde

Narimène Houmera

► **To cite this version:**

Narimène Houmera. Modélisation de la réponse thérapeutique du lymphome folliculaire grâce à un modèle 3D organoïde. Cancer. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10255 . tel-04819976

HAL Id: tel-04819976

<https://theses.hal.science/tel-04819976v1>

Submitted on 5 Dec 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.

Université Claude Bernard  Lyon 1

**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N°340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)**

Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 04/12/2023, par :
Narimène HOUMERA

**MODELISATION DE LA REPONSE
THERAPEUTIQUE DU LYMPHOME
FOLLICULAIRE GRACE A UN MODELE 3D
ORGANOÏDE**

Devant le jury composé de :

Pr. PAYEN-GAY, Léa – PU-PH – UCBL, ISPB, Lyon	Présidente du jury
Dr. BEZOMBES Christine – CR INSERM – NoLymIT, Toulouse Dr.	Rapporteure
ROULLAND Sandrine – DR INSERM – CIML, Marseille	Rapporteure
Dr. CARRAS Sylvain – PHU – CHUGA, Grenoble	Examineur
Dr. GENESTIER Laurent – DR INSERM – CIRI, Lyon	Directeur de thèse
Dr. HUET Sarah – MCU-PH – UCBL, ISPB, Lyon	Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

A mes directeurs de thèse,

Sarah, je tenais à te remercier de m'avoir accueillie en stage alors que je n'étais encore qu'une jeune étudiante en master, et par la suite, de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse au sein de l'équipe. Grâce à toi, j'ai pu découvrir la discipline passionnante qu'est l'hématologie. Un grand merci pour le temps que tu as consacré, aux côtés de Laurent, à m'encadrer et à corriger les diverses présentations, appels à projet, et surtout ce manuscrit de thèse. Ton exigence m'a poussée jusque dans mes derniers retranchements, et c'est ce qui rend cet aboutissement si précieux. Merci pour tout !

Laurent, je tenais également à te remercier de m'avoir accueillie au sein de ton équipe il y a maintenant près de 5 ans et de m'avoir ensuite encadrée tout au long de ce projet de thèse qui n'était initialement pas le tien, et pour lequel tu as dédié tant de temps. Ta présence constante au laboratoire a été d'une grande aide, en particulier lors des manipulations ! Merci d'avoir toujours gardé ta porte ouverte et d'avoir été un chef si accessible et humain. Il a été si facile de parler avec toi que je n'ai pas ressenti les barrières généralement imposées par le statut de directeur de thèse et d'équipe. Merci pour tout !

A mes rapporteurs,

Le Dr. Sandrine Roulland et le Dr. Christine Bezombes. Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse et vous remercie pour vos retours bienveillants. Vos expertises respectives sur le lymphome folliculaire et sur les modèles de culture 3D présagent des discussions enrichissantes et instructives.

A mes examinateurs,

Je remercie grandement le **Dr. Léa Payen-Gay** pour avoir accepté de présider ce jury et d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie également le **Dr. Sylvain Carras** pour avoir généreusement accepté d'évaluer ce travail malgré la demande de participation la moins

sympa de l'histoire des jurys de thèse ! Vos connaissances respectives laissent entrevoir des échanges enrichissants.

Aux membres de l'équipe LIB,

Tout d'abord, je tiens à vous exprimer ma gratitude pour votre accueil à mon arrivée au laboratoire il y a maintenant près de 5 ans et pour tous les moments que nous avons partagé depuis. Cette fin de thèse n'a pas été facile, mais j'ai pu compter sur beaucoup d'entre vous, que ce soit pour un coup de main précieux ou simplement me changer les idées après avoir passé la journée à écrire ce manuscrit de thèse.

Stéphanie, je tiens vraiment à te remercier pour ta gentillesse constante depuis mon arrivée dans l'équipe et pour ton aide inestimable tout au long de cette thèse. Merci d'avoir géré toutes mes commandes et contrats (dont je t'informais souvent à la dernière minute, encore désolée!) ainsi que les détails logistiques pour le jour j ! Je tiens également à remercier **Aurélie**, tu as été d'une aide précieuse en cette fin de thèse. Merci d'avoir consacré une partie de ton temps ces derniers mois à effectuer toutes les analyses OMIQ qui apportent une réelle valeur ajoutée à l'article ! **Nathalie**, merci pour toutes les fois où je suis venue te poser des *petites* questions et où tu as toujours répondu avec une grande bienveillance. Merci pour nos discussions enrichissantes lors de nos trajets jusqu'à Pierre-Bénite et pour toutes les fois où tu as été présente pour moi lorsque je t'appelais à l'aide pendant mes week-ends au laboratoire. Je souhaiterais aussi remercier **Emilie** – tu as toujours été là lorsque j'avais toutes sortes de questions et j'ai vraiment apprécié nos échanges variés et enrichissants. Merci d'avoir partagé avec moi le passage secret vers la gare d'Oullins qui m'a fait gagner un temps précieux lorsque j'allais louper le train haha ! **Amel**, je te remercie de m'avoir pris sous ton aile à mon arrivée au laboratoire et pour toute l'aide que tu m'as apporté depuis. Tu as toujours su trouver du temps pour moi en dehors de tes nombreuses autres responsabilités. Merci d'avoir été cette oreille attentive dont j'avais parfois besoin au laboratoire, ta bienveillance et tes conseils dans les moments difficiles ont été d'un grand soutien pour moi. Un grand merci à **Jean-Pierre**, alias **JPR** sur toutes les paillasses du labo – je tenais tout d'abord à vous remercier pour vos précieux conseils tout au long de cette thèse ainsi que pour avoir corrigé les fautes de mon PowerPoint final. Malgré votre statut, il a toujours été extrêmement facile de discuter avec vous, et les

teatime de 16h ont grandement aidé en cette fin de thèse. Merci pour tout ! Je tiens également à remercier **Mélania** – j'ai beaucoup apprécié toutes les discussions et les échanges que nous avons eus ! Merci sincèrement pour toutes les fois où tu es intervenue avec bienveillance pendant mes réunions d'équipe. Je voulais remercier **Pierre**, déjà pour avoir toujours validé mes demandes pour récupérer les échantillons dont j'avais besoin auprès du CBS mais aussi pour toutes tes interventions musclées au cours de mes réunions d'équipe – elles m'ont non seulement permis d'apprendre à défendre mon projet de thèse, mais m'ont également poussé à aller plus loin dans ma réflexion. Enfin, je tenais à remercier **Manu** – je te souhaite beaucoup de réussite dans la codirection de l'équipe avec Laurent ! Que votre collaboration porte ses fruits et contribue au succès de l'équipe.

Je tenais également à remercier les autres membres de l'équipe...

Laetitia, Marie et Chrystelle – bon courage pour la suite du projet Kambo, votre détermination est telle que je mise sur le prochain prix Nobel ! Merci à la team « immatures », et plus spécialement **Sarah.B**, et **Erivan** – bonne continuation pour ta 3^{ème} année de thèse et ne perds pas de vue Martine, elle risquerait d'aller se promener haha ! Merci aux bio-informaticiens de l'équipe, **David** et **Fabrice**, pour vos conseils avisés et votre aide. Enfin, merci à **Léo-Paul**, mon 2^{ème} stagiaire pour ton aide pendant les 3 mois où tu as été au laboratoire, et merci à **Magali** et **Jonathan** !

À mes collègues, aujourd'hui devenus des amis...

Je tiens tout d'abord à remercier celles avec qui j'ai entamé cette thèse, **Solène** et **Manon.T**. Notre complicité a été quasi immédiate, et nous avons partagés de nombreux moments mémorables ensemble : les fous rires en pièce culture, les vocaux inaudibles au -80°C, notre passion pour le cappuccino vanille, les séances de fitness de Thibault et Justine, ainsi que les week-ends entre randonnées et mariage à Perjussy... L'amitié que nous avons tissé au laboratoire va aujourd'hui bien au-delà de ces murs, merci pour tout ! Un grand merci à **Josselin**, avec qui j'ai également entamé cette thèse et qui a été mon tout 1^{er} stagiaire ! Je me rappellerais toujours de la phrase que tu m'as dite quand j'ai voulu te montrer les cuves d'azote haha. Merci pour ta bonne humeur, ta positivité (et ton insolence) au quotidien pendant cette

période. Nos chemins se sont séparés depuis, mais tu as toujours été d'un grand soutien ! Mon petit groupe s'est grandement élargi au fur et à mesure des années, et je tenais à remercier chaleureusement **Angélique** et **Emiel**, tout d'abord pour l'organisation des meilleurs week-ends entre copains mais surtout pour votre bienveillance à toutes épreuves ! Un grand merci à **Edith** pour tous les moments que nous avons partagés. Nos soutenances de thèse se suivent de près, je te souhaite le meilleur pour la suite ! Un grand merci à **Chloé** – nous avons traversé une bonne partie de nos thèses ensemble, et la conclusion de notre aventure à toutes les deux est la naissance d'une belle amitié ! Cette dernière année ne nous a pas donné beaucoup d'occasions de nous voir mais j'ai hâte de rattraper tout ça ! **Alexandra**, je tiens à te remercier sincèrement pour ta gentillesse et ton soutien ces derniers mois. J'ai été ravie de pouvoir partager ce bureau avec toi et j'espère que l'office of joy aura réussi à t'apporter un peu de réconfort après ton arrivée en France :) (PS : the taste of ice cream is still the best way to find the lucky one !). Enfin et pour terminer, je voudrais remercier mes coups de cœur amicaux, **Manon.Z**, **Sarah.S** et **Axel**. **Manon**, je tenais à te remercier tout particulièrement pour avoir toujours été présente pour moi depuis le début de ma thèse. Notre complicité a été immédiate et a créé un lien si fort entre nous qu'il y a bien longtemps que je ne te considère plus comme une simple collègue mais comme une très bonne amie. Merci pour tous ce que nous avons partagés, entre autres les fous rires et les potins croustillants, et merci de m'avoir ouvert ta porte chaque fois que j'en avais besoin. Ces 6 derniers mois, plongés dans nos thèses respectives, ont été particulièrement intenses pour nous deux et j'attends avec impatience le moment où nous serons libres toutes les deux (tu vas assurer quand ça sera ton tour !) pour écrire une nouvelle page de notre amitié. Qui sait, peut-être qu'on finira par l'avoir cet après-thèse idéal, avec les petites biquettes dans la montagne (mais sans abeilles, moustiques ou tout autre insecte stp haha). **Sarah.S**, **Axel**, on m'a toujours dit que la dernière année de thèse était la plus compliquée, mais ponctuée de tous nos fous rires, nos nombreuses petites blagues (entre nous ou aux dépens des autres hahaha), nos tentatives de déco du laboratoire que ce soit la porte de l'office of joy (parfois office of sadness selon l'humeur du jour) ou bien d'autres endroits que je ne citerais pas ici, et surtout de nos joyeuses pauses goûter (pouvant aller des cookies de JPR aux chips XXL d'Alexandra), elle a été tellement plus facile !! **Sarah**, je suis vraiment heureuse que tu sois arrivée dans l'équipe avant mon départ du laboratoire et que nous ayons pu développer cette si belle amitié ! On se retrouve sur tellement de points que j'ai parfois l'impression qu'on se connaît depuis toujours ! Merci pour tout ! **Axel**, un grand merci

pour ta constante bonne humeur et tes blagues toujours plus drôles les unes que les autres ! Quelle brillante idée de la part de Laurent de nous avoir mis dans le même bureau ! Cela a grandement facilité ma dernière année de thèse ! Bon courage pour la suite de ta thèse, plus que 3 ans, ça va bien se passer hahaha ! Merci à vous deux pour votre soutien et pour avoir souvent été mes complices de craquage (PS : c'est quand le prochain Berliner/Bill's Burger ?). Cette dernière année au laboratoire n'aurait pas été la même sans vous, notre trio va me manquer !

C'est avec la plus grande sincérité que je vous souhaite à toutes et à tous le meilleur pour la suite ! Que vos chemins soient parsemés de réussites, de bonheur, et d'épanouissement autant personnel que professionnel. Merci pour cette expérience partagée, je m'estime chanceuse d'avoir été si bien entourée. Au plaisir de se retrouver très bientôt !

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse... Un grand merci à la plateforme CERVO, en particulier à **Safa** – merci pour tous tes gentils messages et tes nombreux encouragements dans cette dernière ligne droite, mais également à **Gersende, Céline** et **Khadi**. Vous avez toutes été d'une extrême bienveillance depuis mon arrivée à Lyon Sud pour mon stage de master 1 jusqu'à aujourd'hui. Merci ! Un grand merci à **Bruno Tesson** pour toutes les analyses bio-informatiques que tu as réalisé pour moi. Cela m'a considérablement aidé et m'a laissé du temps pour me concentrer pleinement sur le modèle organoïde. Merci aux **Drs. Pierre Milpied, Nicolas Aznar** et **Boris Guyot** pour vos conseils avisés et votre aide lors de mes comités de suivi de thèse.

Enfin, je tiens à remercier mes amis de longue date, dont l'amitié a su résister au passage des années... Un grand merci à **Hana** pour toutes les années mémorables que nous avons passé ensemble depuis notre plus tendre enfance. **Nawel**, les deux années de médecine que nous avons partagé ensemble ont probablement été à la fois les meilleures et les pires années de ma vie. J'en rigole encore en y repensant ! Merci pour tout, les années passent mais notre amitié reste intacte. Je tiens également à remercier mes copinettes **Sonia** et **Sandy**. Bien que nos chemins aient pris des directions différentes après le master 1, nous nous sommes toujours soutenues dans les moments les plus importants. J'ai hâte qu'on se revoie aussi souvent

qu'avant ! Enfin, un grand merci à **Kevin** pour les snaps tous aussi drôles les uns que les autres et pour ton soutien depuis que nous nous connaissons.

Il m'est bien évidemment impossible de clôturer ces remerciements sans mentionner les membres les plus importants de ma vie, ma famille, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible... **A ma maman.** Il est difficile de mettre des mots sur l'immense reconnaissance que je ressens envers toi. Bien au-delà de ces quatre années de thèse, tu as toujours été là, me soutenant constamment, m'épaulant, et créant les conditions optimales pour que je puisse travailler. Tu es ma plus grande source de motivation, et ta présence et ton amour inconditionnels ont été le pilier qui a guidé chacune des étapes de mon parcours. C'est grâce à toi que j'en suis là aujourd'hui – merci pour les encouragements, les conseils avisés, les nombreuses attentions, les petits plats réconfortants, qui m'ont donné la force de continuer malgré les difficultés. Merci d'avoir été si patiente avec moi, d'avoir partagé toutes mes joies et mes peines et d'avoir écouté chacune de mes histoires, aussi farfelues soient-elles, jour après jour. Ce travail ne m'appartient pas pleinement – aujourd'hui, je le partage avec toi, car sans ton soutien inestimable, je n'aurais pas pu aller jusqu'au bout. Je t'aime infiniment. **A mes frères, Hichem et Nedjm-Eddine.** Les relations entre frères et sœur peuvent parfois être compliquées, mais entre nous trois, cela n'a jamais été le cas. J'ai toujours senti que notre complicité allait bien au-delà des liens familiaux. Malgré tout ce que nous avons traversé cette année, nous avons réussi à rester unis, et votre soutien tout au long de cette thèse a été inestimable ! Merci d'avoir toujours été là pour moi – que ce soit pour discuter, rigoler ou pour vous déplacer pour venir me chercher quand il n'y avait plus de trains... Je me rends compte de la chance que j'ai d'avoir des frères aussi géniaux que vous !! Un merci tout particulier à mon petit frère pour toutes les soirées mémorables où, tard le soir, nous passions du temps à regarder les dernières vidéos de Squeezie ou à enchaîner les épisodes d'animés – ces moments ont toujours été si précieux pour moi ! Un immense merci à vous trois pour m'avoir soutenu tout au long de ma scolarité, même pendant les moments où j'étais difficile haha. Je vous aime tant ! En tant que grande fan de mes chats, je m'en voudrais de ne pas glisser un petit mot pour mon petit bébé **Tagada** (que j'ai depuis maintenant plus de 11 ans !) et pour le petit nouveau de la famille **Kyubi** (c'est dire le niveau de fan-attitude des animés haha). Les voir m'attendre chaque soir devant la porte de notre appartement a tellement réchauffé mon cœur ! **A mes**

grands-parents, et plus particulièrement mon grand-père qui n'est plus là aujourd'hui pour partager avec moi cette réussite que nous attendions tant. Au-delà d'être mon grand-père, tu as toujours occupé une place spéciale dans mon cœur et je t'ai toujours considéré comme mon papa. Merci de m'avoir traité avec autant d'amour et de m'avoir considéré au même niveau que tes propres filles. J'aurais tellement aimé que tu sois là aujourd'hui et avoir plus de temps avec toi... Merci à ma grand-mère d'avoir toujours été là pour moi malgré la distance, pour son inquiétude constante quand je rentrais tard le soir. Merci à tous les deux pour l'amour et le soutien inconditionnel que vous m'avez apporté. Un grand merci au reste de ma famille, merci à toutes mes tantes, mes oncles, mes cousins/cousines d'avoir toujours cru en moi – mention spéciale à ma petite cousine **Boutheina** (plus si petite maintenant !) pour tout le soutien que tu m'as apporté ces derniers mois ! J'ai hâte de pouvoir vous voir tous très bientôt ! **Idriss**, mes remerciements ne sauraient être complets sans te remercier. Notre rencontre, il y a maintenant deux ans, a chamboulé ma petite vie et depuis, c'est comme si l'on se connaissait depuis toujours ! Merci pour tes encouragements, toutes les petites attentions, ton soutien et ton amour indéfectible qui ont joué un rôle majeur dans chacune de mes réussites. Tu as toujours été adorable et compréhensif lorsque la thèse prenait le dessus sur la plupart de nos conversations, merci d'avoir écouté sans broncher, haha. Merci également d'avoir cru en moi lorsque je traversais des moments de doute, tu as toujours su trouver les mots justes pour me pousser à aller de l'avant ! Merci pour tous les moments précieux que nous avons partagé ensemble, j'ai hâte de voir ce que l'avenir nous réserve.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	13
LISTE DES ABREVIATIONS.....	14
RESUME.....	17
INTRODUCTION	18
CHAPITRE 1 : LE LYMPHOME FOLLICULAIRE	19
1. Généralités.....	19
1.1. Epidémiologie du lymphome folliculaire	19
1.2. Présentation clinico-biologique du lymphome folliculaire	21
1.3. Diagnostic du lymphome folliculaire	24
1.4. Entités appartenant à la famille du lymphome folliculaire.....	27
1.5. Stratégies thérapeutiques dans le lymphome folliculaire	27
2. La genèse du lymphome folliculaire.....	29
2.1. Le développement des cellules B dans les organes lymphoïdes	29
2.2. Les phénomènes d'exclusion allélique et d'exclusion isotypique.....	32
2.3. La migration des cellules B immatures de la moelle osseuse aux organes lymphoïdes secondaires	33
2.3.1. Les cellules auto-réactives	33
2.3.2. La maturation des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires	34
2.3.3. Les centres germinatifs	35
2.3.3.1. <i>La différenciation cellulaire au sein du centre germinatif.....</i>	<i>36</i>
2.3.3.1.1. <i>Le processus d'hypermutation somatique.....</i>	<i>36</i>
2.3.3.1.2. <i>La commutation isotypique.....</i>	<i>37</i>

2.3.3.1.3. <i>Le single-cell RNA-seq a permis l'identification de multiples sous-populations au sein du centre germinatif</i>	38
2.3.3.2. <i>Les programmes moléculaires à l'origine de la réaction se produisant dans le centre germinatif</i>	39
2.3.3.3. <i>La différenciation terminale</i>	40
2.4. Le lymphome folliculaire, une pathologie dérivant du centre germinatif	41
2.4.1. La translocation t(14;18), le premier hit oncogénique du lymphome folliculaire.....	41
2.4.2. L'expression constitutive de la protéine BCL-2 confère un avantage de survie aux cellules t(14;18) ⁺ dans le centre germinatif mais ne suffit pas à l'induction du lymphome folliculaire	42
2.4.3. Le paradoxe allélique, une caractéristique du lymphome folliculaire.....	42
2.4.4. Le gène BCL-6 joue un rôle dans le blocage des centrocytes dans le centre germinatif	43
2.4.5. Les altérations génétiques à l'œuvre dans le lymphome folliculaire	44
2.5. Le rôle du microenvironnement dans le lymphome folliculaire.....	47
2.5.1. Le microenvironnement tumoral exerce une activité antitumorale sur les cellules de lymphome folliculaire.....	48
2.5.1.1. <i>Les cellules lymphoïdes cytotoxiques permettent l'élimination des cellules tumorales</i>	48
2.5.1.2. <i>La dualité des macrophages associés aux tumeurs (TAMs)</i>	49
2.5.2. ... tout en contribuant à l'échappement des cellules de lymphome folliculaire au microenvironnement antitumoral	50
2.5.2.1. <i>Les cellules tumorales déjouent l'activité antitumorale des cellules lymphoïdes cytotoxiques</i>	50
2.5.2.2. <i>Les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Tfhs) favorisent la survie des cellules tumorales</i>	51

2.5.2.3. <i>La polyvalence des cellules stromales lymphoïdes, de l'activité pro-tumorale à l'organisation spatiale de la niche tumorale</i>	52
2.5.2.4. <i>La matrice extracellulaire et ses composants, les grands oubliés du lymphome folliculaire</i>	53

CHAPITRE 2 : L'ETUDE DES CELLULES PRIMAIRES DE LYMPHOME FOLLICULAIRE – VERS DES MODELES DE CULTURE CELLULAIRE DE PLUS EN PLUS COMPLEXES..... 56

1. Etat de l'art : les modèles communément utilisés dans l'étude du cancer 56

1.1. La culture cellulaire en deux dimensions (2D).....	57
1.1.1. Vue d'ensemble de la culture 2D, avantages et inconvénients	57
1.1.2. L'optimisation de la culture 2D, une nécessité pour perpétuer l'emploi de ce modèle.....	58
1.1.3. La place de la culture 2D dans les hémopathies malignes	59
1.2. Le modèle murin, fidèle représentant de l'expérimentation animale <i>in vivo</i>	62
1.2.1. Les modèles murins syngéniques.....	62
1.2.2. Les modèles murins génétiquement modifiés (GEMMs)	63
1.2.3. Les modèles murins xéno greffés.....	64
1.2.4. Les modèles murins humanisés	65

2. La transition vers la culture cellulaire en trois dimensions (3D) 66

2.1. L'auto-organisation cellulaire, un processus ancestral immuable.....	67
2.2. Les différents modèles de culture 3D.....	70
2.2.1. Les modèles sphéroïdes	70
2.2.1.1. <i>Les sphéroïdes tumoraux multicellulaires (MCTS)</i>	71
2.2.1.2. <i>Les tumorosphères</i>	74
2.2.1.3. <i>Les sphéroïdes tumoraux dérivés de tissus (TDTS)</i>	76
2.2.1.4. <i>Les sphéroïdes multicellulaires organotypiques (OMS)</i>	77

2.2.2.	Le modèle organoïde	78
2.2.2.1.	<i>Les fondements du modèle organoïde.....</i>	78
2.2.2.2.	<i>Les organoïdes dérivés de patients (PDO)</i>	80
2.2.3.	La bio-impression 3D.....	82
2.2.4.	Le modèle d'organe sur puce (« Organ-on-Chip »).....	84
3.	Quelles sont les applications de la culture 3D?	89
3.1.	Les tumeurs solides cancéreuses, les élues de la culture 3D	89
3.2.	L'avènement de la culture 3D en hématologie	92
3.2.1.	Les modèles mimant l'environnement médullaire	93
3.2.2.	Les modèles mimant les organes lymphoïdes secondaires	97
3.2.2.1.	<i>L'adaptation du modèle sphéroïde aux cellules de lymphomes.....</i>	98
3.2.2.2.	<i>L'application du modèle d'organe sur puce aux cellules de lymphomes ...</i>	102
3.2.2.3.	<i>Les applications du modèle organoïde</i>	104
3.2.2.3.1.	<i>Les modèles organoïdes qui imitent la réaction du centre germinatif</i>	104
3.2.2.3.2.	<i>Adaptation du modèle organoïde aux cellules de lymphomes</i>	107
	OBJECTIFS DE LA THESE	111
	RESULTATS	114
	ARTICLE 1	115
	ARTICLE 2	147
	DISCUSSION & CONCLUSION	187
	REFERENCES	200

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Diagramme représentant la fréquence relative des lymphomes à cellules B.....	20
Figure 2. Exemples représentatifs de LF de bas grade (A) et de haut grade (B), biopsies colorées à l'hématoxyline-éosine.....	25
Figure 3. Exemple représentatif d'un LF de bas grade, biopsie colorée à l'hématoxyline-éosine.	26
Figure 4. Les cellules souches hématopoïétiques génèrent les cellules du système immunitaire	30
Figure 5. Développement des cellules B à partir des progéniteurs hématopoïétiques	32
Figure 6. Représentation schématique tridimensionnelle d'un ganglion	35
Figure 7. Représentation schématique de la réaction qui se produit au sein du CG	37
Figure 8. Interactions entre les cellules B tumorales de LF et les cellules du microenvironnement tumoral	54
Figure 9. Représentation schématique du processus de trans-présentation	60
Figure 10. Processus de coopération entre les macrophages associés à la tumeur et les Tfh en vue d'activer les cellules B tumorales	61
Figure 11. Chronologie retraçant le développement de la culture cellulaire 3D.....	69
Figure 12. Représentation schématique d'un sphéroïde	71
Figure 13. Représentation schématique de la technique de recouvrement liquide.....	72
Figure 14. Représentation schématique de la méthode de la goutte suspendue	73
Figure 15. Représentation schématique de la méthode d'encapsulation à base d'alginate	74
Figure 16. Représentation schématique des étapes nécessaires à la formation de sphéroïdes tumoraux dérivés de tissus (TDTS).....	77
Figure 17. Représentation schématique des étapes nécessaires à la formation de sphéroïdes multicellulaires organotypiques (OMS)	78
Figure 18. Représentation schématique des étapes nécessaires à la formation d'organoïdes	80
Figure 19. Les trois grandes catégories de la bio-impression 3D.....	82
Figure 20. Représentation schématique des étapes nécessaires à la création d'une puce microfluidique.....	85
Figure 21. Dispositif microfluidique basé sur l'encapsulation cellulaire au sein de microsphères d'alginate	87
Figure 22. Exemple de système de perfusion couplé à un biomatériau fait d'hydroxyapatite.	95
Figure 23. Modèle d'organe sur puce ayant permis l'étude du LBDGC	103
Figure 24. Représentation schématique de la formation des hydrogels permettant la formation d'organoïdes	105
Tableau 1. Les différents index pronostiques utilisés dans le LF	22
Tableau 2. Récapitulatif des différents modèles de culture actuellement utilisés dans la recherche en cancérologie	88
Tableau 3. Récapitulatif des études menées sur des cellules primaires de lymphome	109

LISTE DES ABREVIATIONS

ABREVIATIONS DE GENES ET PROTEINES

AID ou AICDA : Activation-Induced cytidine Deaminase	HLA-DR : Major Histocompatibility Complex, Class II, DR
ARID1A : AT-Rich Interaction Domain 1A	HS1 : Hematopoietic lineage cell-specific protein 1
ATM : ataxia-telangiectasia mutated protein kinase	HVEM : Herpes Virus Entry Mediator A
ATR : ATR Serine/Threonine Kinase	IFN-γ : Interferon Gamma
BACH2 : Basic Leucine Zipper Transcription Factor 2	IL : Interleukin
BAFF : B cell-activating factor	IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4
BAK : BCL2 Antagonist/Killer	IRF8 : Interferon Regulatory Factor 8
BANK1 : B Cell Scaffold Protein with Ankyrin Repeats 1	JAK : Janus Kinase
BATF : Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor	KIT : KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase
BAX : BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator	KMT2D : Lysine Methyltransferase 2D
BCL-2 : B Cell Lymphoma-2	LDH : Lactate Dehydrogenase
BCL-6 : B Cell Lymphoma-6	LIF : Leukemia Inhibitory Factor
BLIMP1 : B-lymphocyte- induced maturation protein 1	LLT1 : Lectin-Like Transcript 1
BTLA : B- and T-lymphocyte attenuator	MALT1 : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation protein 1
CAM : Cell-Adhesion Molecule	MAP2K1 : Mitogen-Activated Protein Kinase 1
CARD11 : Caspase Recruitment Domain Family Member 11	MEF2B : Myocyte Enhancer Factor 2B
CCL : C-C Motif Chemokine Ligand	MEF2B : Myocyte Enhancer Factor 2B
CCR : C-C Motif Chemokine Receptor	MI2 : Menin-MLL Inhibitor
CDKN : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor	MICA/B : MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A/B
c-MYC : MYC Proto-Oncogene	MLL2 : Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia Protein 2
COMPASS : COMplex of Proteins ASSociated with Set1	NF-κB : Nuclear Factor Kappa B
CREBBP : CREB-Binding Protein	NKG2D/KLRK1 : Killer Cell Lectin Like Receptor K1
CXCL : C-X-C Motif Chemokine Ligand	PAX5 : Paired box protein 5
CXCL : C-X-C Motif Chemokine Ligand	PD-1 : Programmed Cell Death 1
CXCR : C-X-C Chemokine Receptor	PD-L1 : Programmed Death Ligand 1
DC-SIGN : Dendritic Cell – Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin	PRC2 : Polycomb Repressor Complex 2
E2A ou TCF3 : Transcription Factor 3	PRDM1 : PR/SET Domain 1
EBF : Early B Cell Factor 1	RAG : Recombination-Activating Genes
EGF : Epidermal Growth Factor	SESN1 : Sestrin 1
EP300 : E1A Binding Protein P300	SET : SET Nuclear Proto-Oncogene
ETS1 : ETS Proto-Oncogene 1, Transcription Factor	SMA : Alpha Smooth Muscle Actin
EZH2 : Enhancer of Zeste Homologue 2	STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
FAC : 5-FU, Adriamycine et Cyclophosphamide	TADs : Topologically associating domains
FGF : Fibroblast Growth Factor	TGF-β : Transforming Growth Factor Beta 1
FLT3 : Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3	TLR : Toll Like Receptor
FOXO1 : Forkhead Box O1	TNFRSF14 : Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 14
FOXP3 : Forkhead Box P3	TNF-α : Tumor Necrosis Factor
	TP53 : Tumor Protein P53

GPR : G protein-coupled receptor
HAT : Histone Acetyltransferase
HDAC : Histone Deacetylase
HER : Epidermal growth factor receptor 2
HIF1 α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VLA-4 : Very Late Activation Protein 4
VPREB1 : V-Set Pre-B Cell Surrogate Light Chain 1
XBP1 : X-Box Binding Protein 1

AUTRES ABREVIATIONS

2D : 2 Dimensions
3D : 3 Dimensions
ABC : Activated-B-cell
ADCP : Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADSC : Adipocyte-Derived Stem Cells
ATP : Adenosine triphosphate
BCR : B Cell Receptor
CAFs : Cancer-associated fibroblasts
CAR-T : Chimeric Antigenic Receptor - T
Cas9 : CRISPR associated protein 9
CD : Cluster de Différenciation
CG : Centre Germinatif
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cyclophosphamide
CPCs : Cellules Progénitrices Communes
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSC : Cellules Souches Cancéreuses
CSF : Colony Stimulating Factor
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
DLP : Digital Light Processing
DNase : Désoxyribonucléase
DNR-AraC : Daunorubicine-Cytarabine
DTT : Dithiothreitol
EBV : Epstein-Barr Virus
ESC : Embryonic stem cells
FDA : Food and Drug Administration
FDCs : Follicular Dendritic cells
FLIPI : Follicular Lymphoma International Prognostic Index
FRCs : Fibroblastic Reticular Cells
GA101 : Obinutuzumab
GCB : Germinal Center B-cell
GEMMs : Genetically Modified Mouse Models
HEV : High Endothelial Venules
HSPCs : Hematopoietic stem/progenitor cells
IC50 : half-maximal inhibitory concentration
Ig : Immunoglobuline
iPSC : Induced Pluripotent Stem Cells

LBDGC : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules
LF : Lymphome folliculaire
LLC : Leucémie Lymphocytaire Chronique
LNH : Lymphomes Non Hodgkiniens
LSC : Leukemic Stem Cells
MAL : Maléimide
MALC : Multicellular Aggregates of Lymphoma Cells
MCTS : Multicellular Tumor Spheroids
MDM : Monocyte-Derived Macrophages
MEC : Matrice extracellulaire
MLD : Malignant Lymphoid Disease
MMPs : Matrix metalloproteinases
MPN : Myeloproliferative Neoplasia
MSCs : Mesenchymal Stem Cells
NK : Natural Killer
NP : 4-hydroxy-3-nitrophénylacétyl
NSG : NOD Scid Gamma mouse
OMS (2) : Organotypic Multicellular Spheroids
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PDMS : Polydiméthylsiloxane
PDO : Patient-derived organoids
PDX : Patient-derived xenografts
PEG : Polyethylene glycol
POD24 : Progression of Disease within 24 months of front-line treatment
PSC : Pluripotent Stem Cells
R-CHOP : Rituximab, Cyclophosphamide, Hydroxydriamycine, Oncovin, Prednisolone
SCF : Stem Cell Factor
scRNA-seq : Single Cell RNA sequencing
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SPARC : Secreted Protein Acidic and Cystein Rich
SVF : Sérum de veau foetal
TADs : Topologically associating domains
TAMs : Tumor-Associated Macrophages
TCR : T Cell Receptor
TDTS : Tissue-Derived Tumor Spheroids
TFHs : T Follicular Helper cells
TFRs : T Follicular Regulatory cells
Tregs : Regulatory T cells

ISFN : In Situ Follicular Neoplasm
ITP : Immune Thrombocytopenia
LAIV : Live Attenuated Influenza Vaccine
LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde

TSC : Tonsil Stromal Cells
ULA : Ultra Low Attachment
WT : Wild Type

RESUME

Le lymphome folliculaire (LF) est un lymphome dérivé du centre germinatif (CG), dont les cellules représentent la contrepartie néoplasique des cellules B du CG. Il est composé d'une niche de cellules tumorales et d'un microenvironnement spécifique à la tumeur. Ce dernier contribue à l'hétérogénéité biologique observée entre les patients mais également au niveau intra-tumoral chez un même patient, notamment par le biais des nombreux signaux fournis par les cellules du microenvironnement tumoral et qui sont spécifiques à chaque tumeur. Il joue par ailleurs un rôle crucial dans la progression de la maladie mais surtout dans la résistance à l'immunochimiothérapie. L'étude du LF est rendue difficile en raison d'un manque de modèles pré-cliniques *in vitro* ou *in vivo* permettant d'étudier l'efficacité des traitements couramment utilisés dans le LF, comme le R-CHOP, de prédire la résistance des tumeurs de patients au traitement mais surtout d'investiguer les mécanismes impliqués dans cette résistance. Pour pallier ce manque de systèmes expérimentaux, nous avons adapté un modèle organoïde à la culture de cellules primaires de patients atteints de LF. Ce modèle 3D organoïde dérivé de patients atteints de LF a permis de cultiver les cellules tumorales de LF et de maintenir leur survie jusqu'à 3 jours de culture en l'absence de traitement. Des biopsies de patients atteints de LF (bons ou mauvais répondeurs au R-CHOP selon la progression dans les 24 mois après initiation du traitement) ont été cultivées en 3D puis traitées par R-CHOP afin d'évaluer l'aptitude du modèle organoïde à prédire la réponse des patients et à corrélérer avec la réponse clinique de ces patients. A l'inverse de la culture 2D, le modèle 3D organoïde parvient à prédire la réponse clinique *in vivo*. Nous avons par ailleurs mis en évidence que la résistance des patients à la chimiothérapie au sein du modèle 3D organoïde est corrélée à une sous-population T spécifique, les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (T_{fh}s). En vue d'investiguer cette hétérogénéité inter-patients, des données de single-cell RNA-seq ont été exploitées afin de corrélérer dans la mesure du possible les mécanismes de chimiorésistance chez les patients qui ne répondent pas au traitement mais également d'identifier à l'échelle « single-cell » des signatures transcriptomiques obtenues lors du profilage de l'expression génique d'échantillons de LF provenant de l'essai clinique PRIMA.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LE LYMPHOME FOLLICULAIRE

1. Généralités

Les lymphomes sont des tumeurs malignes du système immunitaire qui représentent le 8^{ème} cancer le plus répandu dans l'Union Européenne¹. Ils englobent un groupe hétérogène de cancers, ayant chacun des caractéristiques histologiques et cliniques qui lui sont propres, ce qui rend leur diagnostic difficile. La classification des lymphomes est complexe et en perpétuelle évolution. En effet, il est référencé plus de 80 sous-types différents dans la dernière classification des hémopathies lymphoïdes de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)². Bien que les lymphomes se développent généralement dans les ganglions lymphatiques, ils peuvent survenir dans presque tous les tissus en raison de l'hétérogénéité fonctionnelle du tissu lymphoïde. On distingue néanmoins les hémopathies lymphoïdes qui se développent à partir de cellules B de celles se développant à partir de cellules T. Cliniquement, on différencie les lymphomes d'évolution lente, dits indolents dont fait partie le lymphome folliculaire (LF), et les lymphomes qui évoluent rapidement, dits agressifs comme le lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC).

1.1. Épidémiologie du lymphome folliculaire

Le LF est la deuxième entité de lymphome la plus fréquente après le LBDGC, ce qui représente environ 20% de tous les nouveaux diagnostics de lymphomes non hodgkiniens (LNH)(*Figure 1*)^{3,4}. Il se manifeste habituellement chez les adultes âgés de 50 ans, avec un âge médian de 65 ans au moment du diagnostic⁵. Le LF est un lymphome indolent, dépeint chez la plupart des patients par une progression lente de la maladie, un taux de réponse aux traitements élevé et une survie globale allant de 10 à 15 ans⁶⁻⁸. Cette dernière s'est nettement améliorée au cours de ces deux dernières décennies, en partie grâce à l'introduction du rituximab, un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule de surface CD20 mais aussi par la combinaison du rituximab avec une polychimiothérapie CHOP (cyclophosphamide, hydroxyadriamycine, oncovin et prednisolone) ou avec un agent anticancéreux alkylant comme

la bendamustine⁹. Plus récemment, un autre anticorps monoclonal anti-CD20, l'obinutuzumab, combiné à la chimiothérapie CHOP ou à la bendamustine a démontré une amélioration de la survie sans progression par rapport au R-CHOP, notamment chez les patients en rechute ou réfractaire au rituximab¹⁰.

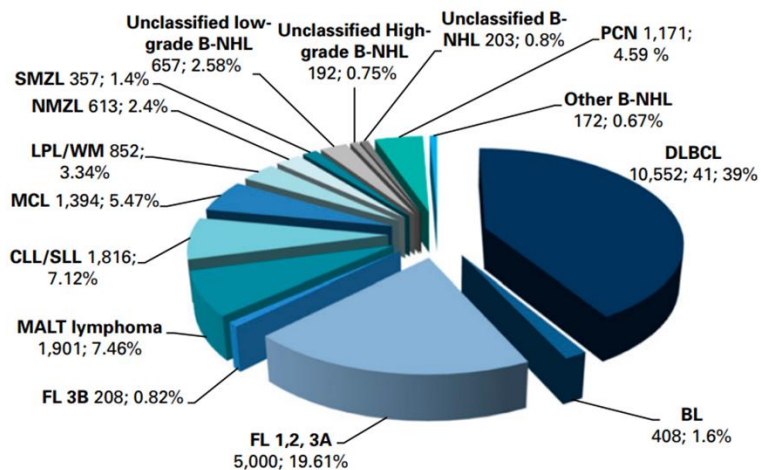


Figure 1: Diagramme représentant la fréquence relative des lymphomes à cellules B (d'après Laurent et al., J Clin Oncol., 2017⁴).

Il a été mis en évidence que l'incidence du LF contraste considérablement entre les régions géographiques, avec une incidence plus élevée dans les pays développés comme les Etats-Unis, l'Australie, l'Afrique du Sud et les pays d'Europe occidentale¹¹. En 2018, une étude de Santé Publique France a rapporté que l'incidence du LF en France était de 3 000 à 4 000 nouveaux cas par an¹². Par ailleurs, il a été observé que le risque de développer un LF est plus élevée chez les personnes d'origine asiatique nées aux Etats-Unis que chez celles nées en Asie, ce qui suggère un rôle des facteurs environnementaux dans la pathogénèse du LF¹³. En effet, bien qu'ils ne soient clairement pas identifiables au moment du diagnostic, les données de la littérature suggèrent que le développement du LF pourrait en partie être la résultante de facteurs environnementaux. Afin d'étayer ces propos, cette étude rapporte l'évaluation de la probabilité quant au développement d'un LNH chez les agriculteurs utilisant des pesticides par rapport à ceux qui n'en utilisent pas. Il s'avère alors que chez les éleveurs usant de pesticides, le dépistage de la translocation t(14;18), premier hit oncogénique retrouvé chez environ 90% des patients atteints de LF⁸, augmente le risque de développer un lymphome¹⁴. Ce risque semble également plus important chez des individus fumeurs par rapport aux non-fumeurs,

lorsque tous deux sont porteurs de la translocation $t(14;18)^{15}$. Concernant les facteurs génétiques, une vaste étude cas-témoin menée par le consortium InterLymph, comprenant 3530 cas de LF et 22639 témoins, a montré que les individus ayant des antécédents familiaux de LNH avaient un risque deux fois plus élevé de développer un LF que les individus n'ayant pas d'antécédents familiaux⁵. Par ailleurs, les parents au premier degré de patients atteints de LF ont quatre fois plus de risque de développer un LF¹⁶. Afin de mieux comprendre la susceptibilité héréditaire dans le LF, de nombreuses études génomiques ont été menées au cours de ces dernières années et ont permis l'identification de variants nucléotidiques (également appelés des polymorphismes nucléotidiques uniques ou SNPs) retrouvés près de certains oncogènes avérés ou potentiels (*BCL2*, *BCL6*, *CXCR5*, *ETS1*...) ou dans des gènes codants les molécules de présentation antigénique comme les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II et associés à un risque plus élevé de développer un LF¹⁷⁻²⁰. Néanmoins, les données sont souvent contradictoires d'une étude à l'autre, ne concernent pas spécifiquement le LF mais portent sur les LNH dans leur ensemble, ce qui en limite les conclusions.

1.2. Présentation clinico-biologique du lymphome folliculaire

Les patients atteints de LF présentent généralement une lymphadénopathie asymptomatique, qui évolue depuis plusieurs mois ou années et qui est généralement non douloureuse. Bien que dans environ 90% des cas, il n'y a pas d'altération de l'état général de santé du patient, des symptômes dits « symptômes B » comme de la fièvre, des sueurs nocturnes ainsi qu'une perte de poids supérieure ou égale à 5% du poids habituel peuvent être observés. La confirmation du diagnostic de LF nécessite dans un premier temps une biopsie ganglionnaire pour une analyse anatomopathologique. Une biopsie ostéo-médullaire, un myélogramme ainsi qu'un hémogramme permettent par ailleurs d'évaluer la dissémination du lymphome qui peut avoir atteint d'autres organes comme la moelle osseuse chez au moins 70% des cas, la rate dans 20% des cas ou encore la circulation sanguine dans 5 à 10% des cas^{8,21}. Afin d'identifier les patients ayant une évolution clinique similaire, des facteurs pronostiques ont été identifiés dans le cas du LF avec parmi eux les index internationaux FLIPI 1 et 2 (Indice de Pronostique International du Lymphome Folliculaire) qui intègrent 5 facteurs pronostiques (parmi eux un fort taux de lactate déshydrogénase (LDH), une anémie dans environ 20% des

cas et une élévation de la bêta-2 microglobuline dans 40% des cas) mais dont l'utilisation n'est pas toujours pratiquée en routine (*Tableau 1*)^{22,23}. Plus récemment, un score pronostique basé sur l'utilisation de deux facteurs a été proposé, le score PRIMA-Pronostic Index (PRIMA-PI) (*Tableau 1*)²⁴. Par ailleurs, certains scores nouvellement proposés rapportent l'utilisation du statut mutationnel de 7 gènes (*EZH2, ARID1A, MEF2B, EP300, FOXO1, CREBBP et CARD11*) associé à l'index FLIPI ou l'utilisation d'une stratégie pronostique alternative basée sur l'expression de 23 gènes dans l'optique de prédire la réponse des patients aux traitements d'immunochimiothérapie^{25,26}.

Tableau 1: Les différents index pronostiques utilisés dans le LF.

	FLIPI 1	FLIPI 2	PRIMA-PI	m7-FLIPI
Age : > 60	✓	✓		✓
Stade clinique Ann Arbor : III ou IV	✓			✓
Taux d'hémoglobine : < 12 g/dL	✓	✓		✓
Taux de LDH : > limite supérieure à la normale	✓			✓
Nombre de zones ganglionnaires atteintes : > 4	✓			✓
Taux de β 2-microglobuline : > limite supérieure à la normale		✓	✓	
Diamètre du plus gros ganglion : > 6 cm		✓		
Atteinte de la moelle osseuse		✓	✓	
Statut mutationnel (<i>EZH2,</i> <i>ARID1A, MEF2B, EP300,</i> <i>FOXO1, CREBBP et CARD11</i>)				✓

Bien que le traitement R-CHOP soit très efficace et permette d'obtenir une rémission complète chez la plupart des patients, au cours des deux années qui suivent le traitement de première intention, 20% des patients atteints de LF connaissent une progression rapide de la maladie, avec une moins bonne survie globale et un pronostic vital engagé²⁷. Il a été rapporté que les patients dont la maladie évolue présentent des clones tumoraux détectables au moment du diagnostic et qui s'étendent pendant le traitement par immuno-chimiothérapie, suggérant que ces clones présentent des propriétés de résistance au traitement²⁸. Il semblerait par ailleurs que, comparé aux patients connaissant une progression tardive du LF, ceux qui connaissent une progression précoce présentent un plus grand nombre d'altérations génétiques, parmi lesquelles figurent notamment *BACH2*, *BTG2*, *RHOH* et *SOCS1*²⁸. L'évolution clinique du LF est très hétérogène, ponctuée de multiples épisodes de rechutes et pouvant connaître une transformation histologique en un lymphome plus agressif comme le LBDGC⁸, ce qui représente environ 2 à 3% de cas chaque année^{5,29,8}. L'hétérogénéité biologique inter-patients du LF a notamment été mise en évidence par l'équipe d'Andor et al. par une analyse transcriptomique à l'échelle « single-cell » d'échantillons de patients atteints de LF³⁰. En effet, tandis que les cellules B normales et les sous-types cellulaires du microenvironnement tumoral « clustérisent » ensemble, indépendamment de l'origine de l'échantillon, les cellules tumorales de LF présentent une forte hétérogénéité inter-patients et « clustérisent » séparément^{30,31}. Les différentes mutations et événements oncogéniques accumulés tout au long du développement de chaque tumeur pourraient expliquer cette hétérogénéité inter-patient. Certaines études ont par ailleurs suggéré l'existence d'une hétérogénéité transcriptionnelle au sein d'un même patient^{30,32,33}. Andor et al. rapportent la présence de divers sous-clones de cellules tumorales B au sein de la même tumeur, suggérant que l'hétérogénéité de l'expression génique dans les cellules tumorales B de LF au sein d'une même tumeur est en partie due à la diversité génomique sous-clonale³⁰. Attaf et al. ont alors démontré que la grande majorité des cellules tumorales B de LF oscillent entre plusieurs états de différenciation autour de l'axe comprenant les cellules B du CG en prolifération et les cellules B à mémoire quiescentes³⁴. Cet axe représenterait la principale source d'hétérogénéité transcriptionnelle intra-patient, qui s'expliquerait par l'implication de facteurs extrinsèques à la cellule fournis par le microenvironnement tumoral, propre à chaque tumeur.

La transformation du LF est généralement identifiée de deux façons : i) sur des signes de progression clinique (évolutions des adénopathies, apparition ou aggravation des symptômes B, augmentation du taux de LDH sérique...) et ii) confirmée sur des caractéristiques histologiques. En effet, la transformation du LF est caractérisée par un remaniement de l'architecture folliculaire, avec une infiltration du ganglion par de grandes cellules tumorales très proliférantes, où persistent des zones de lymphome de bas grade³⁵. La comparaison de cas de LF et de LF transformés a mis en évidence que les patients qui subissent une transformation histologique acquièrent des clones tumoraux rarement retrouvés au moment du diagnostic (<1% des cellules)²⁸. A l'issue de la transformation, le nombre d'anomalies génétiques est plus important, avec une douzaine de gènes fréquemment altérés comme le gène *B2M*, associé à une diminution de l'infiltration des cellules T CD8⁺ ou les gènes *GNA13*, *SIPR2* et *P2RY9*, impliqués dans la dissémination des cellules B du CG²⁸. Par ailleurs, il a été rapporté que des mutations inactivatrices du gène suppresseur de tumeur *TP53* et des mutations activatrices de certains oncogènes comme *c-MYC*²⁸ sont rarement détectées au diagnostic de LF et plus fréquentes dans les cas de LF transformés (25-30% des cas)^{28,36,37}. En raison de son très mauvais pronostic, une alternative quant à la détection précoce de la transformation histologique est le séquençage de l'ADN tumoral circulant^{38,39}, une méthode prometteuse pour identifier la progression de la maladie au moyen de biomarqueurs spécifiques.

1.3. Diagnostic du lymphome folliculaire

En raison de l'hétérogénéité cellulaire et architecturale au sein d'un même ganglion, le diagnostic du LF est basé sur une biopsie chirurgicale du ganglion lymphatique⁴⁰, et plus rarement sur la biopsie d'un autre organe atteint (rate, foie, poumon...). L'architecture ganglionnaire d'un LF est facilement identifiable par le biais d'un examen anatomopathologique, car la maladie modifie progressivement l'architecture normale des ganglions lymphatiques. Contrairement aux follicules normaux, les follicules néoplasiques sont composés d'un nombre plus ou moins élevé de centroblastes et de centrocytes, qui sont respectivement des cellules de grandes tailles possédant un ou plusieurs nucléoles et des cellules plus petites ayant un noyau plus petit et sans nucléole. Bien que la classification basée sur le grade histologique ne soit plus obligatoire depuis 2022², le diagnostic de LF a longtemps

pris en compte le grade histologique ce qui a permis de classer de nombreux patients atteints de LF en fonction du nombre de centroblastes par champ de microscopie (objectif x40)⁴¹. Les LF de grade 1 (de 0 à 5 centroblastes par champ microscopique) et de grade 2 (de 6 à 15 centroblastes par champ microscopique) sont les plus fréquents et ne présentent pas de problème diagnostique complexe tandis que les LF de grade 3 (plus de 15 centroblastes par champ microscopique et présence de centrocytes) sont considérés comme une forme agressive du lymphome et par conséquent souvent assimilés à des LBDGC (*Figure 2*)⁴¹. En effet, la détection de plages de grandes cellules permet le dépistage précoce d'une potentielle transformation histologique⁴².

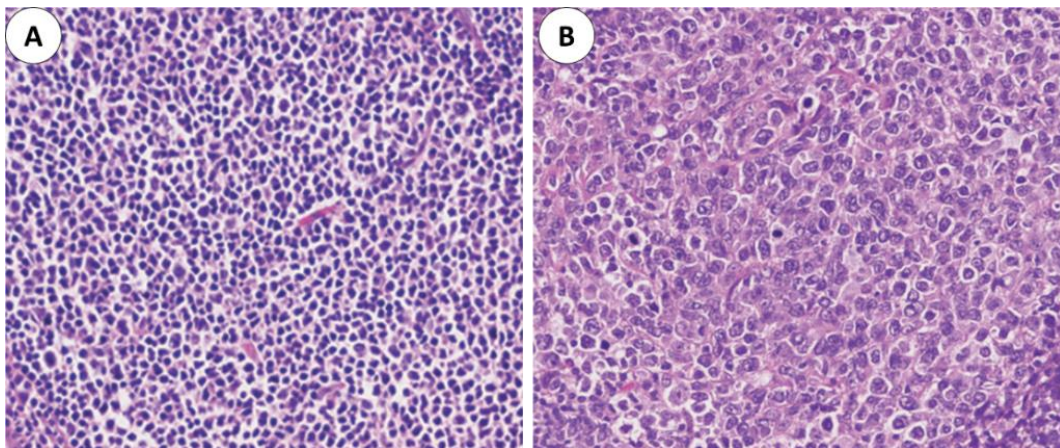


Figure 2: Exemples représentatifs de LF de bas grade (A) et de haut grade (B), biopsies colorées à l'hématoxyline-éosine (d'après Khanlari et Chapman, JPTM, 2022⁴³). (A) Le follicule néoplasique comprend de nombreux centrocytes, avec peu de centroblastes, compatibles avec un LF de grade 1-2. (B) Ce follicule néoplasique est caractérisé par l'absence de centrocytes et par la présence de gros centroblastes, ce qui corrèle avec un LF de grade 3D.

Les cellules de LF sont également identifiables par immunophénotypage, avec l'expression de certains antigènes associés aux cellules B dont CD19, CD20, CD79a, des marqueurs tels que CD10, BCL-6 et BCL-2, communément exprimés par les cellules B du centre germinatif (CG) mais également par les cellules tumorales de LF (*Figure 3*). En effet, d'après leur profil transcriptomique, ces cellules s'apparentent à des cellules B du CG⁴⁴. Pour aller plus loin, Victora et al. ont rapporté des signatures transcriptomiques spécifiques de cellules B normales appartenant à la zone claire et à la zone sombre du CG, obtenues à partir de populations cellulaires triées⁴⁵. En comparant le profil d'expression génique des cellules tumorales de LF à

ces signatures transcriptomiques, il a été proposé que ces cellules ressemblent plus étroitement aux cellules de la zone claire du CG. Ces cellules de LF sont entourées de nombreuses populations cellulaires non tumorales, dont certaines contribuent à la lymphomagénèse mais également à la résistance aux traitements. On retrouve parmi elles les cellules T dont les cellules CD3⁺, les cellules T CD4⁺ folliculaires helper ou Tfh_s, les cellules T CD4⁺ folliculaires régulatrices ou TFR, les cellules stromales et les cellules dendritiques folliculaires ou FDCs, dont nous reparlerons un peu plus loin⁴⁶.

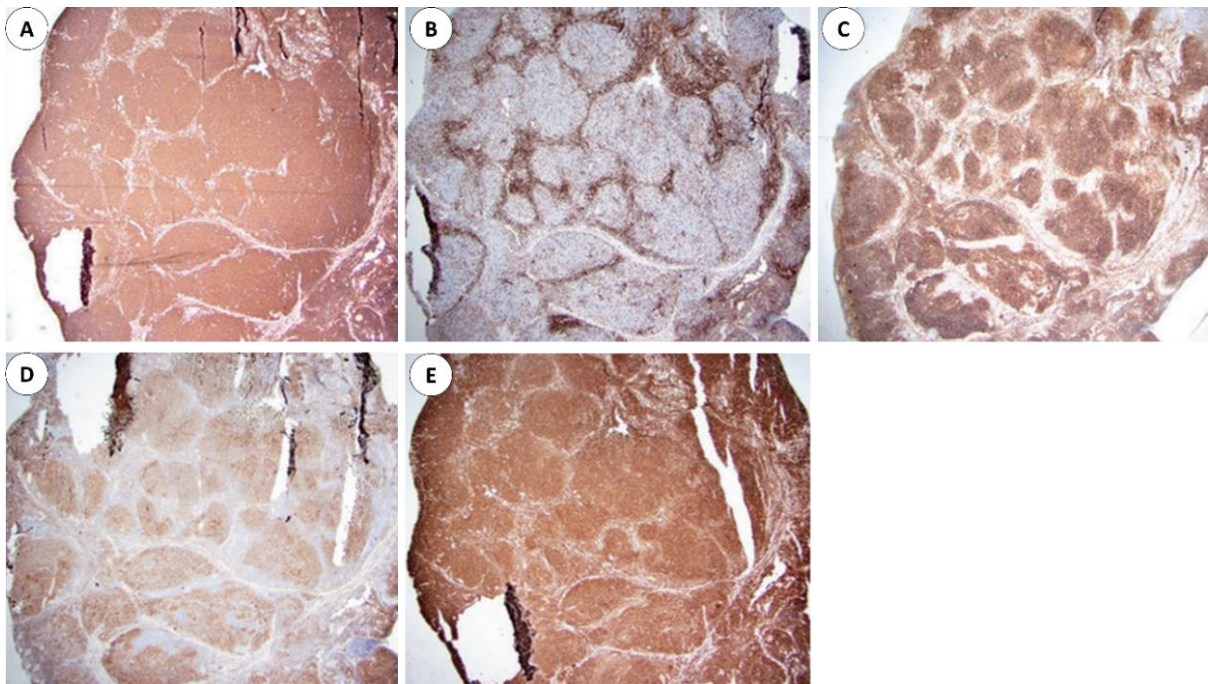


Figure 3: Exemple représentatif d'un LF de bas grade, biopsie colorée à l'hématoxyline-éosine (d'après Khanlari et Chapman, JPTM, 2022⁴³). (A) L'immunomarquage pour le CD20 permet de mettre en évidence les lymphocytes B à la fois dans les follicules néoplasiques et les zones interfolliculaires. (B) L'immunomarquage pour le CD3 montre son accumulation autour des follicules néoplasiques, dans les zones interfolliculaires. (C) L'immunomarquage du CD10 démontre bien l'origine des cellules néoplasiques, à savoir le CG. Les cellules sont fortement positives dans les follicules tandis que les cellules interfolliculaires sont faibles colorées. (D) L'immunomarquage pour BCL-6 démontre la présence de cellules positives dans les follicules néoplasiques, d'origine germinales. (E) L'immunomarquage pour BCL-2 montre une très forte expression des cellules néoplasiques, témoignant de la translocation t(14;18) dans ces cellules.

1.4. Entités appartenant à la famille du lymphome folliculaire

En 2016, des entités spécifiques du LF ont été mises en évidence dans la classification des tumeurs lymphoïdes de l’OMS, sans aucune mise à jour significative dans la 5^{ème} édition de 2022^{2,41}. On retrouve parmi elles, le néoplasme folliculaire *in situ* à cellules B (ISFN), le LF de type duodénal et le LF de type pédiatrique. L’ISFN est une entité qui présente des caractéristiques immunophénotypiques et génétiques similaires à celles du LF, avec la présence de lymphocytes B porteurs de la translocation t(14;18), qui expriment BCL-2 et CD10⁴⁷. L’étude des altérations génétiques dans ce sous-type de LF a mis en évidence très peu d’altérations, laissant penser qu’il s’agit d’un stade de développement très précoce du processus de lymphomagenèse⁴⁸. De plus, il est généralement assez difficile de faire la distinction entre un follicule néoplasique d’ISFN et un CG normal, tant l’architecture du ganglion lymphatique est préservée⁴⁹, ce qui a pour conséquence l’identification fortuite de cette pathologie, avec une prévalence de l’ordre de 2 à 3%⁴⁷. Le LF de type duodénal est caractérisé par des follicules anormaux au niveau de la muqueuse et de la sous-muqueuse, composés de centrocytes et de rares centroblastes⁴⁷. Le profil immunohistochimique de cette pathologie est similaire à celui du LF, avec une forte expression de CD20, CD10 et BCL-2, avec la présence de cellules porteuses de la translocation t(14;18)⁵⁰. Bien que des récives locales soient possibles, les patients ont généralement une excellente survie sans traitement. Le LF de type pédiatrique est quant à lui caractérisé par l’absence de BCL-2 et de la translocation t(14;18)⁵¹. Bien que l’histologie des cellules tumorales fasse état de grandes cellules, évoquant un lymphome de haut grade, le LF de type pédiatrique a un pronostic favorable. La distinction entre ce lymphome et un LF classique a pu se faire grâce à l’étude des altérations génétiques, qui a mis en évidence des gènes fréquemment mutés comme *IRF8*, *TNFRSF14* et *MAP2K1*⁵².

1.5. Stratégies thérapeutiques dans le lymphome folliculaire

Bien que le LF soit une maladie incurable, certaines stratégies thérapeutiques ont montré des résultats prometteurs et sont couramment utilisées en clinique, comme la radiothérapie, l’immunothérapie, la chimiothérapie ainsi que certaines thérapies ciblées. En prenant en considération le caractère indolent du LF, son incurabilité et les nombreux effets

indésirables des traitements utilisés de nos jours, la recommandation pour les patients asymptomatiques, pour lesquels la masse tumorale est faible, est l'abstention thérapeutique combinée à une surveillance rapprochée (« Watch and Wait ») jusqu'à l'apparition des différents « symptômes B »⁵³. Les 20-30% de patients présentant un stade peu avancé de la maladie, de grade 1 ou 2, sont généralement traités par radiothérapie externe avec ou sans immunothérapie ou chimiothérapie systémique, ce qui a pour conséquence d'induire une rémission complète à long terme chez environ 50% des patients^{54,55}. Au moment du diagnostic, 70 à 80% des patients présentent une maladie de stade avancé, de grade 3 ou 4, caractérisée par la présence d'un grand nombre de centroblastes. Ces patients peuvent néanmoins être asymptomatique avec une faible masse tumorale. Dans ces cas-là, l'abstention thérapeutique est souvent considérée jusqu'à ce qu'ils deviennent symptomatiques^{56,57}. Comme cette approche peut être mal vécue par le patient, une stratégie alternative a été mise en place et repose sur le traitement de ces patients avec du rituximab en monothérapie. Il a alors été démontré que l'introduction précoce du traitement retarde la nécessité d'instaurer un traitement ultérieur de 8 ans en moyenne⁵⁸. Les patients qui présentent une forte masse tumorale ainsi que les « symptômes B » sont traités par une chimiothérapie, avec ou sans traitement d'entretien par un anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab ou obinutuzumab)⁵⁹⁻⁶¹. Dans l'optique de remplacer les régimes de chimio-immunothérapies standards par des alternatives moins toxiques, des études menées sur le lénalinomide, un agent immunomodulateur, combiné au rituximab, ont montré des taux de réponse globale élevés chez les patients atteints de LF non traités ou en rechute⁶²⁻⁶⁴. Après le traitement initial, la plupart des patients atteints de LF rechutent ou présentent une progression de la maladie. Une progression précoce, dans les 12 à 24 mois suivant le diagnostic initial ou le début du traitement, est associée à un mauvais pronostic²⁷. Les patients qui rechutent disposent d'un large éventail d'options thérapeutiques parmi lesquels on retrouve des inhibiteurs de la voie PI3K, dont le copanlisib et le duvelisib, qui ont été approuvés aux Etats-Unis pour le traitement du LF⁶⁵⁻⁶⁷. Pour les patients présentant une transformation histologique, un traitement plus intensif peut être envisagé, comme par exemple une transplantation de cellules souches⁶⁸.

Récemment, de nouvelles approches thérapeutiques prometteuses ont été développées. On retrouve parmi elles des médicaments modulateurs épigénétiques comme le tazemetostat, un inhibiteur d'EZH2, qui a récemment montré son efficacité chez des patients

atteints de LF réfractaires ou en rechute et porteurs d'une mutation *EZH2*, avec un taux de réponse global de 69%⁶⁹. En effet, le gène *EZH2* est un gène particulièrement important car requis pour la formation du CG et les mutations somatiques qui affectent ce gène favorisent la transformation tumorale⁷⁰. Le succès des thérapies anti-CD20 a permis l'essor des anticorps bispécifiques, dont le mosunetuzumab, un anticorps qui cible à la fois le CD20 et le CD3 permettant de recruter des lymphocytes T exprimant le CD3 à proximité des lymphocytes B exprimant le CD20 et de former ainsi une synapse immunitaire qui induit l'élimination des cellules tumorales. En effet, il a été mis en évidence que cet anticorps montre une activité prometteuse en clinique chez les patients atteints de LF réfractaires ou en rechute⁷¹. La thérapie par cellules T à récepteur antigénique chimérique (ou CAR-T cells) représente également une approche prometteuse, avec deux CAR-T anti-CD19 approuvés par la FDA américaine pour le traitement des patients atteints de LF réfractaires ou en rechute^{72,73}.

2. La genèse du lymphome folliculaire

Eléments centraux du système immunitaire adaptatif, les cellules B et leurs récepteurs d'antigène hautement spécialisés protègent le corps humain contre un nombre potentiellement illimité de pathogènes. Les défaillances qui surviennent au cours de leur développement sont entre autres le pivot des maladies auto-immunes et des tumeurs malignes. Nous allons dans un premier temps poser les bases du développement normal des cellules B pour ensuite évoquer l'initiation du LF et sa lymphomagenèse.

2.1. Le développement des cellules B dans les organes lymphoïdes

Les cellules du système immunitaire dérivent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse. Comme elles peuvent générer tous les types de cellules sanguines, on les appelle cellules souches hématopoïétiques pluripotentes. Ces dernières se divisent ensuite pour donner deux autres types de cellules souches, le progéniteur myéloïde commun à l'origine de la lignée myéloïde et par conséquent des globules rouges, des granulocytes (monocytes, neutrophiles, éosinophiles...), des macrophages et des cellules dendritiques, et le

progéniteur lymphoïde commun à l'origine des lymphocytes B, des lymphocytes T et des cellules tueuses ou cellules NK (Natural Killer) (Figure 4)⁷⁴. Bien que les lymphocytes B et les lymphocytes T sont issus de la moelle osseuse, seuls les lymphocytes B s'y différencient entièrement. Les lymphocytes T migrent quant à eux dans le thymus où ils poursuivent leur différenciation, générant diverses cellules effectrices dont les lymphocytes T cytotoxiques et les lymphocytes T auxiliaires⁷⁵ mais nous nous focaliserons ici principalement au développement des cellules B.

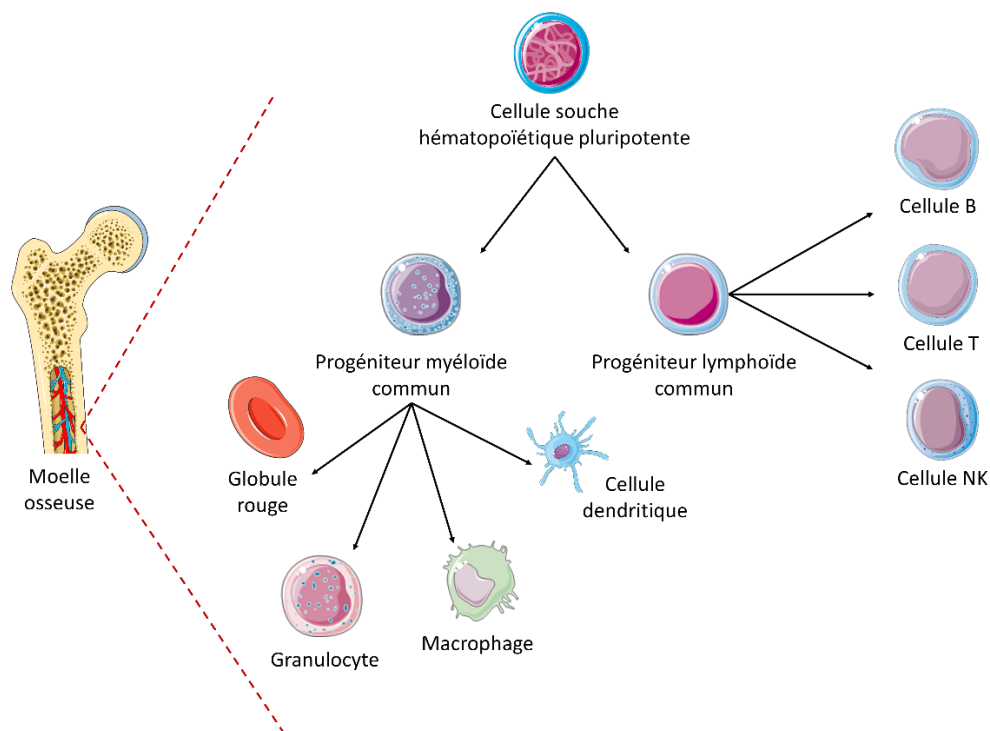


Figure 4: Les cellules souches hématopoïétiques génèrent les cellules du système immunitaire (schéma inspiré du Janeway's Immunobiology⁷⁴).

La différenciation des cellules B à partir du progéniteur lymphoïde est aidé par le microenvironnement spécialisé de la moelle osseuse, notamment au moyen de signaux délivrés par les cellules stromales (Figure 5). Ces dernières interagissent avec les cellules progénitrices par le biais de molécules d'adhésion comme ICAM (Intercellular Adhesion Molecule 1) ou encore VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) qui se lie à l'intégrine VLA-4 présente sur les cellules progénitrices⁷⁶. Les CSH pluripotentes expriment à leur surface des récepteurs à activité tyrosine kinase comme KIT et FLT3, dont les ligands sont sécrétés par les cellules

stromales. La signalisation qui résulte de la liaison du récepteur FLT3 à son ligand membranaire induit la différenciation des CSH pluripotentes en progéniteur lymphoïde commun⁷⁶. Cette différenciation est accompagnée par l'expression à la surface du récepteur à l'IL-7, qui sécrétée par les cellules stromales est essentielle à la survie et au développement des progéniteurs B. Le progéniteur lymphoïde commun se différencie ensuite en cellule pro-B précoce puis pro-B tardive. Dès lors, les facteurs de transcription E2A et EBF induisent l'expression de protéines dont RAG-1 et RAG-2 qui permettent le réarrangement génique⁷⁶. En effet, l'entrée dans la filiation B se caractérise d'une part par l'acquisition de marqueurs de surface spécifiques, comme le CD45 au stade pro-B et le CD19 au stade pré-B1 mais également par le réarrangement fonctionnel des segments des gènes d'immunoglobulines, avec le réarrangement des segments V_H, D_H et J_H pour la chaîne lourde et des segments V_L-J_L pour la chaîne légère qui permettent de générer un répertoire de cellules B exprimant des anticorps capables de reconnaître plus de 5x10¹³ antigènes différents⁷⁷. Dans un premier temps, les cellules pro-B réarrangent les segments D_H et J_H de la chaîne lourde suivi d'un second réarrangement, la jonction du segment génique V_H au segment DJ_H réarrangé, permettant la production d'une chaîne lourde complète. Afin de vérifier que le réarrangement VDJ_H est correct et que la chaîne lourde μ produite est fonctionnelle, les cellules pro-B produisent des chaînes légères de substitution, composées des protéines VP_{REB1} et $\lambda 5$ et ayant une ressemblance structurelle avec la chaîne légère finale, qui s'apparient avec la chaîne μ et forment le pré-BCR⁷⁶. Ce dernier est également composé de molécules de signalisation intracellulaire CD79a et CD79b, indispensables à la formation d'un récepteur fonctionnel et au développement des cellules B⁷⁸. La formation du pré-BCR est un point de contrôle crucial dans le développement des cellules, d'une part car il permet de s'assurer que le réarrangement de la chaîne lourde est fonctionnel et d'autre part car il fournit les signaux nécessaires à la différenciation des cellules pro-B en cellules pré-B qui initient le réarrangement de la chaîne légère κ ou λ ⁷⁴. Les locus de chaîne légère étant dépourvus de segments D, le réarrangement de la chaîne légère se fait par la jonction d'un segment V_L avec un segment J_L. A l'instar de la chaîne lourde, plusieurs réarrangements peuvent être tentés sur un chromosome avant de passer à l'autre chromosome, dans le cas où le réarrangement est non-fonctionnel. Par conséquent, une fois la chaîne légère fonctionnelle, elle s'associe avec la chaîne μ ce qui permet l'expression d'une immunoglobuline de surface appelée IgM qui correspond au BCR (B Cell

Receptor), le récepteur des lymphocytes B. Les cellules pré-B deviennent alors des cellules B immatures.

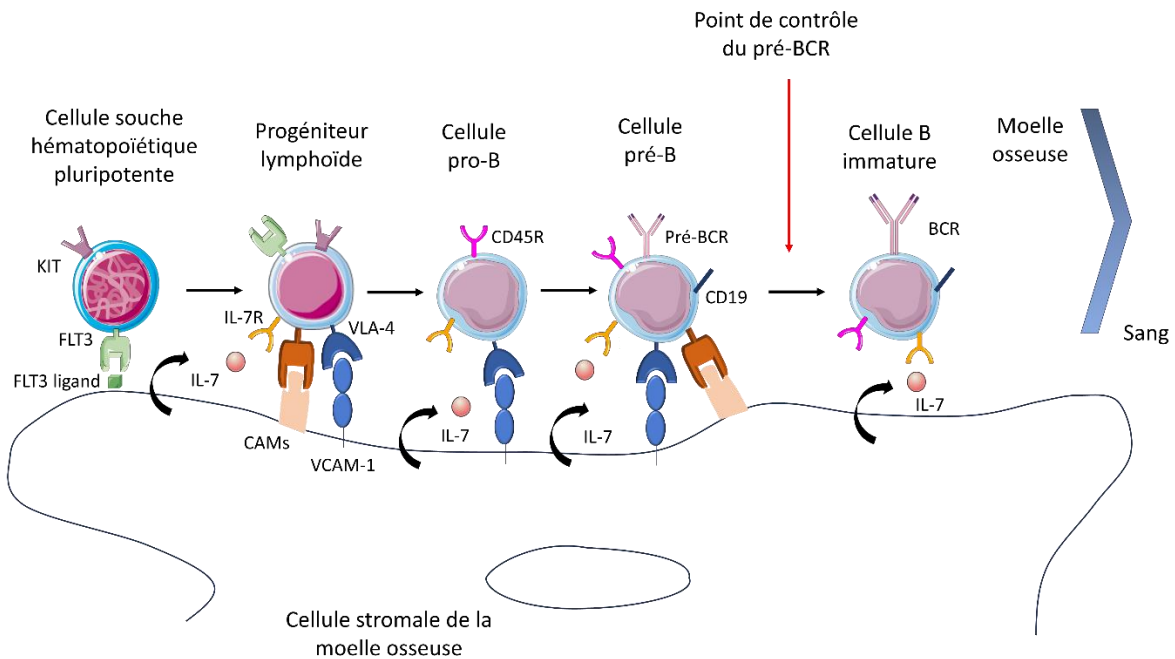


Figure 5: Développement des cellules B à partir des progéniteurs hématopoïétiques (schéma inspiré du *Janeway's Immunobiology*⁷⁴). KIT : Receptor Tyrosine Kinase, FLT3 : Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3, IL-7 : Interleukin-7, CAMs : , VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1, BCR : B Cell Receptor.

2.2. Les phénomènes d'exclusion allélique et d'exclusion isotypique

La finalité de l'exclusion allélique est d'empêcher la cellule de produire deux récepteurs de spécificité antigénique différente et pour se faire, un seul des deux allèles d'un gène doit être exprimé dans une cellule diploïde. L'exclusion allélique se déroule au moment de l'expression du pré-BCR à la surface des cellules pré-B⁷⁷. C'est en effet la signalisation du pré-BCR qui favorise l'exclusion allélique, en réduisant notamment l'activité de la V(D)J recombinase par la diminution de l'expression des protéines RAG-1 et RAG-2, en phosphorylant RAG-2 ce qui en fait une cible pour la dégradation protéique ou encore en réduisant l'accès de la recombinase au locus de la chaîne lourde. Ce phénomène s'applique également au locus de la chaîne légère. Néanmoins, en plus de l'exclusion allélique, les chaînes légères sont sujettes à l'exclusion isotypique. Il s'agit de l'expression par les cellules B d'un seul type de chaîne légère,

soit κ soit λ . Le ratio de cellules B matures exprimant une chaîne légère κ par rapport à celles exprimant une chaîne légère λ est de 65%:35%, ratio qui est particulièrement utile lors du diagnostic clinique⁷⁴. En effet, un ratio κ : λ aberrant peut être synonyme d'un syndrome lymphoprolifératif.

2.3. La migration des cellules B immatures de la moelle osseuse aux organes lymphoïdes secondaires

2.3.1. Les cellules auto-réactives

Du fait de sa grande diversité de répertoire, le BCR, présent à la surface des cellules B immatures, peut reconnaître et réagir aux antigènes du soi et ainsi provoquer des réactions auto-immunes. Il est donc impératif que le BCR soit soumis à un test de tolérance aux auto-antigènes. Cette étape de sélection négative se déroule au sein de la moelle osseuse mais s'il reste des cellules auto-immunes, il est encore possible de les éliminer à la périphérie. Les cellules B immatures réactives aux antigènes du soi ont 4 destins possibles^{74,79} :

- i) l'élimination par apoptose,
- ii) le réarrangement des gènes d'immunoglobuline, ou BCR editing, qui permet à la cellule d'effectuer des réarrangements secondaires au niveau de la chaîne légère grâce aux protéines RAG encore exprimées dans ce cas-là. Ceci se produit jusqu'à l'épuisement des segments géniques V et J disponibles, après quoi la cellule réactive est détruite. Néanmoins, si le réarrangement est fonctionnel, la cellule B pourra continuer son développement normal,
- iii) la désactivation cellulaire, ou anergie, afin que les cellules auto-réactives ne puissent plus être activées par leur antigène spécifique. On note pour ces cellules une internalisation de la plupart des IgM de surface et une durée de vie relativement courte, car elles ne peuvent plus répondre aux signaux de survie fournis par les cellules T,
- iv) l'ignorance immunologique qui signifie que la cellule, bien qu'ayant une affinité pour un antigène du soi, ne le détecte pas car il est séquestré ou que sa concentration est trop faible.

Enfin, toutes les cellules B immatures dont le BCR ne reconnaît pas un antigène du soi peuvent quitter la moelle osseuse et être transportées par la circulation sanguine vers les organes lymphoïdes secondaires afin de devenir des cellules B matures.

2.3.2. La maturation des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires

En circulant dans l'organisme par le sang et la lymphe, les cellules B parcourent régulièrement les organes lymphoïdes secondaires comme la rate, les ganglions lymphatiques, les amygdales ou encore les plaques de Peyer. Après avoir quittés la moelle osseuse, les lymphocytes B encore immatures se dirigent en premier lieu vers la rate où ils colonisent des niches afin de former la zone marginale splénique et le compartiment folliculaire splénique⁷⁷. La zone marginale splénique est composée de cellules B qui constituent la première ligne de défense contre les agents pathogènes véhiculés par le sang⁷⁴. En effet, au cours des trois premiers jours suivant l'infection, indépendamment de la stimulation par les cellules T, ces cellules se transforment en plasmocytes extrafolliculaires et sécrètent des IgM qui forment des complexes immuns avec l'agent pathogène. Les cellules B folliculaires retrouvées dans le compartiment folliculaire splénique, dont la réponse est dépendante de la stimulation par les cellules T, doivent quant à elles ressortir de la rate et retourner dans la circulation sanguine afin de rencontrer leur antigène spécifique dans un autre organe lymphoïde secondaire⁸⁰. Une fois dans la circulation sanguine, les cellules B qui n'ont pas encore rencontré leur antigène spécifique, appelées cellules B naïves, se dirigent vers les ganglions lymphatiques (*Figure 6*). Elles y entrent par le sang à travers les parois de veinules postcapillaires à endothélium élevé ou HEV (High Endothelial Venules). Ces dernières sont localisées au niveau du cortex, et plus spécifiquement du para-cortex où on retrouve majoritairement des cellules T. C'est à ce niveau que les cellules T, par le biais de leur récepteur, vont interagir avec le complexe CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité)/peptide présenté par les cellules dendritiques. Si les cellules T rencontrent leur peptide spécifique, elles prolifèrent et se différencient entre autres en cellules T auxiliaires⁷⁴. Les cellules B naïves sont quant à elles progressivement dirigées vers des zones riches en cellules B appelées follicules^{74,81}. Sur leur chemin, les cellules B reconnaissent leur antigène spécifique présenté par les FDCs qui va être dégradé au niveau du lysosome après

internalisation du complexe BCR/antigène. Le peptide antigénique est ensuite présenté à la surface des cellules B et reconnu par les cellules T auxiliaires qui vont proliférer et fournir des signaux d'activation aux cellules B, notamment *via* l'interaction CD40/CD40L. L'ensemble de ces interactions déclenche une prolifération intense des cellules B activées qui migrent vers un follicule primaire et continuent à proliférer jusqu'à former un CG. Par ailleurs, les follicules qui contiennent un CG sont appelés follicules secondaires.

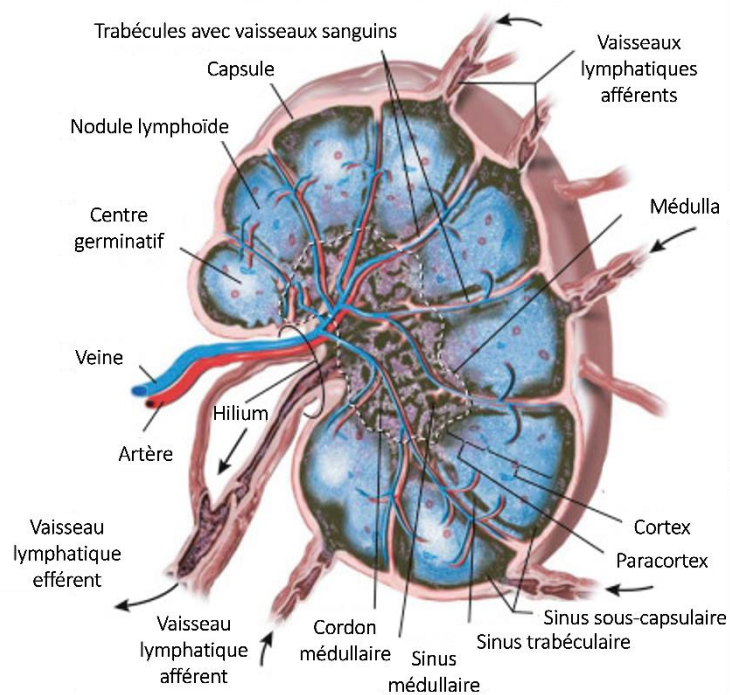


Figure 6: Représentation schématique tridimensionnelle d'un ganglion (d'après Ward et al. Comparative Anatomy and Histology, 2018⁸²). Figure dont les légendes ont été traduites en français.

2.3.3. Les centres germinatifs

Le CG est une structure caractérisée par une forte prolifération des cellules B ainsi que par leur différenciation cellulaire. Les cellules n'ayant pas proliféré sont repoussées à la périphérie du CG, formant autour de lui une zone appelée la zone du manteau. L'architecture du CG est particulière et agencée selon deux zones, une zone sombre dans laquelle on retrouve de grandes cellules B possédant des caractéristiques de prolifération intense appelées

centroblastes et une zone claire dans laquelle on retrouve les centrocytes, de plus petites cellules ayant un rythme de prolifération moins intense.

2.3.3.1. *La différenciation cellulaire au sein du centre germinatif*

2.3.3.1.1. *Le processus d'hypermutation somatique*

La zone sombre du CG est le site d'initiation du processus de maturation d'affinité du BCR des centroblastes, également appelé processus d'hypermutation somatique des gènes d'immunoglobuline (*Figure 7*). Il s'agit d'un phénomène permettant de diversifier les immunoglobulines par l'introduction de mutations ponctuelles qui modifient un ou plusieurs acides aminés au niveau de la région variable des immunoglobulines. Ces mutations sont initiées par l'enzyme AID (Activation-Induced cytidine Deaminase), codée par le gène *AICDA*, qui n'est exprimée que par les cellules B du CG⁸³. Au fur et à mesure que les cellules prolifèrent dans la zone sombre, les mutations ponctuelles s'accumulent, formant ainsi des clones de cellules B dont les nouveaux récepteurs diffèrent en termes de spécificité et d'affinité pour l'antigène. Certains cycles de mutations, particulièrement délétères pour les cellules B (repliement incorrect de l'immunoglobuline, modifications des régions de liaison à l'antigène, non-reconnaissance de l'antigène...) conduisent à l'élimination de ces cellules par les macrophages après migration dans la zone claire⁸⁴. Néanmoins, d'autres cycles de mutations parviennent, pour certaines cellules B, à augmenter l'affinité du récepteur pour l'antigène. Ces cellules vont alors migrer vers la zone claire du CG où l'affinité de leur BCR vis-à-vis de l'antigène va être testé par les Tfh et les FDCs (*Figure 7*). Les centrocytes dont le BCR est plus affiné sont alors sélectionnés car ils interagissent davantage avec ces cellules et reçoivent par conséquent davantage de signaux de leur part, notamment des signaux favorisant la survie comme le signal CD40L et le signal BAFF délivrés par les Tfh et les FDCs respectivement⁷⁴. Par ailleurs, les cellules sélectionnées dans la zone claire connaissent une maturation constante de l'affinité de leur BCR par de multiples cycles de passage entre la zone sombre et la zone claire, où elles acquièrent de nouvelles mutations des gènes d'immunoglobulines. La sécrétion de chimiokines par les cellules stromales permet à la fois de compartimenter les centroblastes et les centrocytes dans leur zone respective et de réguler leur circulation entre la zone sombre et la

zone claire du CG¹⁸. En effet, la surexpression ou la sous-expression des récepteurs CXCR4 et CXCR5 à la surface des centroblastes et des centrocytes permettrait de réguler leurs interactions respectives avec les chimiokines CXCL12 et CXCL13, contribuant au trafic des cellules d'une zone à l'autre.

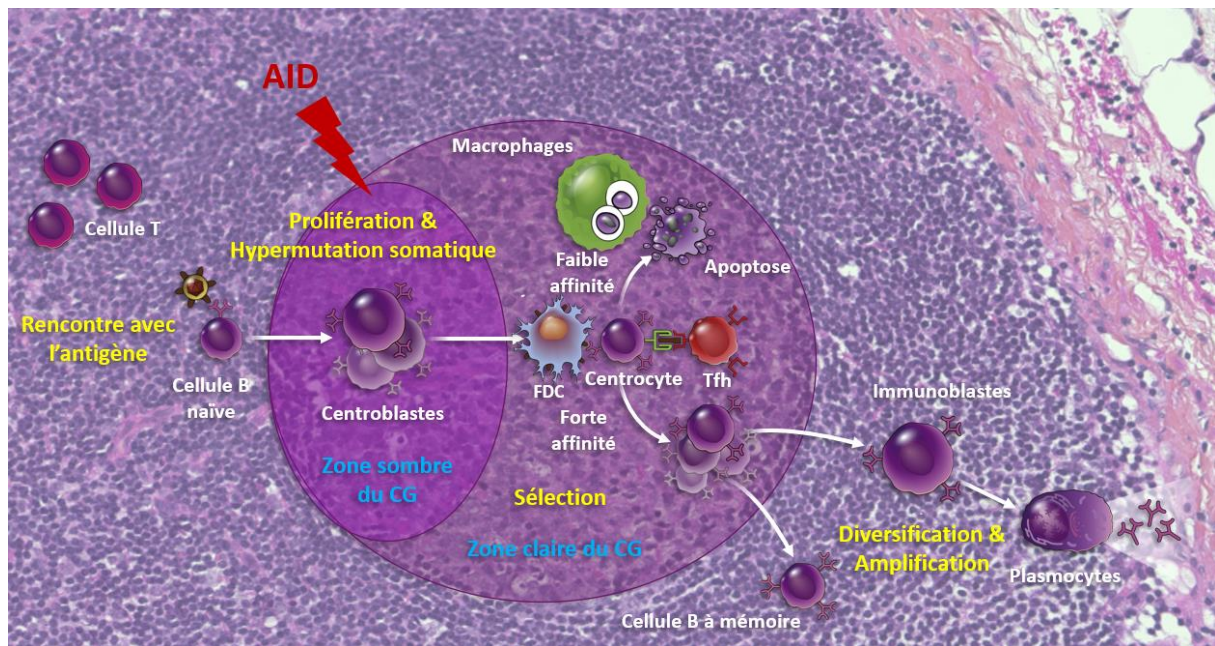


Figure 7: Représentation schématique de la réaction qui se produit au sein du CG (figure originale).

2.3.3.1.2. La commutation isotypique

La commutation isotypique est un mécanisme qui se produit à la suite de l'interaction CD40-CD40L entre les cellules B et les cellules T auxiliaires. Sans cette interaction, ce phénomène est réduit et induit un taux d'IgM plasmatique particulièrement important^{74,85}. La commutation isotypique a lieu au sein du locus IgH et repose sur le réarrangement de la région constante de la chaîne lourde d'immunoglobuline, où l'IgM va être remplacée par un autre isotype (IgG, IgE ou IgA). La région variable de la chaîne lourde demeure quant à elle inchangée mais différentes immunoglobulines de surface peuvent être obtenues, avec des fonctions effectrices spécifiques permettant une protection plus ciblée contre les différents pathogènes. La commutation isotypique est initiée par la désamination des cytosines en uraciles dans l'ADN et est induite par l'enzyme AID. L'excision des uraciles entraîne la génération de cassures

doubles brins entre deux régions S d'immunoglobulines. Ces régions sont fortement enrichies en pentamères riches en G, tels que GGG(G/C)T ou GAGCT, avec plusieurs bases nucléiques qui se chevauchent au niveau de AID (AGCT) et seraient par conséquent les cibles principales d'AID au cours de la commutation isotypique⁸³. Bien qu'il ait longtemps été considéré que le changement de classe isotypique se produit exclusivement au sein du CG, une étude récente a démontré qu'elle peut se produire avant l'entrée dans le CG⁸⁶. Après analyse du comportement des cellules B du CG au moyen de la technique de single-cell RNA seq, King et al. ont rapporté l'identification d'une sous-population qui présente des caractéristiques de cellules pré-CG et qui exprime des gènes marqueurs d'activation ainsi qu'une fréquence élevée d'interaction cellule-cellule avec les cellules présentatrices d'antigène⁸⁷. Ces cellules pré-CG expriment également des gènes associés au changement de classe isotypique, ce qui suggère que la commutation isotypique peut se produire avant la formation des CG.

2.3.3.1.3. Le single-cell RNA-seq a permis l'identification de multiples sous-populations au sein du centre germinatif

Récemment, des études de single-cell RNA-seq menées sur des cellules B du CG ont permis d'analyser le comportement de ces cellules à l'échelle unicellulaire et de mettre en évidence l'hétérogénéité de ce compartiment par l'identification de plusieurs sous-populations distinctes, certaines ayant une filiation avec les cellules de la zone claire et de la zone sombre du CG et d'autres avec les précurseurs des cellules B à mémoire^{32,87,88}. Par une analyse pseudo-temporelle, qui permet de déduire la trajectoire de différenciation d'un ensemble de cellules à l'échelle scRNA-seq, Milpied et al. ont montré qu'en fonction de leur profil d'expression génique, les cellules B du CG sont réparties sur un continuum allant de la zone claire à la zone sombre, et ont identifié deux populations cellulaires qui transitent entre ces deux zones et qui sont donc dans un état intermédiaire³². Holmes et al. et King et al. ont quant à eux identifié plus de 5 sous-populations au niveau du continuum zone claire/zone sombre^{87,88}. Alors que la division cellulaire dans le CG a longtemps été considérée comme une caractéristique des cellules B de la zone sombre, Holmes et al. rapportent l'identification d'une petite sous-population de cellules appartenant à la zone claire du CG (environ 20%) et qui expriment des gènes associés aux stades S-G2-M du cycle cellulaire (dont *MYC*, *BATF*, *NF-KB*, gènes induits par

le signal CD40), suggérant que ces cellules sont programmées pour subir une division cellulaire complète⁸⁸. Deux autres sous-populations sont également identifiées : i) celle qui transite de la zone claire vers un stade intermédiaire, pour finalement acquérir une identité de cellules B pré-mémoires caractérisée par une forte expression de *CCR6* et *BANK1* et par la régulation négative des gènes du CG comme *MEF2B* et *RSG13* et ii) celle qui s'identifie comme des plasmocytes précoces et tardifs, et qui exprime des marqueurs de différenciation plasmocytaires comme *PRDM1* et *XBP1*⁸⁸.

2.3.3.2. *Les programmes moléculaires à l'origine de la réaction se produisant dans le centre germinatif*

Lors du réarrangement des gènes d'immunoglobulines, il existe un risque accru de translocations chromosomiques qui induisent l'activation de certaines protéines, comme BCL-2, et de facteurs de transcription, comme BCL-6 et MYC, qui jouent un rôle dans la réaction du CG. La protéine MYC est exprimée par un sous-ensemble de centrocytes dans la zone claire du CG. Elle semble être cruciale à la formation des CG car sa délétion dans des cellules B murines empêche complètement leur formation^{89,90}. Lorsque les centrocytes effectuent les cycles de passage entre la zone claire et la zone sombre du CG, la protéine MYC est toujours exprimée mais dès l'entrée dans la zone sombre, son expression est réprimée par le facteur de transcription BCL-6, exprimé par les centroblastes^{89,90}. Toutefois, le blocage de l'expression ou de l'activité de MYC dans les cellules B matures du CG, par son inhibiteur spécifique omomyc, a entraîné sa disparition, ce qui suggère que MYC est requis à la fois pour l'initiation mais également pour le maintien de la réaction du CG⁸⁹⁻⁹¹. Le facteur de transcription BCL-6 joue également un rôle important dans la formation du CG. Il a été démontré que, malgré un développement normal des cellules B, les souris déficientes en BCL-6 sont incapables de générer des CG⁹². Par ailleurs, BCL-6 favorise la prolifération des cellules B du CG car il cible des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, notamment la cycline D⁹³. BCL-6 exerce également sa fonction de facteur de transcription répresseur en ciblant des gènes impliqués dans la détection des dommages à l'ADN comme ATR ou dans l'arrêt du cycle cellulaire comme TP53, favorisant la tolérance aux dommages à l'ADN au cours de la réaction du CG⁹⁴. Enfin, BCL-6 jouerait un rôle essentiel en réprimant l'activation du gène *PRDM1*, qui code le facteur BLIMP-

1, indispensable à la différenciation plasmocytaire des cellules B, notamment lorsque les cellules B n'ont pas produit un BCR de forte affinité⁹³. De ce fait, la différenciation terminale des cellules B du CG ne peut s'accomplir que lorsque BCL-6 est réprimé à son tour par rétrocontrôle négatif lors de sa liaison à son propre promoteur ou encore par sa dégradation protéasomique suite à la phosphorylation de BCL-6 par ATM en réponse à l'accumulation de dommages à l'ADN⁹⁵. Les phénomènes ayant lieu dans la zone sombre du CG, dont l'hypermutation somatique et la prolifération des centroblastes, génèrent un large panel d'immunoglobulines différentes qui seront testées dans la zone claire. Les centrocytes dont le BCR n'est pas fonctionnel et qui ne parviennent pas à affiner leur BCR sont éliminés au moyen d'un programme pro-apoptotique médié par la répression de facteurs anti-apoptotiques comme BCL-2 et par l'expression de protéines pro-apoptotiques comme BAX et BAK⁹⁶. Le rôle de ces protéines consiste à perforer la membrane mitochondriale et à déclencher l'apoptose *via* un relargage de cytochrome C dans le cytosol, activant ainsi la chaîne des caspases et entraînant la mort cellulaire⁹⁷.

2.3.3.3. *La différenciation terminale*

Une fois que les cellules B du CG expriment à la surface un BCR ayant subi la commutation isotypique ainsi que la maturation d'affinité, elles peuvent sortir de la zone claire et entamer le processus de différenciation en cellules B à mémoire ou en plasmocytes (*Figure 7*). Contrairement aux plasmocytes, le processus de différenciation des cellules B à mémoire n'est pas très bien connu. Des études suggèrent néanmoins que certains centrocytes, percevant de faibles signaux de soutien en provenance des T_{fh}s et de la voie de signalisation du CD40, expriment fortement le facteur de transcription BACH2 ce qui prédispose ces cellules à la différenciation en cellules B à mémoire^{98,99}. La différenciation en plasmocytes est quant à elle induite par la régulation à la baisse des facteurs de transcription PAX5 et BCL-6 et par l'induction de l'expression de BLIMP-1 par le facteur de transcription IRF4^{100,101}. Par la suite, BLIMP-1 permet l'activation de la protéine XBP1 qui aide les plasmocytes à réguler leur capacité de sécrétion.

2.4. Le lymphome folliculaire, une pathologie dérivant du centre germinatif

2.4.1. La translocation t(14;18), le premier hit oncogénique du lymphome folliculaire

La translocation chromosomique t(14;18)(q32;q21) correspond à l'anomalie cytogénétique la plus couramment retrouvée chez les patients atteints de LF, à hauteur de plus de 85%⁸. C'est un évènement qui survient très tôt dans le développement cellulaire B, plus précisément dans les cellules pré-B de la moelle osseuse lors du processus de recombinaison V(D)J des gènes d'immunoglobulines, phénomène au cours duquel la probabilité d'acquérir des translocations chromosomiques est forte¹⁴. La translocation t(14;18) est le résultat de points de cassure au niveau des loci *IgH* et *BCL2* qui conduisent à un échange de matériel. Pour le locus *BCL2*, situé sur le bras long q21 du chromosome 18, les points de cassures sont localisés au niveau des îlots CpG¹⁰². Ces derniers sont alors la cible de méthylation sur la cytosine entraînant sa désamination en thymine et par conséquent la génération d'un mésappariement T/G. Il a été suggéré que l'enzyme AID, faiblement exprimée par les progéniteurs B, est responsable de cette désamination¹⁰². Les enzymes RAG et Artemis, responsables des cassures de l'ADN double brin au niveau du locus *IgH*, semblent être également impliquées dans le locus *BCL2*. En effet, dans un premier temps, le complexe RAG crée une structure en épingle à cheveux au niveau des segments D_H et J_H du gène qui code la chaîne lourde d'immunoglobuline, ce qui active l'enzyme Artemis capable d'aller accrocher les mésappariements T/G générés par AID sur les îlots CpG méthylés et de créer une cassure double brin¹⁰². Il y a alors un réarrangement chromosomique à l'origine de la jonction d'une partie du gène *BCL2* avec une partie du locus *IgH*, appelé translocation t(14;18) qui a pour conséquence de placer le proto-oncogène BCL-2 sous le contrôle transcriptionnel des régions régulatrices de la chaîne lourde des immunoglobulines, ce qui entraîne l'expression constitutive de la protéine anti-apoptotique BCL-2 dès les premiers stades de différenciation des cellules B¹⁴.

2.4.2. L'expression constitutive de la protéine BCL-2 confère un avantage de survie aux cellules t(14;18)⁺ dans le centre germinatif mais ne suffit pas à l'induction du lymphome folliculaire

Dans le CG, l'expression de BCL-2 est normalement réprimée, parallèlement à l'activation d'un programme pro-apoptotique permettant l'élimination des cellules ayant acquis un BCR de faible affinité pour l'antigène ou reconnaissant un antigène du soi^{96,97}. Toutefois, dans le CG, les cellules porteuses de la translocation t(14;18) sont protégées des signaux pro-apoptotiques par la surexpression de la protéine BCL-2 et sa fonction anti-apoptotique. En effet, en se liant à BAX ou à BAX, elle limite leur activité, bloque le déclenchement de la voie intrinsèque de l'apoptose et sélectionne négativement les cellules qui devraient subir l'apoptose pendant la maturation d'affinité du BCR^{14,103}. Il a été montré qu'une grande proportion d'individus en bonne santé (supérieure à 70%) sont porteurs d'une faible quantité de cellules t(14 ;18)⁺ (environ une cellule pour un million), à la fois dans le sang périphérique mais aussi dans les organes hématopoïétiques comme la moelle osseuse^{104,105}. Toutefois, la grande majorité de ces individus ne développeront jamais de LF, ce qui suggère que la dérégulation de BCL-2 n'est pas suffisante à elle seule pour induire la transformation maligne des cellules B¹⁰⁶.

2.4.3. Le paradoxe allélique, une caractéristique du lymphome folliculaire

Bien qu'il s'agisse d'un évènement précoce, la translocation t(14;18) ne semble pas empêcher la différenciation des cellules B dans le CG. En effet, il a été mis en évidence chez les individus sains que la plupart des cellules t(14;18)⁺ constituent une population clonale atypique de cellules B à mémoire CD27⁺ qui a déjà parcouru le CG¹⁰⁷. Elles présentent par ailleurs des caractéristiques typiques de cellules tumorales de LF, dont certains marqueurs comme CD10⁺, CXCR4⁻, BCL-6⁺ ou encore Ki67^{-108,109}. Une autre caractéristique manifeste du LF a également été constaté dans ces cellules t(14;18)⁺. Il s'agit d'un paradoxe allélique qui repose sur le fait que la commutation isotypique cible normalement le même isotype sur les allèles fonctionnels et non fonctionnels d'une même cellule tandis qu'il a été rapporté que les cellules t(14;18)⁺ conservent à leur surface l'expression d'une IgM alors même qu'elles ont subi la commutation

isotypique en IgG sur l'allèle non fonctionnel¹⁰⁷. Compte-tenu de l'importante pression de sélection exercée pour maintenir l'expression d'une IgM à la surface de ces cellules, il est crucial de comprendre pourquoi certaines d'entre elles se transforment en cellules tumorales de LF tandis que d'autres ne le seront jamais. Il a été mis en évidence que dans le LF, la réticulation des BCR de type IgM permet une plus forte activation que celle des BCR de type IgG¹¹⁰. Ceci pourrait en partie être dû à la présence de sites de N-glycosylation sur les BCR de type IgM, introduits par hypermutation somatique sur les chaînes d'immunoglobulines, et qui permettent une forte interaction avec les cellules dendritiques et les macrophages, par le biais de lectines présentes à leur surface, et qui en retour stimulent leur BCR, et ce même en l'absence d'antigène^{110,111}. Ceci suggère alors que les voies de survie et de prolifération déclenchées par ce type de BCR sont particulièrement importantes pour la survie des cellules tumorales de LF. De plus, il semblerait que le maintien d'un BCR de type IgM par les cellules de LF pourrait contribuer au phénotype de type LF, à savoir de centrocytes bloqués dans le CG, associé à l'accumulation d'évènements génétiques lors des cycles de passage entre la zone sombre et la zone claire. Il a par ailleurs été montré que, de façon analogue aux cellules B à mémoire normales, les cellules B à mémoire porteuses de la translocation t(14;18) qui surexpriment BCL-2 sont réintroduites au sein du CG à la suite d'interactions antigéniques répétées lors des réponses immunitaires¹⁰⁸. Cependant, l'exposition répétée à l'enzyme AID, impliquée dans le processus d'hypermutation somatique, lors de ces multiples cycles de réentrées dans le CG génère une instabilité génomique favorisant l'accumulation de mutations oncogéniques dont certaines apportent un avantage sélectif et favorisent l'évolution en cellules tumorales de LF^{108,112,113}.

2.4.4. Le gène BCL-6 joue un rôle dans le blocage des centrocytes dans le centre germinatif

Comme nous l'avons vu précédemment, le gène BCL-6, essentiel à l'initiation de la réaction du CG, doit être réprimé en fin de réaction pour permettre la différenciation terminale des cellules B du CG^{92,93}. Bien qu'elle soit plus fréquemment retrouvée dans les cas de LBDGC, il a été rapporté que 10 à 15% des cas de LF présentent une translocation chromosomique t(3;14)(q27;q32) impliquant le gène *BCL-6* et le gène *IgH*^{114,115,14}. Par ailleurs, il a été démontré

que les patients atteints de LF et qui surexpriment BCL-6 sont plus à risque de connaître une évolution vers un LF de haut grade ou plus agressif comme le LBDGC^{116,117}. Les translocations chromosomiques ou les mutations somatiques qui affectent le gène *BCL-6* sont responsables de son expression constitutive dans les cellules B du CG^{117,118}. Par ailleurs, la transcription de BCL-6 est régulée par des protéines appartenant à la famille des histones acétyltransférases comme CREBBP et son paralogue EP300. Néanmoins, dans le LF, ces derniers sont fréquemment mutés ce qui contribue à un défaut d'inactivation de BCL-6 par acétylation^{119,120}. Ainsi, au cours de leur passage dans le CG, les cellules B qui surexpriment BCL-2 et BCL-6 sont tolérantes aux dommages à l'ADN grâce à la répression par BCL-6 des gènes impliqués dans la détection de ces dommages et ne sont pas éliminées grâce à la résistance aux signaux pro-apoptotiques induit par BCL-2^{14,94,103}.

2.4.5. Les altérations génétiques à l'œuvre dans le lymphome folliculaire

Ces dernières années, le paysage génétique du LF a largement été caractérisé, révélant des mutations génétiques fréquentes qui ciblent principalement les gènes codant les histones acétyltransférases comme *CREBBP* et *EP300*, les histones méthyltransférases comme *KMT2D* et *EZH2* ou le récepteur du facteur de nécrose tumorale, *TNFRSF14*.

- **CREBBP et EP300**

Les mutations ciblant *CREBBP* et *EP300* sont retrouvées à hauteur de plus de 65% et de 15% respectivement chez les patients atteints de LF^{119,9}. Le gène *CREBBP* code la lysine acétyltransférase KAT, qui acétyle l'histone 3 au niveau des lysines 18 et 27 (H3K18Ac et H3K27Ac), et qui agit comme un coactivateur transcriptionnel en acétylant des histones au niveau des régions promotrices et activatrices¹²¹. L'acétylation des histones modifie leur charge et favorise le relâchement de la chromatine, rendant ainsi plus facile l'accès des facteurs de transcription à l'ADN. Parmi les cibles de *CREBBP*, on retrouve *TP53* dont l'acétylation est nécessaire pour son activité transcriptionnelle de gène suppresseur de tumeur ainsi que *BCL-6* pour lequel l'inactivation par acétylation favorise la différenciation terminale des cellules B du CG¹²¹. Les mutations qui affectent *CREBBP* et *EP300* agissent principalement au niveau du

domaine histone acétyltransférase (HAT), responsable de l'activité enzymatique. Elles produisent à la fois des protéines tronquées dépourvues du domaine HAT ou encore des modifications d'acides aminés au sein du domaine altérant ainsi sa capacité à interagir avec l'acétylCoA^{119,122}. Ainsi, ces mutations participent à la lymphomagénèse en empêchant i) l'acétylation de BCL-6 et par conséquent son inactivation, ce qui résulte en une expression constitutive de BCL-6 et au maintien d'un phénotype de type CG, et ii) l'acétylation de TP53, atténuant sa réponse aux dommages à l'ADN¹²¹. De plus, il a été démontré que les tumeurs mutées pour CREBBP ont un nombre réduit de cellules T infiltrant la tumeur ainsi qu'une expression faible du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, ce qui a pour conséquence une présentation réduite de l'antigène et une évasion immunitaire plus importante^{123,121}. Toutefois, l'utilisation d'inhibiteurs de l'histone désacétylase 3 (HDAC3) permet de rétablir la surveillance immunitaire ainsi que l'infiltration de la tumeur par les cellules T grâce à l'induction des gènes de présentation d'antigène et de la voie de l'interféron, initialement réprimés par BCL-6¹²⁴.

- **KMT2D**

Dans le LF, les mutations qui ciblent le gène *KMT2D* sont les plus fréquentes, avec 80-90% de cas¹⁴. Également connu sous le nom *MLL2*, ce gène code pour une lysine méthyltransférase à domaine SET qui fait partie de la famille KMT2. Il a pour fonction la méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4) et agit en étant recruté par des facteurs de transcription ou des corécepteurs nucléaires au niveau des régions activatrices de l'ADN, facilitant ainsi la transcription des gènes¹²⁵. Le gène *KMT2D* peut agir de façon indépendante ou bien au sein d'un complexe multiprotéique associé à SET1, appelé COMPASS (COMplex of Proteins ASSociated with Set1)¹²⁶. La majorité des mutations qui touchent ce gène sont des mutations non-sens ou des mutations induisant un décalage dans le cadre de lecture, responsables d'une perte de la protéine KMT2D¹²⁷. Toutefois, des mutations codantes peuvent également affecter ce gène au niveau de la partie C terminale qui contient le domaine SET, entraînant une activité méthyltransférase réduite¹²⁷. Au sein du CG, l'expression du gène *KMT2D* est finement régulée en étant normalement exprimé par les cellules B puis réprimé au moment de la différenciation plasmocytaire. Il a été mis en évidence que les souris déficientes pour *KMT2D* présentent une persistance anormale des CG, qui régressent tardivement donnant lieu à une différenciation

terminale altérée¹²⁸. On retrouve par conséquent davantage de cellules B du CG et moins de cellules ayant subi une commutation isotypique après immunisation, soulignant le rôle de *KMT2D* dans la genèse du LF en particulier dans un contexte où BCL-2 est surexprimée¹²⁸. En effet, il a été rapporté que l'extinction du gène *KMT2D* dans un modèle murin surexprimant BCL-2 induit le développement de lymphomes dérivés du CG, semblables à ceux retrouvés chez l'Homme¹²⁷. Le gène *KMT2D* agirait donc comme un gène suppresseur de tumeur et son extinction précoce, en coopération avec la surexpression de BCL2, favoriserait le développement du LF. Par ailleurs, les mutations qui ciblent *KMT2D* affectent non seulement son activité méthyltransférase mais également l'expression de gènes cibles de *KMT2D* impliqués dans des voies de signalisation importantes (CD40, JAK-STAT, TLR, BCR...) et ayant des fonctions de gènes suppresseurs de tumeur comme TNFRSF14 dont nous reparlerons un peu plus tard¹²⁸.

- **EZH2**

Les mutations qui affectent le gène *EZH2* (Enhancer of Zeste Homologue 2), la sous-unité catalytique du complexe répresseur PRC2 (Polycomb Repressor Complex 2), sont observées chez plus de 25% de patients atteints de LF¹⁴. Ce gène code une lysine méthyltransférase qui catalyse la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3), qui constitue une marque chromatinienne répressive sur le plan transcriptionnel. Le gène *EZH2*, fortement exprimé par les cellules B du CG, réprime l'expression de gènes impliqués dans la différenciation terminale comme *IRF4* et *XBP1* (qui sont réexprimés ensuite) mais aussi dans l'expression de régulateurs négatifs du cycle cellulaire comme *CDKN1A* et *CDKN1B*^{70,129-131}. En effet, dans cette étude menée sur des cellules murines cultivées au sein d'un modèle de culture 3D, les auteurs sont parvenus à démontrer que la répression par *EZH2* du gène cible de *BCL-6*, *CDKN1A*, favorise la formation du CG et la prolifération des cellules B¹³². Par ailleurs, la déplétion de *CDKN1A* chez des souris déficientes pour *EZH2* suffit à rétablir la formation du CG¹³². Le plus souvent, les mutations qui affectent le gène *EZH2* sont des mutations faux-sens au niveau du domaine SET et plus particulièrement au niveau de la tyrosine 641 (Y641). Cette mutation entraîne une activité catalytique augmentée de l'enzyme et donc une méthylation plus importante de H3K27¹³³. Il a été montré que la mutation d'*EZH2* au niveau de Y641 a induit une répression stable des gènes impliqués dans la différenciation terminale des cellules B du CG, ce qui

contribue au blocage des cellules au stade de centrocytes^{70,131}. Par ailleurs, il a récemment été mis en évidence que les changements transcriptionnels qui surviennent suite à l'activité catalytique augmentée d'EZH2 sont très abondants dans des domaines topologiquement associés (TADs)¹³⁴. Ces domaines peuvent ainsi contribuer à la genèse du LF car certains d'entre eux répriment des gènes suppresseurs de tumeur. C'est le cas du domaine TAD6.139, caractérisé par une augmentation significative de H3K27me3, qui inactive *FOXO3* et *SESN1* ce qui induit une augmentation de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale¹³⁴⁻¹³⁶. De plus, et de façon similaire aux mutations de CREBBP, les cellules porteuses de mutations touchant l'acide aminé Y641 ont une expression réduite du CMH à la surface cellulaire ainsi qu'un nombre réduit de cellules T infiltrant la tumeur, ce qui favorise l'échappement immunitaire¹³⁷. A l'instar de CREBBP, l'utilisation d'inhibiteurs d'EZH2 permet de restaurer la surveillance immunitaire et l'expression du CMH à la surface cellulaire¹³⁷.

Il a été proposé que la rechute des patients atteints de LF est due à la présence de cellules progénitrices communes (CPCs) au sein desquelles on retrouve les mutations à l'origine de la transformation maligne des cellules porteuses de la translocation t(14;18) en cellules de LF dont *CREBBP*, *EP300*, *KMT2D* et *EZH2*^{138,139}. Certaines études ont néanmoins remis en question le fait que la translocation t(14;18) est l'évènement initiateur de la transformation tumorale^{140,141}. Très récemment, Haebe et al. ont entrepris d'éclairer ce point et ont démontré que les mutations définissant les CPCs ne sont pas acquises au stade de cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPCs) mais à des stades plus tardifs, après la translocation t(14;18)¹⁴². De plus, il a été mis en évidence que les mutations définissant les CPCs ne sont pas détectées dans le sang périphérique, suggérant que ces cellules résident plutôt dans les tissus ce qui pourrait expliquer le caractère incurable du LF. L'ensemble de ces données démontrent la nécessité de développer des thérapies combinant des immunothérapies et des inhibiteurs épigénétiques ce qui favoriserait à la fois l'augmentation de la surveillance immunitaire, l'infiltration de cellules immunitaires et l'élimination des cellules tumorales.

2.5. Le rôle du microenvironnement dans le lymphome folliculaire

L'incapacité des cellules primaires de LF à croître et à survivre seules *in vitro* met en évidence leur forte dépendance au microenvironnement tumoral. Il a en effet été démontré

que les cellules tumorales de LF subissent une apoptose spontanée lorsqu'elles sont cultivées en l'absence du microenvironnement tumoral ou de signaux similaires à ceux fournis par ce dernier¹⁴³. L'analyse transcriptomique à l'échelle « single-cell » d'échantillons de patients atteints de LF a permis de caractériser les différents types cellulaires présents au sein du microenvironnement tumoral³⁰. Dans le ganglion, les cellules B tumorales de LF se développent dans une niche tumorale qui conserve une architecture folliculaire et au sein de laquelle sont retrouvés : des FDCs, des Tfh, des macrophages, des cellules T régulatrices (Tregs), des cellules NK et un réseau de cellules réticulaires fibroblastiques (FRCs) et de lymphocytes T cytotoxiques (TCD8) au niveau de la zone extrafolliculaire. Comme nous l'avons vu précédemment, les patients atteints de LF présentent un envahissement médullaire par les cellules tumorales dans environ 70% des cas⁸. Ceci s'expliquerait par un tropisme spécifique pour les niches stromales de la moelle osseuse régulé par des protéines de la matrice extracellulaire (MEC), comme la protéine matricellaire SPARC (Secreted Protein Acidic and Cystein Rich) dont nous reparlerons plus tard¹⁴⁴. Par ailleurs, il y a davantage de macrophages et de TCD8 dans la moelle osseuse, ainsi qu'un enrichissement local en lymphocytes T CD4^{145,146}. L'étude du dialogue entre les cellules primaires de LF et son microenvironnement tumoral a permis de mettre en évidence des composants cellulaires qui apportent des signaux pro-tumoraux tandis que d'autres exercent une activité antitumorale, que nous décrivons dans le prochain paragraphe.

2.5.1. Le microenvironnement tumoral exerce une activité antitumorale sur les cellules de lymphome folliculaire...

2.5.1.1. *Les cellules lymphoïdes cytotoxiques permettent l'élimination des cellules tumorales*

Parmi les acteurs de la réponse immunitaire antitumorale, on retrouve les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, les cellules NK et les lymphocytes T γ/δ . Ces cellules sont majoritairement retrouvées à la périphérie des follicules, à proximité des macrophages sentinelles, contribuant ainsi à la surveillance immunitaire¹⁴⁷. Les **cellules TCD8⁺** sont activées après un contact synaptique, au cours duquel le récepteur TCR (T Cell Receptor), présent à la surface des cellules

TCD8⁺, reconnaît un antigène présenté par le CMH de classe I des cellules cibles. La voie de signalisation activée, qui suit l'engagement du récepteur TCR, est responsable de la sécrétion rapide de protéases stockées dans les granules cytoplasmiques des cellules cytotoxiques comme la perforine ou le granzyme B, au niveau du site de contact entre les cellules TCD8⁺ et leurs cellules cibles. Une fois que ces protéases pénètrent les cellules cibles, elles déclenchent l'activation de voies de signalisation apoptotiques qui induisent leur élimination¹⁴⁸. Effecteurs essentiels de la réponse antitumorale, les **cellules NK** sont rapidement recrutées au sein de la tumeur et reconnaissent l'IgG des cellules tumorales grâce à leur récepteur CD16¹⁴⁹. Une fois activées, elles sécrètent une grande variété de cytokines et de chimiokines parmi lesquelles on retrouve l'interféron γ (IFN- γ) et recrutent d'autres effecteurs de la réponse antitumorale, comme les macrophages¹⁴⁷. Par ailleurs, leur absence dans le sang périphérique des patients atteints de LF est corrélée à un mauvais pronostic¹⁵⁰. Bien que peu abondants dans les ganglions lymphatiques de LF¹⁵¹⁻¹⁵³, les **lymphocytes T γ/δ** sécrètent également des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires pouvant induire la mort des cellules tumorales¹⁵⁴. Ces lymphocytes sont activés suite à la stimulation de leur récepteur TCR V γ 9 par des petits métabolites phosphorylés produits par la voie du cholestérol dans les cellules tumorales, également appelés phosphoantigènes non peptidiques¹⁵⁴.

2.5.1.2. La dualité des macrophages associés aux tumeurs (TAMs)

Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) ont une double fonction dans leur interaction avec les cellules tumorales. Les TAMs peuvent être différenciés en deux groupes, les macrophages M1 et les macrophages M2. Les TAMs M1 semblent être impliqués dans la sécrétion de molécules pro-inflammatoires comme l'IL-12 et le facteur de nécrose tumorale TNF- α mais également des chimiokines comme CXCL9 et CXCL10^{155,156}. Les TAMs M2 semblent quant à eux être impliqués dans la sécrétion de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le facteur de croissance tumoral TGF- β ainsi que des chimiokines comme CCL22, CCL24 et CCL18^{155,156}. Cette production différente de chimiokines permet d'attirer différentes cellules immunitaires et intègre ces deux sous-types de macrophages dans un circuit de réponse différent. Ainsi, par le biais de CXCL9 et CXCL10, les TAMs M1 semblent plutôt initier une réponse de type Th1 dont les cellules effectrices sont les cellules lymphoïdes cytotoxiques

tandis que les TAMs M2 initient plutôt une réponse de type Th2 qui favoriserait la croissance et la survie des cellules tumorales¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Au sein de la niche tumorale, il a été démontré que la stimulation des TAMs par les cytokines sécrétées par les différentes cellules du microenvironnement tumoral, comme l'IL-4 ou le TGF- β , induit une activation préférentielle vers le phénotype M2^{157,158}. Comme nous l'avons vu plus tôt, le processus d'hypermutation somatique peut introduire des sites de N-glycosylation dans la région variable des immunoglobulines chez plus de 95% des patients atteints de LF¹⁴. Il a été rapporté que les BCR fortement glycosylés ont une forte interaction avec les cellules du microenvironnement surexprimant la protéine DC-SIGN (Dendritic Cell – Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) dont les cellules dendritiques et les macrophages M2, qui, en retour, stimulent le BCR, et ce même en l'absence d'antigène (*Figure 8*)^{110,111}. De plus, il a été mis en évidence que les macrophages synthétisent la protéine matricellulaire SPARC, associée à la progression tumorale et à la migration/invasion des cellules tumorales vers d'autres sites¹⁵⁹. Par ailleurs, cette protéine matricellulaire favorise le dépôt de collagène et de fibronectine ce qui tend à favoriser le processus de migration et d'invasion des cellules tumorales¹⁵⁹.

2.5.2. ... tout en contribuant à l'échappement des cellules de lymphome folliculaire au microenvironnement antitumoral

2.5.2.1. Les cellules tumorales déjouent l'activité antitumorale des cellules lymphoïdes cytotoxiques

Il a été démontré que, dans le LF, les cellules TCD8⁺ ne sont plus en capacité d'infiltrer la tumeur et sont repoussées à la périphérie¹⁴⁸. Par conséquent, une diminution de l'infiltrat cellulaire TCD8⁺ semble corrélé à un mauvais pronostic dans le LF¹⁴⁸. Par ailleurs, la formation de la synapse immunitaire avec les cellules tumorales est fortement réduite dans les cellules TCD8⁺ infiltrant la tumeur, induisant l'incapacité de ces cellules à former des contacts synaptiques et à sécréter leur contenu cytolytique¹⁶⁰. De plus, les cellules tumorales de LF induisent l'épuisement immunitaire des cellules TCD8⁺ grâce à la sécrétion d'IL-12 qui induit l'expression de TIM-3, une protéine nécessaire à l'effet induit par l'IL-12 sur les TCD8⁺¹⁶¹. Pour les cellules NK, les mécanismes d'échappement immunitaire utilisés par les cellules tumorales

reposent sur la surexpression du ligand LLT1 (Lectin-Like Transcript 1) qui se fixe sur son récepteur CD161 exprimé par les cellules NK, bloquant ainsi leur activité cytotoxique¹⁶². Les cellules tumorales bloquent également la prolifération des lymphocytes T γ/δ en engageant l'atténuateur de lymphocytes B et T (BTLA) sur son récepteur HVEM ou TNFRSF14, ce qui génère un signal inhibiteur¹⁶³. Toutefois, ce signal inhibiteur est perdu chez environ 30 à 40% des patients atteints de LF en raison de mutations ou de délétions qui affectent HVEM, contribuant à l'échappement immunitaire¹⁶⁴.

2.5.2.2. *Les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Tfhs) favorisent la survie des cellules tumorales*

Conjointement à l'épuisement immunitaire des cellules TCD8⁺, la niche tumorale du LF s'enrichit en Tfhs¹⁶¹. Les Tfhs associés au LF sont caractérisés par l'expression de l'IL-4 et du CD40L, qui se fixe sur son récepteur transmembranaire CD40 exprimé à la surface des cellules B tumorales de LF, et qui jouent tous deux un rôle dans l'activation et la survie des cellules B tumorales de LF (*Figure 8*)^{146,165}. Au sein de la tumeur, les Tfhs qui surexpriment l'IL-4 et le CD40L permettent aux cellules tumorales de produire les chimiokines CCL17 et CCL22 favorisant ainsi le recrutement de lymphocytes T régulateurs (Tregs) et créant par conséquent un microenvironnement immunosuppresseur qui contribue à l'échappement immunitaire des cellules tumorales (*Figure 8*)¹⁶⁶. Il a en effet été démontré qu'*in vitro* les Tregs ont une activité pro-tumorale en inhibant à la fois l'activité cytotoxique des cellules TCD8⁺ et leur prolifération¹⁶⁷. Par ailleurs, la sécrétion d'IL-4 par les Tfhs et la fixation sur son récepteur induit l'activation des kinases JAK1 et JAK3 et la phosphorylation de STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6), qui va alors transcrire les gènes cibles de l'IL-4 et ainsi favoriser la survie des cellules tumorales¹⁶⁶. De plus, il a été mis en évidence que dans le LF, des mutations activatrices de STAT6 accentuent l'activation de l'axe IL-4/JAK/STAT6 et conduisent à la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire, ainsi qu'au recrutement de Tregs^{165,168}. Les Tfhs sont également nécessaires à l'interaction entre les cellules tumorales de LF, les macrophages et les cellules stromales. En effet, il a été démontré que les macrophages infiltrant la tumeur induisent la prolifération des cellules tumorales par le biais de l'IL-15 (*Figure 8*)¹⁶⁹. Ceci ne serait possible que par la coopération de l'IL-15 avec le

signal CD40L induit par les Tfh, qui renforcerait la capacité des cellules tumorales de LF à interagir avec les macrophages¹⁶⁹. Par ailleurs, l'IL-4 produite par les Tfh favoriserait i) l'activation du BCR des cellules tumorales de LF en stimulant à la fois la surexpression de la protéine DG-SIGN par les cellules dendritiques et les macrophages et de l'IgM sur les cellules tumorales et ii) la production de CXCL12 par les cellules stromales de la niche microenvironnementale du LF (*Figure 8*)^{110,170}.

2.5.2.3. *La polyvalence des cellules stromales lymphoïdes, de l'activité pro-tumorale à l'organisation spatiale de la niche tumorale*

Les FDCs, les FRCs et les cellules marginales réticulaires forment la contrepartie stromale du microenvironnement tumoral dans le LF. Lorsque ces cellules stromales infiltrant la tumeur, elles favorisent la survie des cellules tumorales de LF par divers mécanismes que nous aborderons ici. Il a été mis en évidence qu'au sein du microenvironnement tumoral, l'IL-4 produite par les Tfh favorise la production de CXCL12 par les cellules stromales ce qui permet de recruter les cellules tumorales au niveau des niches stromales et induire ainsi leur activation (*Figure 8*)¹⁷⁰. Les ligands produits par les cellules stromales dont Hedgehog, TGF- β ou encore BAFF (B-cell Activating Factor), favorisent l'activation et la croissance des cellules tumorales mais préviennent également leur apoptose¹⁷¹⁻¹⁷³. Ces cellules interagissent également par le biais de l'interaction entre VCAM-1, exprimée par les cellules stromales, et l'intégrine VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), exprimée par les cellules tumorales, qui contribuerait à la survie des cellules tumorales de LF (*Figure 8*)¹⁷⁴. Outre ces fonctions d'activation et de soutien, les cellules stromales jouent un rôle dans l'organisation de la niche tumorale par i) la sécrétion d'IL-8 qui permet le recrutement de neutrophiles pro-tumoraux au sein de la niche tumorale, qui protégeraient les cellules tumorales contre l'apoptose induite par les traitements anticancéreux et plus particulièrement le rituximab, et ii) la surexpression de la chimiokine CCL2 qui induit le recrutement de monocytes au sein de la niche tumorale et leur différenciation en TAMs anti-inflammatoires et pro-angiogéniques (*Figure 8*)^{175,176}.

2.5.2.4. *La matrice extracellulaire et ses composants, les grands oubliés du lymphome folliculaire*

Au-delà des composants cellulaires, la niche tumorale contient également des composants acellulaires qui forment la MEC. Bien que très peu étudiés, il a été proposé que les ligands de la MEC jouent un rôle dans la survie des cellules tumorales de LF^{159,170,177-180}. A titre d'illustration, il a été rapporté que l'héparanase, une endoglycosidase capable de désassembler les chaînes latérales d'héparane sulfate des protéoglycanes formant la MEC, augmente la biodisponibilité des facteurs de croissance liés à aux héparanes sulfates dont CXCL12 favorisant par conséquent la migration des cellules tumorales dans les niches stromales¹⁷⁸. Il a par ailleurs été mis en évidence dans un modèle murin que l'inhibition de l'héparanase empêche la croissance des lymphomes à cellules B ainsi que l'apparition de métastases¹⁷⁸. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la protéine matricellulaire SPARC joue un rôle important dans le dépôt de collagène favorisant ainsi le processus de migration et d'invasion des cellules tumorales¹⁵⁹. De plus, il a été démontré que les souris déplétées pour SPARC présentent une lymphomagénèse altérée ainsi qu'une infiltration réduite de la moelle osseuse par les cellules tumorales¹⁷⁹. La MEC exerce également des forces mécaniques pouvant impacter la progression de la tumeur. Dans le LF, il a été rapporté une réduction de l'expression de la podoplanine, une glycoprotéine qui régule la force contractile des cellules stromales comme les FRCs¹⁷⁰. Ces dernières permettant la formation d'un réseau réticulaire à base de collagène qui soutient la migration cellulaire, une diminution de la podoplanine entraîne une relaxation des FRCs et par conséquent une diminution de la rigidité tissulaire associée à l'expansion des cellules tumorales dans les ganglions touchés¹⁸⁰. Bien que très peu étudié, le dialogue entre la niche tumorale et les cellules tumorales a révélé l'existence de vésicules extracellulaires qui, une fois libérées par les cellules tumorales, agissent dans leur propre intérêt¹⁷⁷. En effet, il semblerait que ces vésicules extracellulaires protègent les cellules tumorales de l'action du rituximab par encapsulation de l'anticorps¹⁷⁷.

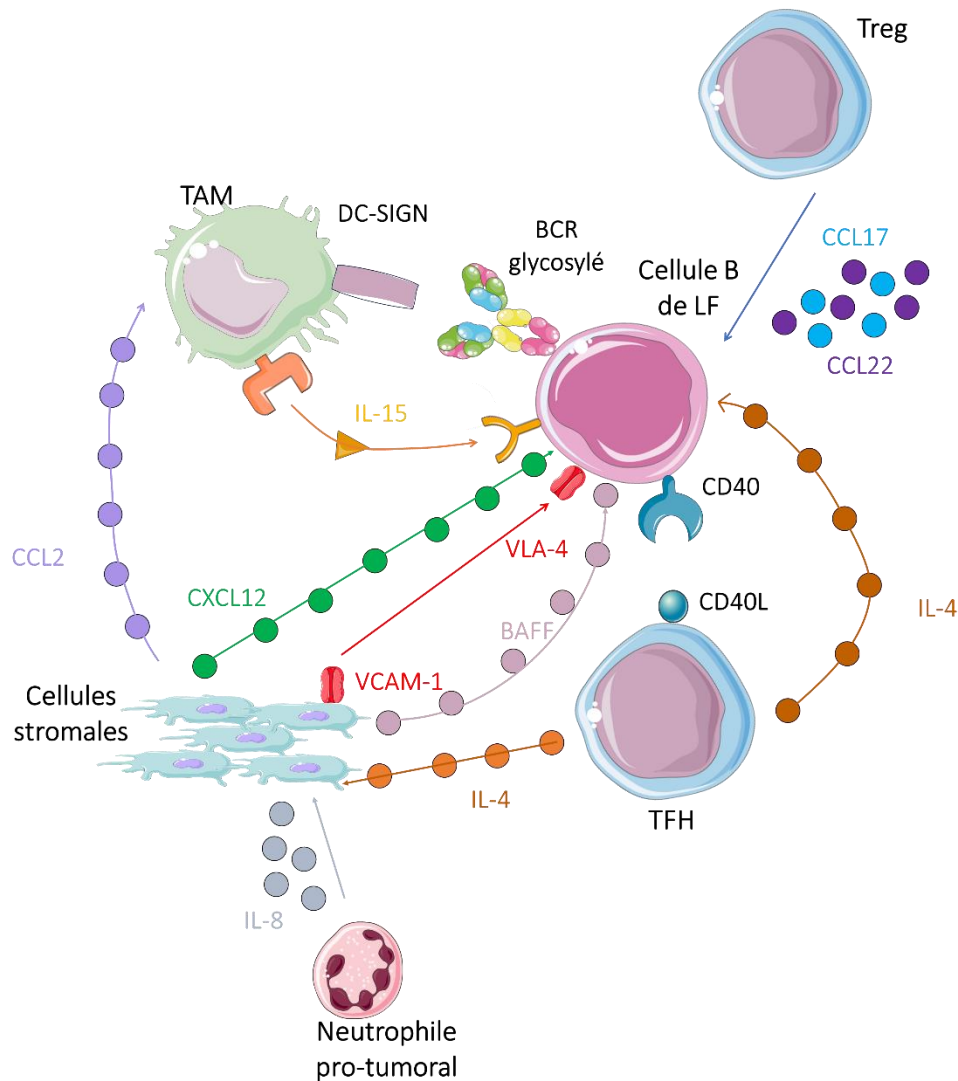


Figure 8: Interactions entre les cellules B tumorales de LF et les cellules du microenvironnement tumoral (figure originale).

Ainsi, l'ensemble des éléments composant la tumeur et son microenvironnement tumoral agissent conjointement dans la lymphomagenèse du LF et instaurent un cadre propice à la résistance aux immunochimiothérapies. Une meilleure compréhension de cette pathologie, des mécanismes de résistance induits et le développement de thérapies ciblées nécessitent de prendre en considération le microenvironnement tumoral des cellules primaires de LF. Toutefois, l'étude du LF est limitée par i) l'absence de « vraies » lignées cellulaires de LF, quand bien même leur utilisation n'est pas appropriée en raison de leur taux de prolifération trop élevé par rapport aux cellules tumorales primaires, ii) les modèles murins qui ne récapitulent pas la biologie complexe des tumeurs de LF et qui nécessitent des expériences longues et

coûteuses, iii) l'absence de modèles expérimentaux appropriés qui permettent à la fois la culture de cellules primaires de LF en présence de son microenvironnement tumoral et au sein d'une conformation spatiale rappelant l'architecture au sein de laquelle elles évoluent. Par ailleurs, l'absence de modèles pré-cliniques pertinents rend difficile l'évaluation de traitements anticancéreux en vue de prédire la réponse des patients aux traitements et d'évaluer les mécanismes impliqués dans la survie des cellules tumorales, ce qui permettrait d'identifier des cibles thérapeutiques. Ce dernier point est crucial dans le LF car malgré une caractérisation moléculaire poussée des tumeurs de LF ces dernières années, il est encore difficile de prédire la réponse d'un patient à la chimiothérapie. En effet, aucun score clinique ou biologique ne permet actuellement de stratifier correctement les patients afin d'orienter le choix du traitement. Et bien que de nombreuses thérapies ciblées aient été développées récemment (ibrutinib, venetoclax, tazemetostat...), leur rationnel d'utilisation n'est pas encore défini pour guider la stratégie thérapeutique. Bien que plus souvent conçus pour l'étude des tumeurs solides, ces dernières années ont connu l'émergence de nombreux modèles pertinents, applicables ou non aux hémopathies malignes comme le LF, dont nous parlerons dans cette deuxième partie d'introduction de thèse.

CHAPITRE 2 : L'ETUDE DES CELLULES PRIMAIRES DE LYMPHOME FOLLICULAIRE – VERS DES MODELES DE CULTURE CELLULAIRE DE PLUS EN PLUS COMPLEXES.

1. Etat de l'art : les modèles communément utilisés dans l'étude du cancer

Bien que la recherche sur le cancer ait beaucoup évolué au cours de ces dernières années, il demeure l'une des principales causes de mortalité dans le monde, avec plus de 10 millions de décès en 2020¹⁸¹, et ce malgré les efforts considérables déployés par les scientifiques pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces. Pendant des décennies, l'efficacité des thérapies a été évaluée à l'aide de modèles de culture *in vitro* et *in vivo* notamment des modèles de culture cellulaire 2D ainsi que des modèles animaux. Ils ont dès lors été le pilier de la découverte de médicaments anticancéreux et ont apporté une contribution considérable quant à l'amélioration de la prise en charge des patients. Néanmoins, il est important de noter que ces modèles ne reflètent pas fidèlement l'architecture biologique *in vivo* ainsi que la complexité de la tumeur et de son microenvironnement. En effet, il a été mis en évidence dans ces études, qu'à l'inverse des modèles de culture 3D, la culture des cellules tumorales en 2D induit un écart important dans la réponse aux traitements anticancéreux, où le bénéfice clinique réel de ces traitements pour les patients n'est pas fidèlement représenté¹⁸²⁻¹⁸⁴. Ceci a alors pour conséquence l'exclusion de certaines molécules au stade pré-cliniques, lors d'essais *in vitro* ou chez l'animal, qui pourraient être réellement efficaces *in vivo* chez l'Homme. Il est donc nécessaire d'améliorer les systèmes de culture et d'utiliser des modèles représentant davantage la tumeur, ce qui favoriserait la découverte et l'évaluation de médicaments anticancéreux¹⁸⁵. Pour ce faire, il est nécessaire de prendre en considération le fait que les tumeurs ne représentent pas seulement une masse de cellules cancéreuses mais un écosystème complexe et organisé que ce soit au sein des hémopathies malignes ou des tumeurs solides, dont le centre est caractérisé par un niveau d'hypoxie important ainsi qu'un pH extracellulaire bas¹⁸⁵. Comme nous l'avons vu en première partie, le microenvironnement est essentiel aux cellules tumorales. Ces dernières interagissent avec les cellules alentours et reçoivent divers signaux physiques et biochimiques contribuant à l'instauration d'un

environnement immunosuppresseur qui favorise l'échappement immunitaire et la progression tumorale. Par conséquent, il est crucial d'avoir une meilleure compréhension de l'interaction entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, par l'utilisation de modèles récapitulants de façon pertinente l'ensemble de la niche tumorale.

1.1. La culture cellulaire en deux dimensions (2D)

1.1.1. Vue d'ensemble de la culture 2D, avantages et inconvénients

Les modèles traditionnels de culture cellulaire 2D sont largement utilisés dans le domaine de la recherche sur le cancer, et plus particulièrement au cours de la phase préclinique du développement des médicaments. L'une des raisons principales réside dans le fait que, par rapport aux modèles murins, la culture cellulaire en 2D représente un coût moins élevé pour des études à grande échelle, tout en permettant un fort taux de reproductibilité ainsi qu'une interprétation facilitée des résultats (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*). La plupart des modèles de culture 2D rapportent l'utilisation préférentielle de lignées cellulaires cancéreuses. Toutefois, bien qu'elles dérivent de patients et soient facilement manipulables en laboratoire, les lignées cellulaires ne récapitulent pas entièrement les caractéristiques de la tumeur primaire. De plus, la culture sur le long terme et les nombreux passages cellulaires peuvent provoquer des altérations à la fois génotypiques et phénotypiques, résultant en une perte de la génétique de la tumeur d'origine^{186,187}. Ceci explique en partie les écarts de résultats observés pendant les essais cliniques, à la suite d'expériences menées en culture 2D *in vitro*. Par ailleurs, les propriétés physiques et physiologiques de la culture 2D sont responsables de l'incapacité des cellules à maintenir une morphologie normale ce qui entraîne une modification dans l'organisation des récepteurs à la surface cellulaire, les rendant plus sensibles aux effets des médicaments (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*)^{188,189}. En effet, en culture 2D, les cellules sont cultivées en monocouche sur du plastique de polystyrène, conduisant à la perte de voies de signalisation cellulaires cruciales et à des changements dans les réponses cellulaires aux stimuli. Ces surfaces de culture ne sont pas naturelles pour les cellules, elles sont rigides ce qui altère non seulement la prolifération et la différenciation cellulaire mais également la sensibilité aux traitements anticancéreux¹⁹⁰. Il a été démontré que la culture 2D dénature la

forme originelle des cellules qui prennent alors l'apparence de cellules plates et allongées¹⁹¹. De même, dans ces conditions, les cellules ne parviennent pas à maintenir leur polarisation de base¹⁹¹. A l'inverse de la culture 3D où la prolifération cellulaire demeure réaliste en fonction des interactions avec la MEC, la cinétique de croissance des cellules cultivées en 2D diffère significativement avec une prolifération anormalement rapide¹⁹¹. En définitive, bien que la culture 2D ait permis de grandes avancées dans le domaine de la recherche sur le cancer, elle ne permet pas de reproduire l'architecture spécifique observée dans les tumeurs ainsi que les interactions spécifiques et dynamiques du microenvironnement tumoral. En effet, les interactions cellule-cellule, bien qu'essentielles pour la régulation des voies de signalisation ainsi que l'expression génique, sont moins importantes et sous-représentées dans les cultures 2D (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*)¹⁹¹.

1.1.2. L'optimisation de la culture 2D, une nécessité pour perpétuer l'emploi de ce modèle

En vue d'étudier le LF et les interactions avec son microenvironnement tumoral, l'optimisation de cette méthode de culture est indispensable. Dans la littérature, l'incorporation exogène de différents types cellulaires est fréquemment observée, notamment des cellules du microenvironnement tumoral comme des cellules immunitaires, des cellules stromales ou encore des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)^{143,192-194}. Plusieurs études rapportent par exemple la co-culture de cellules B CD19⁺ dérivées de PBMC avec des cellules fibroblastiques murines exprimant le CD40L humain^{195,196} mais également l'amélioration de la survie cellulaire de plasmocytes grâce à l'ajout de cytokines dans le milieu de culture, dont l'IL-2, l'IL-10, l'IL15, l'IL6 et l'IFN- γ ^{197,198}. Une autre étude rapporte que l'optimisation des conditions de culture, par l'addition de cytokines mais aussi de PBMC, a permis le maintien des cellules B normales sur une période de 14 jours¹⁹⁹. Ainsi, ces différents moyens d'optimisation permettent de représenter dans une moindre mesure les différentes communications cellule-cellule retrouvées au sein des tumeurs afin de reproduire partiellement le microenvironnement tumoral, ce qui constitue en soi un modèle intéressant pour l'étude des interactions fonctionnelles^{183,200}. Néanmoins, la reconstruction d'un pseudo-microenvironnement tumoral est illusoire car l'ensemble de ces cellules ne proviennent pas du stroma intratumoral endogène

et l'aspect monocouche de la culture 2D ne reproduit pas l'architecture tridimensionnelle observée *in vivo*. Par ailleurs, la MEC, composant du microenvironnement tumoral jouant un rôle crucial dans le développement et la progression tumorale, n'est pas modélisée en culture 2D, ce qui témoigne de la nécessité à développer un modèle plus pertinent et représentatif des tumeurs.

1.1.3. La place de la culture 2D dans les hémopathies malignes

En raison de la forte dépendance des cellules de lymphomes ou des cellules leucémiques à leur microenvironnement tumoral, il a été démontré qu'il est très délicat de les maintenir en culture 2D en l'absence de leur microenvironnement tumoral. En effet, lorsqu'elles sont cultivées seules *in vitro*, les cellules leucémiques subissent rapidement l'apoptose cellulaire. L'addition de cellules stromales ou de facteurs solubles permet néanmoins de prolonger leurs survies^{201,202}. Toutefois, au sein du système de culture 2D et même en présence de facteurs exogènes, la survie des cellules leucémiques est limitée ce qui laisse supposer que des éléments essentiels présents *in vivo* sont absents de la culture 2D. Ceci encourage donc le développement de modèles de culture plus pertinents permettant l'étude de la leucémie afin de comprendre davantage l'impact du microenvironnement tumoral sur la survie des cellules cancéreuses. De la même manière, lorsque les cellules primaires de LBDGC ou de LF sont cultivées seules *in vitro* en culture 2D, elles meurent très rapidement. En effet, il a été démontré qu'au bout de 7 jours, 98% des cellules primaires de LBDGC meurent lorsqu'elles sont cultivées seules *in vitro*²⁰³. De même, il a été mis en évidence par le travail de Goval et al. que les cellules primaires de LF subissent une apoptose spontanée lorsqu'elles sont cultivées seules *in vitro* pendant une durée de 6 jours (*résumé dans le Tableau 3, voir page 109-110*)¹⁴³. Toutefois, la culture de ces cellules dans une plaque pré-ensemencée d'1 million de cellules HK, une lignée cellulaire semblable aux FDCs et dérivée d'amygdales humaines, induit une apoptose cellulaire de 30 à 40% à J6 contre 80% lorsqu'elles sont cultivées seules, témoignant ainsi de l'effet protecteur des HK contre l'apoptose spontanée des cellules primaires de LF¹⁴³. L'importance de l'interaction entre les HK et les cellules primaires de LF a par ailleurs été mise en évidence lorsqu'après 6 jours de culture, celles n'ayant pas adhéré aux HK présentent un pourcentage d'apoptose plus élevé par rapport à celles ayant adhéré aux HK

(55% vs 6% respectivement). Il est mentionné dans la littérature que certaines cytokines jouent un rôle crucial dans la survie des cellules de lymphomes^{204,143,205,169}. Il s'avère que la lignée cellulaire HK produit *in vitro* de l'IL-15 fonctionnellement active à leur surface et que par contact cellule-cellule, elle augmente la prolifération des cellules B du GC²⁰⁶. Il est important de noter que, contrairement aux autres cytokines sécrétées, l'IL-15 fonctionne sur le principe de la trans-présentation²⁰⁷ et que l'ajout d'IL-15 soluble n'a aucun effet (*Figure 9*). En effet, cette cytokine existe principalement liée à la protéine IL-15R α et ce n'est que lorsque ce complexe est acheminé vers la surface cellulaire, qu'il peut stimuler les cellules opposées par le biais du complexe récepteur $\beta/\gamma C$.

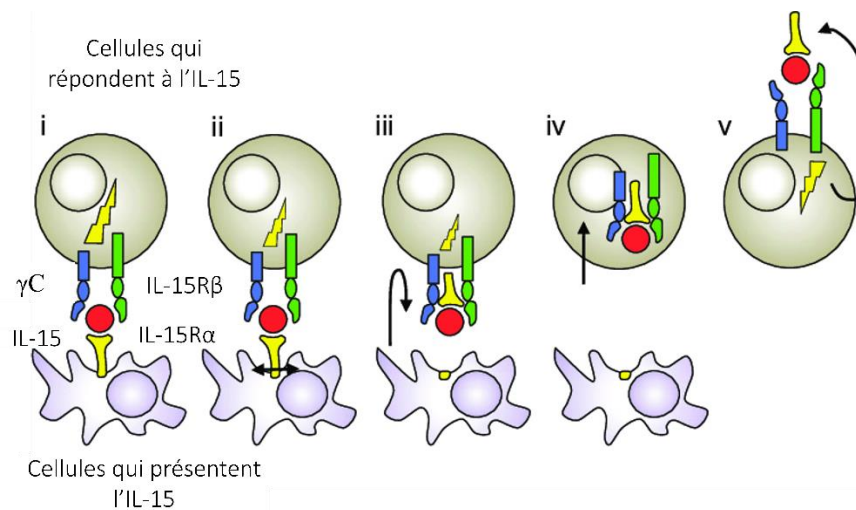


Figure 9: Représentation schématique du processus de trans-présentation (d'après Tamzalit et al. *Proc Natl Acad Sci*, 2014²⁰⁸).

Il a par ailleurs été démontré que, dans le LF, les monocytes et les TAMs trans-présentent l'IL-15 et travaillent de façon synergique avec les Tfh qui expriment le CD40L afin de promouvoir la prolifération des cellules tumorales (*Figure 10*)¹⁶⁹. En effet, il a été rapporté dans cette étude que lorsque les cellules primaires de LF sont co-cultivées avec des TAMs issus d'échantillons de LF, la trans-présentation de l'IL-15 par les TAMs n'est pas suffisante à elle seule pour soutenir la croissance *in vitro* des cellules tumorales. Toutefois, la co-culture de TAMs avec des cellules de LF pré-stimulées avec du CD40L a mis en évidence une petite fraction de cellules de LF engagées dans la division cellulaire, en réponse à la stimulation par le CD40L mais également à

la trans-présentation de l'IL-15 par les TAMs qui renforcent leur prolifération (résumé dans le Tableau 3, voir page 109-110).

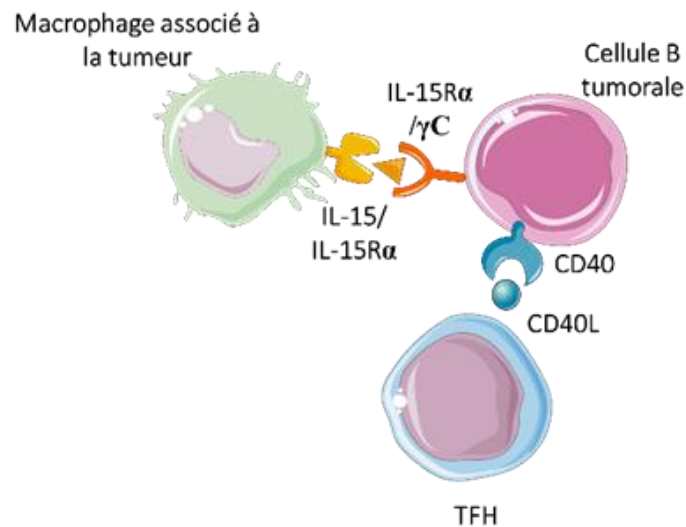


Figure 10: *Processus de coopération entre les macrophages associés à la tumeur et les Tfh en vue d'activer les cellules B tumorales (d'après Epron et al. Leukemia, 2012¹⁶⁹).*

L'ensemble de ces observations confirme la nécessité de récapituler, au moins dans une certaine mesure, le réseau microenvironnemental complexe et interactif de ces pathologies afin de soutenir la survie des cellules primaires *in vitro*. Il est cependant important de souligner que travailler sur des biopsies fraîches de leucémie ou de lymphomes est assez difficile. Les échantillons disponibles sont généralement des échantillons congelés et les cellules du microenvironnement tumoral ne résistent pas à la décongélation, mis à part les cellules T qui semblent être plus immuables²⁰³ (et données personnelles). Il est donc fréquent d'incorporer des cellules et des signaux permettant de cultiver les cellules primaires de lymphomes sur des temps plus ou moins longs afin de pouvoir les étudier. Néanmoins, et pour toutes les raisons citées plus haut, il est nécessaire de développer un modèle plus pertinent et représentatif de l'architecture observée *in vivo*, ce qui n'est pas le cas de la culture en 2D.

1.2. Le modèle murin, fidèle représentant de l'expérimentation animale *in vivo*

Depuis de nombreuses années, les médicaments destinés à l'Homme sont au préalable testés sur des animaux au cours d'études précliniques. Pour garantir la sûreté du médicament, il doit être étudié sur au moins deux modèles mammifères d'animaux, le plus souvent un rongeur (le rat ou la souris) et un non rongeur (le chien ou le singe)²⁰⁹. Bien que l'expérimentation animale soit une pratique très encadrée par des dispositifs éthiques et réglementaires qui permettent de garantir le respect ainsi que la bientraitance des animaux utilisés (https://database.ich.org/sites/default/files/S9_Guideline.pdf)²¹⁰, leur utilisation à des fins de recherche suscite des interrogations éthiques et morales au sein de la société comme parmi les chercheurs, et traduit une volonté de minimiser leur emploi. Toutefois, l'Homme et la souris (*Mus musculus*) ont 99% de gènes homologues²¹¹, en faisant ainsi un modèle précieux et indispensable pour étudier les mécanismes de développement tumoral et les réponses aux traitements. De ce fait, les modèles murins représentent le modèle animal le plus couramment utilisé *in vivo*.

1.2.1. Les modèles murins syngéniques

Il s'agit du plus ancien modèle préclinique *in vivo*. Il repose sur l'isolement de lignées de cellules tumorales spontanées transgéniques ou induites par des carcinogènes, ensuite greffées sur des souches de souris génétiquement identiques, comme BALB/c ou C57BL/6, afin d'établir un système porteur de tumeurs²¹². L'avantage majeur dans l'utilisation de souris syngéniques repose sur le fait qu'elles conservent un système immunitaire intact, en faisant ainsi un modèle de choix pour étudier les réponses immunitaires antitumorales et l'efficacité des immunothérapies anticancéreuses (résumé dans le Tableau 2, voir page 88)^{213,214}. On note néanmoins dans ce modèle l'absence d'hétérogénéité génomique et microenvironnementale propre au cancer²¹². L'hétérogénéité tumorale interpatient et intrapatient est l'un des principaux défis pour le développement de thérapies efficaces contre le cancer et le développement d'un système préclinique pour étudier les immunothérapies devrait pouvoir modéliser efficacement cette hétérogénéité.

1.2.2. Les modèles murins génétiquement modifiés (GEMMs)

Les progrès de la recherche sur la génétique du cancer ont permis l'émergence de modèles murins génétiquement modifiés. Ce modèle repose principalement sur l'incorporation d'altérations génomiques spécifiques qui conduisent à la transformation néoplasique de cellules normales et donc au développement tumoral. La modification génétique peut se faire par i) l'insertion aléatoire d'un transgène qui permet de réguler à la hausse un gène cible, ii) un « knock-in » où le gène d'intérêt sauvage (Wild Type, WT) ou muté est inséré sous le contrôle du promoteur ou de séquences régulatrices du gène cible ou iii) un « knock-out » qui consiste en une délétion du gène d'intérêt par recombinaison homologue ou par le système CRISPR-Cas9 qui coupe l'ADN afin de permettre l'édition génétique²¹⁵. Le modèle transgénique E μ -Myc qui combine le gène c-Myc avec un « enhancer » IgH est un modèle intéressant dans le cadre du lymphome car 90% des descendants issus de ces souris développeront des lymphomes spontanés d'origine B²¹⁶. Le « knock-in » est une méthode avantageuse car elle permet d'étudier l'effet des mutations gain de fonction dans le développement des lymphomes²¹⁷ tandis que le « knock-out » est intéressant pour étudier l'impact du blocage de la signalisation dans le développement des lymphomes et pour identifier les gènes essentiels dans ces pathologies²¹⁸. L'avantage majeur de ce modèle repose sur une progression graduelle de la tumeur accompagnée par son microenvironnement tumoral, en faisant ainsi un modèle particulièrement intéressant dans l'étude des immunothérapies (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*). Cependant et contrairement à ce qu'il se passe chez l'Homme, l'utilisation de promoteurs spécifiques au sein des cellules d'intérêts entraîne la transformation de toutes les cellules, aboutissant à la surexpression ou à la suppression d'un certain nombre de gènes et à une charge mutationnelle qui peut ainsi différer de celle observée chez l'Homme^{219,220}. Le principal inconvénient de ce modèle réside dans la latence du développement néoplasique, qui peut varier considérablement en fonction des mécanismes utilisés pour induire le développement tumoral mais qui peut néanmoins être réduit par l'utilisation de promoteurs ciblant plusieurs oncogènes ou suppresseurs de tumeurs, augmentant ainsi la pénétrance et diminuant la latence de développement (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*)²²¹⁻²²³. L'autre inconvénient particulièrement pertinent qu'on retrouve dans ce modèle, mais aussi dans le modèle syngénique, est le phénomène de réactivité croisée de la cible immunitaire murine avec la cible humaine correspondante. En effet, en vue de

développer de nouvelles immunothérapies spécifiques de l'antigène humain, il est nécessaire que le marqueur de surface humain soit uniquement présent sur les cellules immunitaires ou tumorales humaines et absent des cellules murines. Afin de pallier cet effet, cette étude a permis la mise au point d'un modèle GEMMs qui intègre le CMH de classe 1 et le CMH de classe 2 humain afin d'évaluer la réponse immunitaire humaine sans interférence avec la réponse du CMH de la souris grâce à un « knock-out »²²⁴. Ce dernier point illustre spécifiquement les défis sous-jacents qui entravent l'utilisation de ces modèles murins.

1.2.3. Les modèles murins xénogreffés

Bien que ce modèle puisse être utilisé avec des lignées cellulaires cancéreuses, il est souvent caractérisé par l'implantation d'un fragment tumoral de patient chez des souris immunodéprimées, appelé PDX pour Xénogreffes Dérivées de Patients. L'état d'immunodéficiences des souris est nécessaire afin que la réponse immunitaire de l'hôte n'induit pas le rejet de la xénogreffe et pour permettre le développement des cellules cancéreuses *in vivo*. Les taux de succès de la transplantation dépendent des caractéristiques de la tumeur. En effet, il a été montré que les tumeurs agressives, récidivantes et hautement métastatiques sont celles ayant un bon succès de transplantation²²⁵. La transplantation peut se faire à divers endroits mais la transplantation sous-cutanée et la transplantation orthotopique sont les méthodes les plus couramment utilisées, bien que cette dernière soit généralement préférée car elle présente un microenvironnement plus proche du cancer humain²²⁶. En ce qui concerne les hémopathies malignes, comme la leucémie ou le myélome multiple, la transplantation de cellules tumorales primaires doit se faire directement dans la circulation sanguine ou dans la moelle osseuse²²⁷. Pour les lymphomes, les cellules tumorales primaires peuvent être administrées par voie sous-cutanée, orthotopique, intrapéritonéale ou intravasculaire par la veine de la queue, une voie avantageuse pour étudier la dissémination de la pathologie²²⁸. Dans cette étude, il a été observé que pour beaucoup de lymphomes, tels que le LBDGC, le lymphome de la zone marginale ou le LF, l'implantation de fragments tumoraux dérivés de patients dans des souris immunodéficientes appelées NSG (NOD scid gamma mouse) se fait au niveau de la zone sous-capsulaire rénale²²⁹. L'avantage de ce modèle réside dans le fait que la greffe d'un morceau de tumeur chez des souris immunodéficientes permet de

prendre en compte les caractéristiques de la tumeur primaire, en retenant à la fois l'hétérogénéité tumorale, les mutations retrouvées au sein de la tumeur et le microenvironnement tumoral (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*)²²⁶. Ainsi, ce modèle constitue un outil intéressant pour l'étude de la tumeur et du processus métastatique ainsi que pour le développement et le screening de médicaments anticancéreux. Néanmoins, l'utilisation d'un grand nombre d'animaux, la procédure de greffe, l'entretien des PDX et le profilage moléculaire permettant d'évaluer si la tumeur isolée de la souris reproduit la tumeur originale du patient sont très coûteux et en font une limitation quant à l'utilisation de ce modèle pour des études à grande échelle. De plus, le processus de prise de greffe ainsi que le test de médicaments anticancéreux dans ce modèle est chronophage, ce qui compromet la potentielle prise en charge du patient dont la tumeur peut avoir évolué ou métastasé depuis¹⁸⁵.

1.2.4. Les modèles murins humanisés

Comme l'utilisation de souris en état d'immunodéficience rend particulièrement difficile l'évaluation de l'impact du système immunitaire sur les cellules tumorales²³⁰, l'avènement de modèles humanisés a permis de s'affranchir partiellement de cette limitation. En effet, l'utilisation de souris dont le système immunitaire est inexistant et auxquels on injecte des cellules souches humaines, dérivant du sang de cordon ombilical ou du tissu fœtal, permet le développement des principaux composants du système immunitaire humain comme les lymphocytes B, T, les NK, les macrophages et les cellules dendritiques²³¹. Ce modèle particulièrement innovant est notamment très utilisé dans le domaine de la recherche sur le virus Epstein-Barr (EBV) pour sa capacité à mimer les lymphomes B EBV⁺ chez l'Homme^{232,233} et peut également être utilisé pour tester l'efficacité des immunothérapies et prédire la réponse des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules²³⁴. Il demeure néanmoins très compliqué à mettre en place et relativement coûteux (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*).

Bien que les modèles murins représentent un outil indispensable pour étudier les caractéristiques du cancer humain, les limitations présentées ci-dessus peuvent compromettre

les résultats expérimentaux et avoir un bénéfice réduit pour le patient. En effet, le développement de la tumeur peut prendre jusqu'à un an pour certaines tumeurs, notamment pour le LF avec des temps de prise de greffe et de développement du lymphome pouvant aller de 10 à 18 mois²³⁵. Ceci illustre la difficulté quant à l'amélioration rapide de la prise en charge des patients. Par ailleurs et malgré les avancées actuelles obtenues grâce à l'expérimentation animale *in vivo* de même que les modèles de culture cellulaire 2D, l'évaluation préclinique de l'efficacité et de la toxicité des médicaments est insuffisante et ne permet pas leur accréditation pour les essais cliniques sur des sujets humains. De ce fait, environ 40% des médicaments nouvellement développés montrent trop peu d'efficacité au cours des essais cliniques, et ce même après une évaluation préclinique *in vivo*²³⁶. L'ensemble de ces éléments souligne par conséquent la nécessité de développer des modèles standardisés à la fois abordables et rapides, facile d'utilisation et de mise au point.

2. La transition vers la culture cellulaire en trois dimensions (3D)

La recrudescence des modèles de culture 3D s'explique par la nécessité de développer un modèle qui permette à la fois de récapituler la biologie complexe des tumeurs humaines natives, de l'architecture tumorale aux interactions cellules-cellules et cellules-matrice²³⁷, de minimiser les procédures d'expérimentation animale et de s'affranchir des biais rencontrés lors de l'utilisation des modèles de culture cellulaire 2D et des modèles animaux notamment en ce qui concerne l'efficacité des molécules testées. Il a été démontré qu'en règle générale, le phénotype des cellules varie considérablement en fonction de la façon dont elles sont cultivées, en plaques 2D ou au sein d'une structure 3D. Toutefois, la plupart des études ayant rapporté une altération de la forme des cellules ou de leur comportement lorsqu'elles sont cultivées en 2D vs 3D, portent sur les tumeurs solides et des études comparables concernant les LNH font actuellement défaut. Ainsi, et de façon similaire à l'*in vivo*, ces études rapportent que les cellules cultivées en 3D conservent une morphologie plus naturelle, petites et rondes, tandis qu'en 2D les cellules présentent une forme allongée^{191,238,239}. De plus, l'étude des gènes différentiellement exprimés suite à la culture des cellules dans l'une ou l'autre condition (2D vs 3D) a révélé la surexpression de gènes se rapportant au cytosquelette et à la contractilité des cellules lorsqu'elles sont cultivées en plaque 2D, de gènes impliqués dans le remodelage de la

MEC et de gènes impliqués dans l'adhésion focale, conduisant à une activation anormale des cellules²³⁸. Concernant la croissance cellulaire, il a été rapporté que les gènes liés à la prolifération cellulaire sont davantage surreprésentés en 2D qu'en 3D, soulignant les changements que subissent les cellules en réponse à la dimensionnalité^{238,240}. Par ailleurs, il a été observé qu'en 3D les cellules sont fréquemment à des stades cellulaires différents contrairement au manque d'hétérogénéité observé en culture 2D où après plusieurs passages, les lignées cellulaires cancéreuses sont toutes au même stade cellulaire^{237,241}. Enfin, contrairement aux modèles murins, les modèles cellulaires 3D sont plus accessibles et généralement moins coûteux.

2.1. L'auto-organisation cellulaire, un processus ancestral immuable

La capacité d'auto-organisation des cellules de mammifères a été très tôt mise à profit afin de développer des cultures 3D à partir de tissus primaires (*Figure 11*). En effet, dès les années 1900, des expériences de dissociation-réagrégation ont été réalisées dans l'optique de recréer des organismes entiers. La première tentative fut réalisée par Henry Van Peters Wilson en 1907, avec la réorganisation *in vitro* de cellules spongieuses après dissociation²⁴². Plus tard, d'autres groupes ont réalisé les mêmes expériences à partir de pronéphros d'amphibiens et également d'embryons de poulet²⁴³. Les années 1980 signent le début des recherches sur les cellules souches après l'isolement de cellules souches pluripotentes (PSC) à partir d'embryons de souris^{244,245}. Ce n'est cependant qu'en 1998 que les scientifiques parviennent à isoler et à cultiver pour la première fois des cellules souches embryonnaires dérivées de blastocystes humains²⁴⁶. La reprogrammation de fibroblastes humains et murins a par la suite permis la culture de cellules souches pluripotentes induites (iPSC), contribuant à un impact significatif dans la recherche sur les cellules souches mais également sur les organoïdes^{247,248}. Le terme organoïde fait référence à la culture *ex vivo* de cellules au sein d'un environnement tridimensionnel (3D) prédéfini. Les organoïdes peuvent être dérivés de cellules souches pluripotentes ou de progéniteurs d'organes isolés qui se différencient pour former un tissu qui contient plusieurs types cellulaires ayant la capacité de s'auto-organiser en une structure qui présente une physiologie et des caractéristiques semblables à l'organe miniaturisé²⁴⁹. Au sein des modèles d'organoïdes, il a été retrouvé des processus organisationnels similaires à ceux

observés au cours des premiers stades de l'organogenèse chez l'Homme. Parmi eux sont retrouvés (i) le processus de « tri cellulaire » qui correspond à la capacité qu'ont les cellules à se réorganiser et à se séparer pour former des structures avec des propriétés histogéniques quasi similaires à celles retrouvées *in vivo*, et (ii) le processus d' « engagement de lignage restreint dans l'espace », qui implique la notion de contrôle spatio-temporel du destin cellulaire (division, quiescence, localisation, différenciation et mort)²⁵⁰. Ces processus nécessitent l'activation de diverses voies de signalisation médiée par l'environnement intrinsèque et extrinsèque (stress, nutriments, signaux intercellulaires, MEC...). Dans les années 1980, il était très difficile de faire de la culture organotypique sur le long terme, notamment en raison de lésions tissulaires induites par une insuffisance nutritionnelle²⁵¹. Mais très récemment, au sein d'un modèle d'organoïdes rénaux dérivés d'iPSC, il a été observé la formation d'une vascularisation dans des conditions définies sans aucun facteur de croissance endothélial vasculaire exogène²⁵². De nos jours, l'importance du microenvironnement est largement admise mais cela n'a pas toujours été le cas. En effet, ce n'est qu'en 1987 que l'équipe de Mina Bissel a mis en évidence que les interactions cellule-matrice étaient indispensables à la réorganisation tridimensionnelle d'épithéliums mammaires en forme de canaux²⁵³. Par ailleurs, la culture de ces épithéliums sur une MEC induit la capacité de ces cellules à synthétiser et sécréter des protéines de lait. Il a également été mis en évidence que les cellules épithéliales alvéolaires de type II ne maintiennent leur différenciation qu'en présence de MEC, soulignant l'importance de cette interaction²⁵⁴. La réelle transition entre la 2D et la 3D s'est faite progressivement dans les années 2000, notamment avec les travaux d'Eiraku et al. qui sont parvenus à générer du tissu de cortex cérébral à partir de cellules souches embryonnaires (ESC), grâce à la méthode de culture d'agrégation 3D²⁵⁵. Bien que de nombreux systèmes de culture aient été mis au point au cours de ces années, aucune méthode n'a permis de maintenir les cellules en culture sur du long terme. Cependant, en 2009, Sato et al. ont permis une avancée majeure dans le domaine de la culture d'organoïdes intestinaux, avec le maintien d'une structure organoïde pendant 8 mois, dont les caractéristiques phénotypiques sont restées inchangées²⁵⁶. Dès lors, de multiples modèles 3D dérivés de tumeurs solides tels que des organoïdes cérébraux, prostatiques ou encore pulmonaires ont été développés²⁵⁷⁻²⁵⁹. Le développement de modèles 3D appropriés à l'étude des LNH n'a cependant pas connu le même intérêt et les modèles actuellement utilisés, et dont nous reparlerons un peu plus loin, sont adaptés à partir de ceux utilisés pour les tumeurs solides.

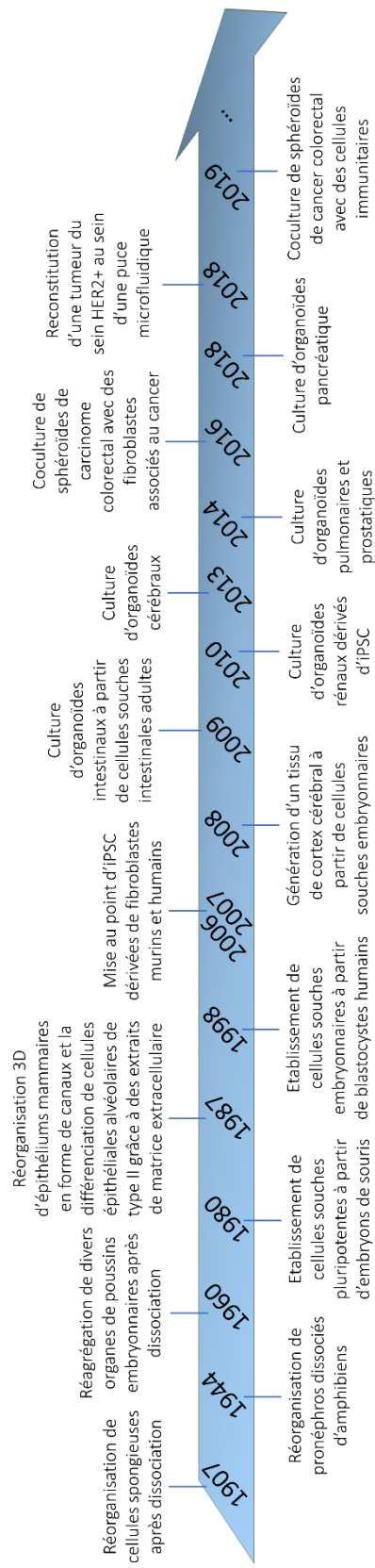


Figure 11: Chronologie retraçant le développement de la culture cellulaire 3D.

L'ensemble de ces travaux, le large éventail de types de tissus pouvant être étudiés, la capacité d'expansion à long terme ainsi que l'architecture tridimensionnelle physiologique de la culture 3D en font une contrepartie intéressante aux modèles *in vivo* animaux et *in vitro* 2D, et ont permis l'émergence de nombreux modèles dont nous détaillerons le mécanisme, les applications ainsi que les avantages et inconvénients au cours des prochains paragraphes.

2.2. Les différents modèles de culture 3D

2.2.1. Les modèles sphéroïdes

Le modèle sphéroïde a longtemps été considéré comme la référence en matière de modèle 3D *in vitro*¹⁹¹. Il s'agit d'un modèle sphérique, caractérisé par une morphologie bien arrondie, la présence de cellules cancéreuses et la capacité de maintien de ces cellules en tant que « culture flottante ». C'est après plusieurs jours de culture que le phénomène de sphéroïdisation, qui peut nécessiter de 2 jours à plusieurs semaines, se produit^{260,261}. Les cellules non-adhérentes qui évoluent dans le milieu établissent des interactions complexes entre elles et s'agrègent naturellement pour former des sphéroïdes. Ces structures se développent de manière tridimensionnelle *in vitro*, que ce soit avec ou sans l'utilisation de biomatériaux imitant la MEC. Une fois agrégées, les cellules sont stables pendant plusieurs semaines, permettant l'utilisation de ce système de culture pour étudier les effets à long terme de médicaments anticancéreux¹⁸⁵. L'intérêt de ces sphéroïdes est qu'ils ont la capacité de reproduire à la fois une architecture (à la fois la morphologie, la topographie ainsi que l'organisation cellulaire) et un métabolisme proche de ce qui est retrouvé dans le tissu d'origine²³⁷. Il a en effet été retrouvé, au sein de ces sphéroïdes, un gradient de nutriments avec notamment une distribution du glucose, une accumulation de lactate et une distribution d'ATP²⁶² mais également un gradient gazeux à l'origine de zones dépourvues ou faibles en oxygène, légitimant ce modèle pour explorer les mécanismes de l'hypoxie en cancérologie, notamment pour les cancers solides (*résumé dans le Tableau 2, page 88*) (*Figure 12*)¹⁹¹. La taille d'un sphéroïde peut aller jusqu'à 500 μm et il est généralement divisé en trois zones, avec respectivement de son noyau à sa périphérie^{191,263} :

- Un noyau nécrotique/apoptotique
- Une zone intermédiaire composée de cellules quiescentes évoluant dans un environnement faible en oxygène et en nutriments
- Une zone périphérique au sein de laquelle on retrouve des cellules prolifératives qui miment la croissance tumorale

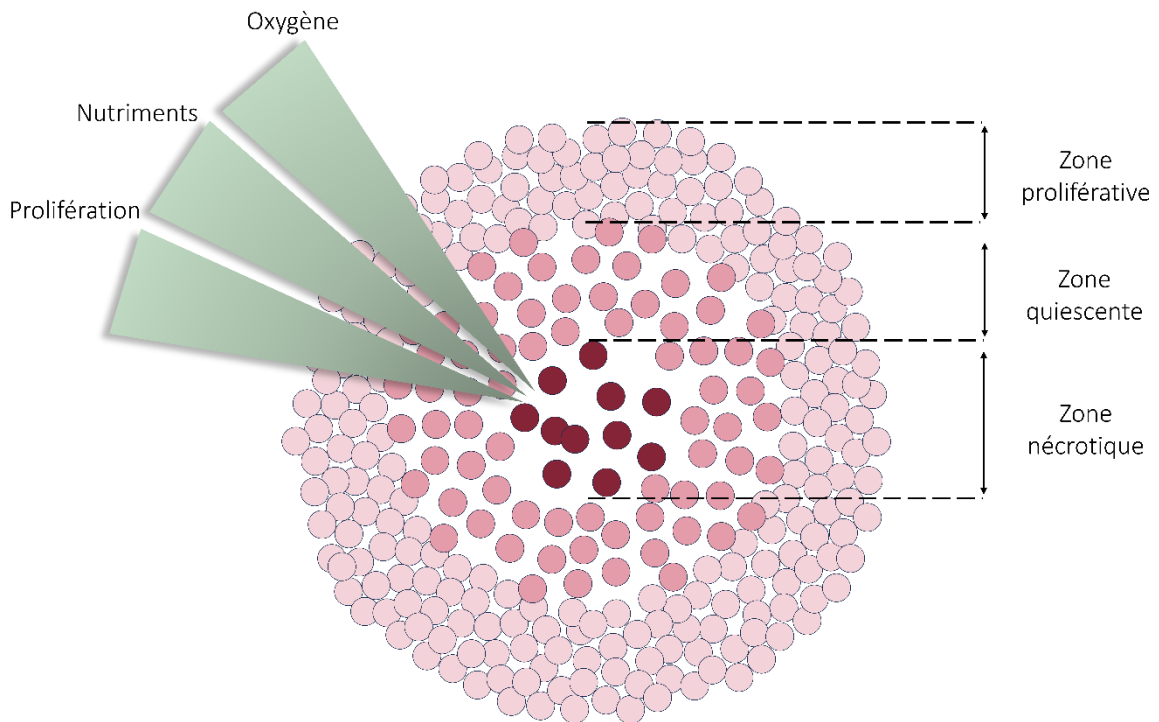


Figure 12: Représentation schématique d'un sphéroïde (d'après Dini et al. J R Soc Interface, 2016²⁶⁴).

En fonction de l'origine cellulaire et des méthodes de culture permettant de générer les sphéroïdes, on peut identifier 4 types de sphéroïdes : 1) les sphéroïdes tumoraux multicellulaires (MCTS), 2) les tumorosphères, 3) les sphéroïdes tumoraux dérivés de tissus (TDTS) et 4) les sphéroïdes multicellulaires organotypiques (OMS).

2.2.1.1. Les sphéroïdes tumoraux multicellulaires (MCTS)

Le modèle de sphéroïdes tumoraux multicellulaires ou MCTS a émergé dans les années 1970 grâce aux travaux du groupe Sutherland²⁶⁵. Il s'agit du modèle le mieux caractérisé et le

plus couramment utilisé pour les tumeurs solides car il permet une bonne représentation de la diffusion et de l'échange d'oxygène, de nutriments et d'autres facteurs solubles²⁶⁶. Ces sphéroïdes sont générés à partir de suspensions monocellulaires, le plus souvent des lignées cellulaires tumorales cultivées dans des conditions non-adhérentes et sans apport de MEC exogène (résumé dans le Tableau 2, voir page 88). Parmi les techniques qui permettent de générer facilement les MCTS, on retrouve :

- La technique de recouvrement liquide : cette méthode consiste à placer les cellules tumorales sur un support de culture plastique (plaque de culture, flasques ou boîte de Pétri) initialement recouvert d'une fine couche de substrat inerte comme l'agar ou l'agarose^{267,268}. Avant d'ajouter les cellules ainsi que le milieu de culture complémenté en sérum de veau fœtal (ou SVF), cette fine couche doit d'abord sécher afin que les cellules puissent se développer et s'agréger sans adhérer au support (Figure 13). Il est toutefois possible d'optimiser la formation des sphéroïdes en ensemençant les cellules dans des plaques spécifiques sans aucun revêtement, établies pour leurs propriétés de faible adhérence (Ultra Low Attachment – ULA plates)²⁶⁹.

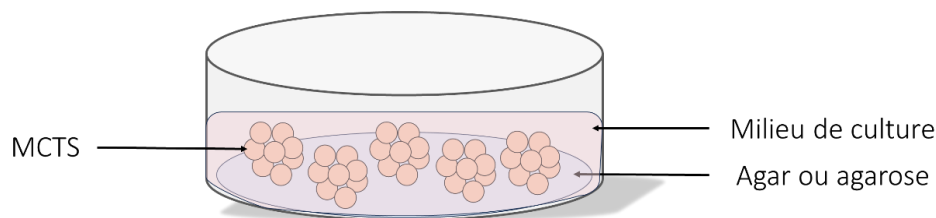


Figure 13: Représentation schématique de la technique de recouvrement liquide.

- La méthode de la goutte suspendue : cette méthode consiste à déposer, sur le couvercle d'une boîte, des gouttes de suspension cellulaire au sein d'un milieu enrichi ou non de méthylcellulose, pouvant aller jusqu'à 30 μL ^{261,270}. La méthylcellulose est parfois ajoutée au milieu de culture pour augmenter sa viscosité, ce qui peut influencer la formation des agrégats cellulaires en suspension. Lors de l'inversion du couvercle, les cellules s'accumulent à l'interface liquide-air pour former des sphéroïdes. Cette méthode permet d'une part d'éviter l'utilisation de plaques avec revêtement ainsi que l'effet du contact du substrat sur les cellules, et d'autre part de générer une grande

quantité de sphéroïdes (*Figure 14*). Toutefois, tandis que certaines études rapportent le fait que cette méthode soit très reproductible, d'autres études soulignent son manque de reproductibilité à travers la variabilité dans la taille des sphéroïdes obtenus (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*)^{271–273}.

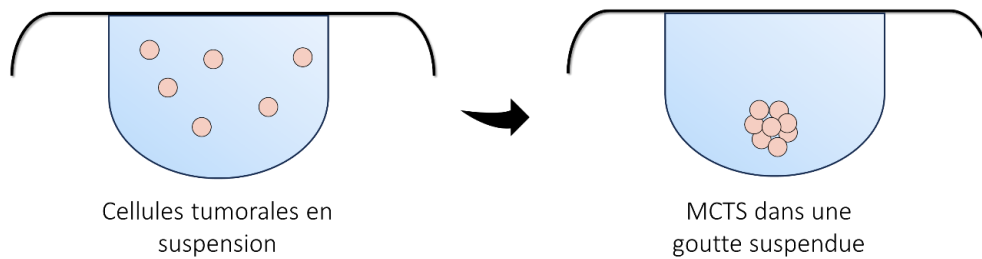


Figure 14: Représentation schématique de la méthode de la goutte suspendue.

- La méthode d'encapsulation à base d'alginate^{274–276} : cette méthode consiste à encapsuler les cellules tumorales au sein de microparticules de gélatine ensuite enveloppées dans un gel d'alginate de calcium de plusieurs dizaines de micromètres d'épaisseur. Les cellules se développent alors au sein de cette structure qui est ensuite dégradé par un traitement à la lyase d'alginate ou un chélateur de calcium pour analyse (*Figure 15*). Il a été rapporté dans cette étude que cette méthode permet de produire une grande quantité de MCTS de taille homogène, qu'elle est compatible avec le « screening » de drogues à haut débit et qu'elle permet la formation de MCTS par des lignées de cellules cancéreuses incapables d'en former avec les techniques précédemment décrites²⁷⁷. Néanmoins, l'inconvénient majeur repose sur l'utilisation de la membrane d'alginate qui introduit un biais en réduisant à la fois l'apport d'oxygène et de nutriments mais également le contact entre cellules. Pour s'en affranchir, il est possible d'ajouter une enveloppe d'hydrogel autour de la microcapsule dont la perméabilité permet à la fois la libre circulation des nutriments et la prolifération cellulaire au sein de la microcapsule²⁷⁷.

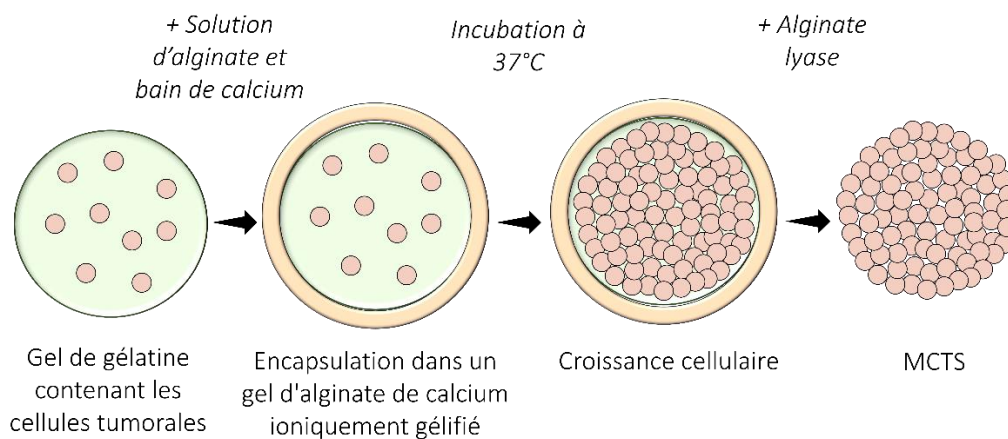


Figure 15: Représentation schématique de la méthode d'encapsulation à base d'alginate (figure originale).

Originellement, les premiers MCTS étaient issus de la monoculture de cellules cancéreuses. Cependant, très loin de représenter de façon adéquate la complexité de la tumeur, les MCTS hétérotypiques sont rapidement apparus afin de prendre en considération le fait que ces cellules sont accompagnées d'un microenvironnement tumoral indispensable à leur croissance et à leur expansion. Parmi les types cellulaires les plus couramment utilisés pour la co-culture avec les cellules cancéreuses, on retrouve les cellules immunitaires et les cellules stromales telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales. Elles peuvent soit être ajoutées au sein du milieu de culture conduisant alors à l'infiltration des MCTS par ces cellules, soit être directementensemencées avec les cellules tumorales au sein de la suspension cellulaire initiale. L'amélioration constante de ces modèles de culture 3D est essentielle afin de mettre au point le modèle de cancer le plus pertinent possible et ainsi pouvoir étudier les différentes interactions cellulaires retrouvées au sein de la tumeur, et les mécanismes responsables de la progression tumorale et de la résistance au traitement.

2.2.1.2. Les tumorosphères

Originellement développé pour les tumeurs cérébrales par Singh et al. en 2003²⁷⁸, le terme tumorosphère fait allusion à la culture de cellules souches cancéreuses (CSC) sous forme d'agrégats cellulaires sphériques flottant dans un milieu de culture spécifique, dans des conditions de faible adhérence au support et sans apport de MEC. Les sphères résultantes

appelées neurosphères proviennent d'une seule cellule capable de donner naissance à ces dernières par expansion clonale. Les années qui ont suivi ont permis l'adaptation de cette technique à un plus large éventail de tumeurs, spécifiquement les tumeurs solides, comme le cancer du sein²⁷⁹ ou le cancer du poumon²⁸⁰. Les méthodes d'obtention des tumorosphères sont assez similaires d'un tissu cancéreux à l'autre. La première étape consiste à dissocier de façon mécanique et enzymatique l'échantillon tumoral afin d'obtenir une suspension cellulaire. Dans l'optique d'enrichir la population de CSC et d'éliminer les cellules stromales, il est possible d'effectuer un tri cellulaire (par fluorescence ou par magnétisme) en utilisant des marqueurs putatifs de CSC, notamment CD44, CD133, CD90 ou l'aldéhyde déshydrogénase²⁸¹. Les CSC sont ensuite cultivées dans un milieu spécifique dépourvu en SVF et complété de facteurs parmi lesquels on retrouve notamment le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et le facteur de croissance épidermique (EGF). Des hormones peuvent également être ajoutées au milieu, entre autres l'hydrocortisone, l'insuline et la progestérone, connues pour induire la prolifération des cellules souches, de même que l'héparine, qui permet de stabiliser l'interaction entre le FGF et son récepteur²⁸². Il a par ailleurs été mis en évidence que le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF), connu pour maintenir les cellules souches embryonnaires primitives de souris dans un état indifférencié²⁸³ et pour prévenir la sénescence des cellules souches neurales humaines²⁸⁴, est indispensable pour une croissance sphéroïdale optimale²⁸⁵. Toutefois, en raison de son incapacité à reconstituer la multiplicité des types cellulaires retrouvés dans le microenvironnement tumoral, l'application du modèle de tumorosphères est limitée à l'étude des CSC²⁸⁶. Par ailleurs, bien qu'il soit largement admis que chaque tumorosphère est dérivée d'une seule cellule et est donc clonale, la clonalité n'est pas systématique et doit être particulièrement étudiée en amont. En effet, lors d'une étude menée sur des neurosphères normales, il a été mis en évidence qu'il ne s'agissait pas d'agrégats clonaux mais plutôt d'agrégats issus d'une croissance induite par fusion²⁸⁷. Afin de prévenir l'agrégation cellulaire par fusion, il est possible de recourir à la méthylcellulose semi-solide afin de cultiver des neurosphères clonales putatives²⁸⁸, ou bien d'ensemencer une cellule unique par puit²⁸⁷ et ainsi obtenir des sphères clonales par prolifération cellulaire. Il est néanmoins d'usage d'ensemencer les cellules à des densités pouvant aller de 1000 cellules viables par plaque de 35 mm de diamètre, à 100 à 1000 cellules viables par cm² car la prolifération issue d'une cellule unique ne permet pas la génération de grandes sphères (> 100 µm de diamètre).

2.2.1.3. Les sphéroïdes tumoraux dérivés de tissus (TDTS)

Les sphéroïdes tumoraux dérivés de tissus ou TDTS sont obtenus à partir de tissus cancéreux partiellement dissociés par digestion mécanique, supplée d'une digestion enzymatique dans certains cas. Là encore, les TDTS sont majoritairement utilisés pour l'étude de cancers solides comme le cancer colorectal ou encore le cancer du sein (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*). Divers modèles sont alors retrouvés comme les colosphères ou les sphéroïdes-MARY-X. Comme le nom l'indique, les colosphères sont dérivées de tumeurs cancéreuses colorectales et générées en coupant finement l'échantillon avec une lame de scalpel et en l'écrasant avec un piston strié de seringue jetable²⁸⁹. Les morceaux obtenus sont ensuite cultivés en condition non adhérentes, sans MEC et dans du milieu classique supplémenté en SVF. Les colosphères se forment en 1 jour après remodelage et compactage cellulaire et peuvent être maintenues en culture pendant au moins deux semaines²⁸⁹ et être cryoconservées sous forme de sphères entières dans du milieu de congélation. Le modèle MARY-X a été établi à partir de cellules d'une patiente atteinte d'un cancer du sein inflammatoire xénotransplantées à des souris « nudes » immunodéficientes²⁹⁰. Une fois le PDX dissocié et les cellules murines retirées, les cellules tumorales ont une capacité innée à former des sphéroïdes compacts et étanches appelés sphéroïdes-MARY-X²⁹¹ qui peuvent être maintenus en culture pendant des temps longs, pouvant aller jusqu'à 3 mois (*Figure 16*)²⁹². Après dissociation du tissu tumoral en amas cellulaire, le contact cellule-cellule entre les cellules tumorales est maintenu et permet de former rapidement des TDTS. Ils sont majoritairement composés de cellules tumorales et de cellules immunitaires, les cellules stromales semblent quant à elles être perdues au cours du processus de dissociation. Afin d'étudier la pathologie dans son ensemble, c'est-à-dire les cellules cancéreuses et leur microenvironnement, il est donc nécessaire d'incorporer ces cellules au sein des TDTS. L'avantage de ce modèle repose sur sa capacité à imiter la tumeur parentale notamment en termes de profils d'expression génique et de propriétés métastatiques^{289,292,293}.

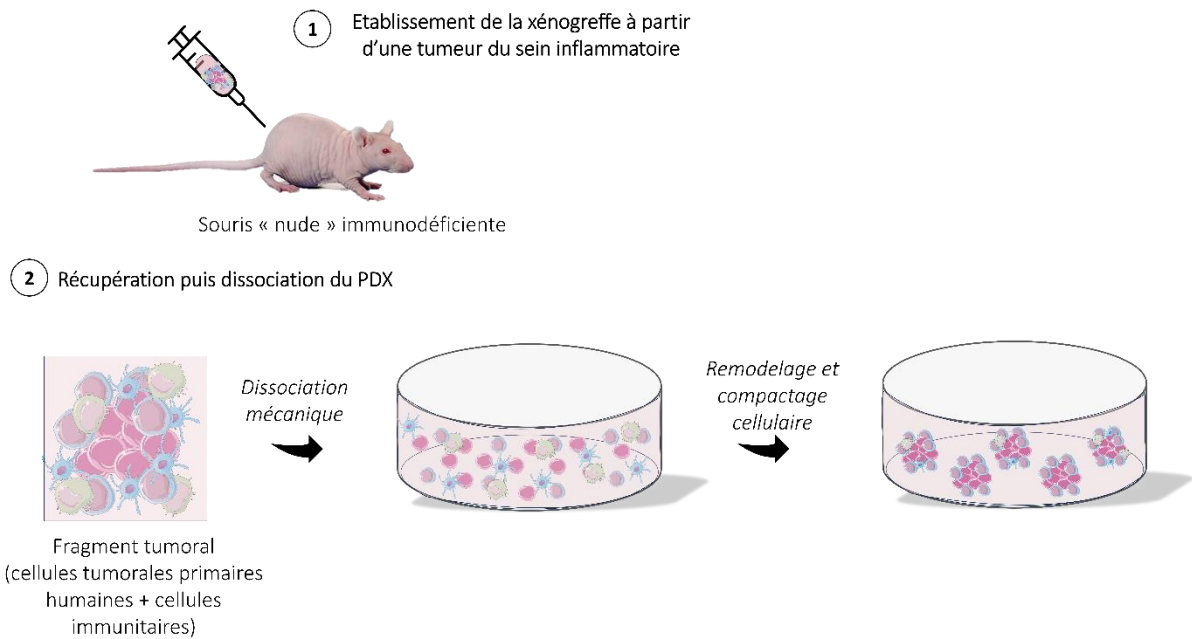


Figure 16: Représentation schématique des étapes nécessaires à la formation de sphéroïdes tumoraux dérivés de tissus (TDTS) (figure originale).

2.2.1.4. Les sphéroïdes multicellulaires organotypiques (OMS)

Les sphéroïdes multicellulaires organotypiques ou OMS représentent le modèle le plus comparable à la tumeur parentale car ils conservent à la fois l'architecture du tissu d'origine mais aussi son hétérogénéité cellulaire²⁹⁴. L'avantage des OMS réside en effet dans la préservation du microenvironnement tumoral, en particulier les macrophages et la composante stromale²⁹⁵, ce qui les distingue des TDTS. Les fragments de tumeur ne sont pas dissociés de façon enzymatique ou mécanique mais découpés en morceaux d'environ 4 mm²⁹⁶ puis cultivés en condition non adhérente dans des flasques de culture tissulaire en étant soit immergés dans du milieu de culture supplémenté en SVF et en acides aminés non essentiels, soit au sein d'une interface air-liquide (Figure 17). Cette interface est créée en enveloppant l'OMS au sein d'une matrice de Matrigel ou de collagène. L'OMS est ensuite cultivé dans du milieu de culture et la matrice forme une barrière directe avec le milieu. Les OMS sont le plus souvent cultivés jusqu'à ce qu'ils se regroupent entre eux et forment une sphère. A l'aide d'une pipette, les sphères obtenues sont isolées des débris sous contrôle microscopique et peuvent ensuite être maintenues en culture pendant une ou deux semaines, selon le type de tumeur (résumé dans le Tableau 2, voir page 88)^{296,297}. Parmi les tumeurs qui ont permis de générer

avec succès des OMS sont retrouvées là encore majoritairement des tumeurs solides comme les glioblastomes, les tumeurs squameuses de la tête et du cou ou encore le cancer colorectal²⁹⁶⁻²⁹⁹. L'analogie de ces OMS avec la tumeur d'origine et la préservation de l'hétérogénéité cellulaire en font un modèle préclinique valide pour des tests de médicaments anticancéreux mais également pour la découverte de biomarqueurs^{300,301}. A l'égal des TDTs, les OMS peuvent également être cryoconservés. En effet, il a été montré que, malgré des changements phénotypiques et génotypiques mineurs survenus après la décongélation, les OMS de gliome congelés restent viables tout en conservant leurs caractéristiques histologiques²⁹⁸.

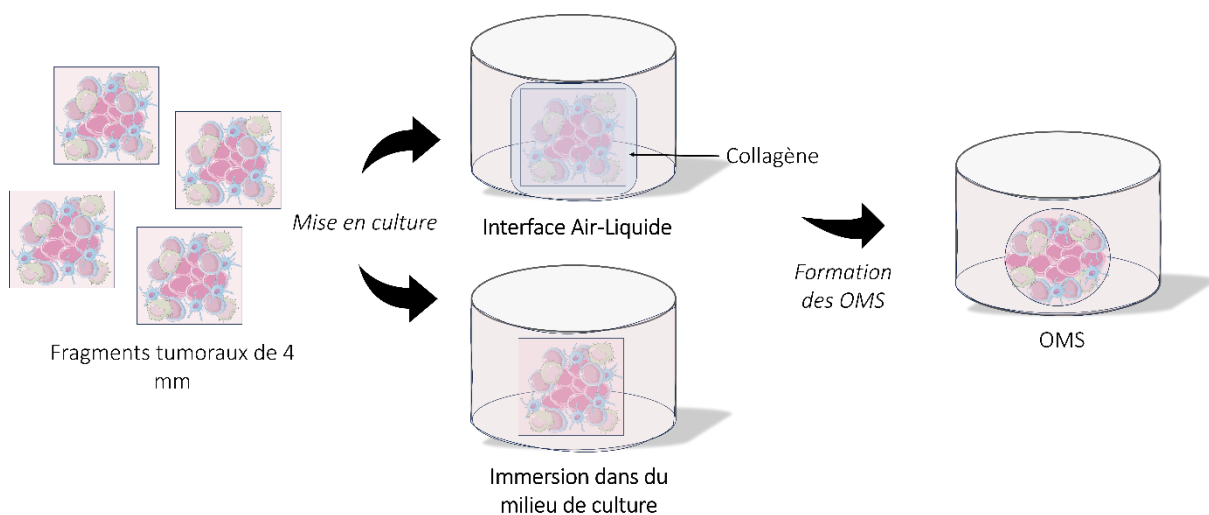


Figure 17: Représentation schématique des étapes nécessaires à la formation de sphéroïdes multicellulaires organotypiques (OMS) (figure originale).

2.2.2. Le modèle organoïde

2.2.2.1. Les fondements du modèle organoïde

Comme mentionné plus haut, les organoïdes sont des structures multicellulaires qui peuvent être dérivées de cellules souches humaines, de cellules progénitrices spécifiques à un organe ou de cellules cancéreuses dérivées d'un patient. Cultivées au sein d'une structure tridimensionnelle, suppléée du cocktail de facteurs de croissance et de différenciation adapté, ces cellules ont la capacité de se différencier et de s'auto-organiser spontanément en une

structure 3D qui mime l'architecture du tissu ou de l'organe en question³⁰². C'est en effet ce qu'a démontré cette étude avec l'établissement d'un système de culture organoïde de cryptes intestinales qui reproduit de façon similaire à *l'in vivo* la niche de cellules souches²⁵⁶. Par ailleurs et à l'inverse des sphéroïdes, les organoïdes forment une structure 3D sur la base de leur programmation génétique, représentant ainsi plus fidèlement le développement réel d'une tumeur et conférant un avantage majeur par rapport aux sphéroïdes (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*)³⁰³. Le protocole de culture ayant permis d'obtenir les premiers organoïdes non tumoraux, établis par Sato et al.²⁵⁶ à partir de cellules intestinales murines, a ensuite été utilisé pour la culture d'organoïdes humains non tumoraux puis tumoraux qu'on appelle également tumoroïdes. Les organoïdes sont généralement cultivés au sein de biomatériaux parmi lesquels sont retrouvés des tissus natifs décellularisés ainsi que des matrices à base de polymères synthétiques comme le polyéthylène glycol (PEG), ou naturels comme le collagène ou l'alginate¹⁹¹ (*Figure 18*). Ils peuvent également être cultivés dans des transwell, initialement utilisés pour des tests de migration/invasion³⁰⁴, pour mimer la barrière hémato-encéphalique³⁰⁵ ou pour mimer l'interface entre le compartiment vasculaire et la tumeur³⁰⁶, capitale dans l'action des médicaments anticancéreux (*Figure 18*). Les biomatériaux à base d'hydrogel sont néanmoins préférés car il a été démontré dans la littérature qu'ils peuvent être fonctionnalisés avec différents motifs peptidiques mimant le collagène, la laminine ou la vitronectine afin de reproduire dans une moindre mesure la MEC de la tumeur étudiée (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*)^{307,308}. Le biomatériau idéal doit pouvoir fournir un environnement approprié à la survie, à la prolifération et à la différenciation cellulaire. Pour ce faire, plusieurs éléments peuvent être ajoutés dans le milieu de culture, comme des facteurs de croissance qui permettent de soutenir la survie cellulaire, des peptides ligands pour mimer des interactions ligand-récepteur mais également des cellules immunitaires afin de reproduire l'infiltration tumorale.

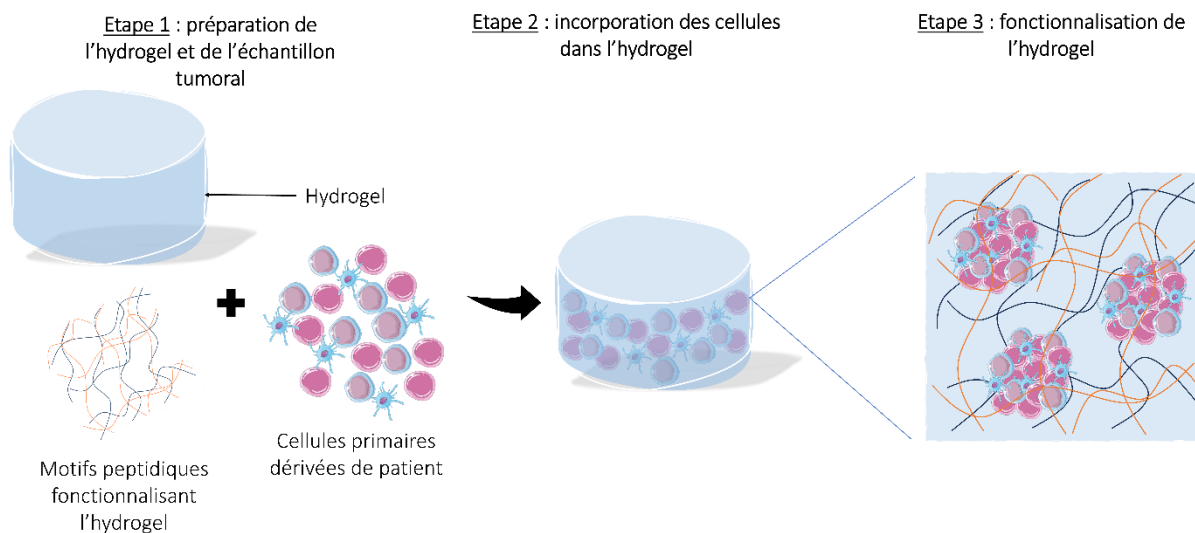


Figure 18: Représentation schématique des étapes nécessaires à la formation d'organoïdes (figure originale).

2.2.2.2. Les organoïdes dérivés de patients (PDO)

Les organoïdes dérivés de patients ou PDO sont obtenus par une dissociation mécanique de l'échantillon tumoral suivi d'une dissociation enzymatique permettant l'obtention d'une suspension cellulaire constituée de cellules isolées ou de petits agrégats³⁰⁹. Les cellules primaires dérivées de patients sont ainsi cultivées au sein d'un biomatériau spécifique de type hydrogel mimant des protéines de la MEC ensuite recouvert de milieu de culture. Bien que la dissociation enzymatique affecte l'intégrité du fragment tumoral utilisé, ce modèle reste pertinent car il parvient à maintenir les caractéristiques ainsi que l'hétérogénéité cellulaire de la tumeur étudiée (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*). C'est en effet ce qu'a démontré cette étude où les organoïdes dérivés de tumeurs ovariennes de patients ont permis de récapituler les caractéristiques histologiques et génomiques de la tumeur dont ils sont issus³¹⁰. Par conséquent, la forte ressemblance des PDO avec leur tumeur d'origine en fait un modèle approprié pour l'étude de la réponse aux traitements anticancéreux. Il a été rapporté que les cellules stromales et les cellules immunitaires sont conservées au sein des PDO, bien qu'elles soient tout de même perdues petit à petit lors de culture à long terme³¹¹. Néanmoins, l'ajout de divers facteurs au sein de la culture peut partiellement récapituler la fonction de ces cellules mais la perte ou l'absence du microenvironnement tumoral et de composants

multicellulaires dans ces PDO constituent une limite et introduit là encore la notion de co-culture afin de mimer le dialogue bidirectionnel entre les cellules tumorales et les cellules stromales et immunitaires. La MEC compte parmi les composants non cellulaires du microenvironnement tumoral. Sa complexité moléculaire et sa nature dynamique ont un impact significatif sur la prolifération, la migration et la différenciation des cellules cancéreuses et donc le développement et la progression tumorale³¹². Néanmoins, la plupart des modèles de culture décrits dans la littérature ne récapitulent pas la composition native de la MEC spécifique au cancer modélisé et ne parviennent pas à imiter ses signaux biophysiques et biochimiques. Les biomatériaux utilisés, naturels, synthétiques ou mixtes servent alors de substituts de MEC physiologiquement pertinents, mais une approche plus prometteuse, la décellularisation, permet de développer des modèles de culture 3D plus significatifs au sein desquels la MEC et l'architecture du tissu sont maintenus³¹³. Il s'agit d'un processus qui permet d'éliminer les cellules des organes ou tissus par un traitement au détergent et à la DNase en affectant le moins possible la structure et la composition de la MEC³¹⁴. L'avantage de cette technique réside dans l'utilisation d'une matrice biologique qui conserve une partie des protéines structurelles et des facteurs solubles, favorisant ainsi la reconstitution de microenvironnements complexes permettant une compréhension plus fiable des mécanismes fondamentaux de la pathologie étudiée et de ceux impliqués dans la résistance thérapeutique³¹⁵. Il est néanmoins essentiel de prendre en considération le fait que le fragment de tumeur utilisé a son importance dans la mise au point de ces PDO (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*). Il n'est effectivement pas exclu que des caractéristiques moléculaires essentielles au diagnostic ou à la prédiction de la réponse au traitement soient présentes dans un autre fragment tumoral, faussant ainsi les résultats obtenus pour les patients desquels ces organoïdes sont dérivés. En effet, la finalité dans le développement de modèles 3D pertinents ainsi que la nécessité d'une amélioration constante de ces modèles est la prédiction de la réponse du patient à son traitement, un point qui pourrait être étudié avec ces PDO. Bien que les organoïdes soient de plus en plus applicables aux tumeurs hématologiques, les tumeurs solides restent parmi les tumeurs les plus fréquemment modélisées^{316,317}.

2.2.3. La bio-impression 3D

L'impression 3D a été mise en lumière au cours des années 1980 par la création d'objets solides à partir de fichiers numériques avec conception assistée par ordinateur. Ce n'est cependant qu'à la fin des années 90 que l'impression 3D fait son apparition dans le secteur de la santé avec notamment la génération d'implants dentaires, de vessies rénales et de prothèses personnalisées. Le terme « bio-impression 3D » émerge ensuite et consiste à déposer couche par couche de l'encre biologique appelée « bioink », pour imprimer des structures en 3D telles que des tissus et des organes. Le matériau imprimé est alors constitué de cellules vivantes, de biomatériaux ou de biomolécules actives³¹⁸. La bio-impression 3D est classée en 3 grandes catégories³¹⁹ (Figure 19) :

- La bio-impression assistée par laser qui utilise la puissance du laser pour déposer des bio-encres moins visqueuses, ce qui permet de conserver une viabilité cellulaire élevée.
- La bio-impression par jet d'encre qui consiste à superposer des gouttelettes de bio-encres par stimulation thermique, acoustique ou électrique, générant ainsi des couches ayant un motif spécifique.
- La bio-impression par extrusion qui consiste également à déposer sur une plaque collectrice des bio-encres visqueuses sous forme de filaments continus en utilisant des systèmes de distribution pneumatiques ou mécaniques (par vis ou par piston).

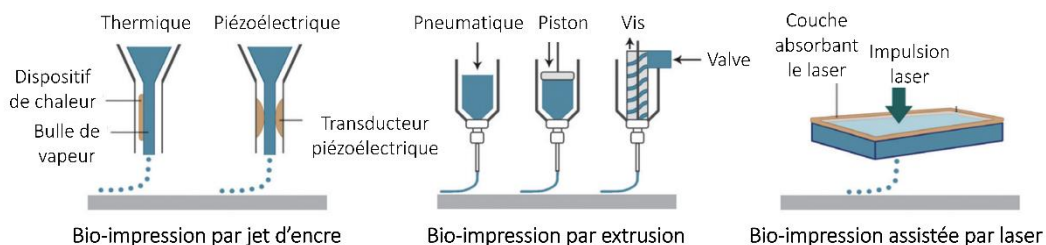


Figure 19: Les trois grandes catégories de la bio-impression 3D (d'après Gungor-Ozkerim et al. Biomaterials Science, 2018³¹⁹).

L'un des avantages majeur de cette technologie est qu'elle permet de reproduire plusieurs caractéristiques retrouvées au sein de la tumeur, notamment certaines caractéristiques de la MEC comme la rigidité de la matrice, sa porosité, sa viscosité ou encore l'arrangement du réseau de fibres³²⁰. Pour cela, il est nécessaire de sélectionner les biomatériaux ayant les propriétés viscoélastiques adaptées permettant la construction de structures 3D stables. Parmi les matériaux les plus couramment utilisés, on retrouve des biomatériaux naturels comme la gélatine, la fibrine et le collagène, mais aussi du Matrigel et des polymères plus synthétiques comme le PEG³²¹. De plus, la bio-impression 3D permet de concevoir avec une très grande précision l'organisation du tissu, comme l'architecture tissulaire et la disposition spatiale des cellules (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*)³²⁰. Toutefois, elle ne permet pas de contrôler la microarchitecture du tissu, comme l'orientation des cellules au sein de ces constructions bio-imprimées. Les applications de la bio-impression 3D ne sont pas limitées à l'impression d'organes. En effet, cette technologie est très prometteuse dans le domaine de l'impression de biomatériaux permettant l'administration des médicaments. On distingue parmi eux des biomatériaux chargés en rifampicine pour le traitement de l'ostéomyélite, ou encore l'impression de comprimés de paracétamol avec des géométries différentes permettant des profils de libération différents afin de s'adapter aux besoins du patient^{322,323}. Bien que de nombreux modèles de cancer aient été reproduits avec succès, comme le cancer du sein ou encore le cancer de la vessie, la bio-impression 3D présente des limites^{324,325}. Il existe actuellement un nombre limité de biomatériaux à la fois bio-imprimables et représentatifs de l'architecture tissulaire nécessaire pour restaurer la fonction de l'organe après impression³²⁶. Les hydrogels synthétiques sont mécaniquement robustes, et donc appropriés à l'impression 3D, à la différence des hydrogels d'origine naturelle qui restent tout de même propices à la croissance cellulaire. La mise au point de biomatériaux hybrides est donc nécessaire pour pallier ces problématiques. De plus, au cours du processus d'impression, les contraintes mécaniques exercées sur les cellules provoquent un grand stress cellulaire pouvant affecter la viabilité et la croissance cellulaire mais également modifier les profils d'expression génétique (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*)³²⁷. C'est notamment le cas des cellules souches qui ne survivent généralement pas au processus d'impression car trop sensibles aux forces physiques appliquées³²⁸. Enfin, et bien que de nombreux progrès aient été réalisés récemment, l'apport d'une vascularisation au sein des constructions bio-imprimées de même

que le recouplement de la vascularisation imprimée avec la vascularisation de l'hôte après implantation de l'organe bio-imprimé font défaut à cette technique^{329,330}.

2.2.4. Le modèle d'organe sur puce (« Organ-on-Chip »)

Bien que de remarquables progrès aient été obtenus grâce aux différentes techniques de culture 3D précédemment décrites, ces dernières ne se prêtent pas à une production massive et automatisée ainsi qu'au screening à haut débit de médicaments. Le modèle d'organe sur puce ou « Organ-on-Chip » pourrait cependant répondre à ces problématiques, notamment à l'absence de dynamique environnementale constatée dans ces modèles. Les organes sur puces sont des dispositifs microfluidiques qui permettent de cultiver des cellules vivantes au sein de chambres micrométriques perfusées en continu dans l'optique de modéliser les fonctions physiologiques des organes et tissus. A l'inverse des techniques d'ingénierie tissulaire, l'organe sur puce ne cherche pas à reproduire l'organe entier pour remplacer cliniquement son homologue humain défectueux, mais plutôt à imiter de façon synthétique les fonctionnalités cellulaires et organotypiques minimales³³¹. Il existe des systèmes plus ou moins complexes allant de la simple chambre microfluidique, contenant un seul type cellulaire et représentant les fonctions d'un type de tissu, à plusieurs chambres microfluidiques reliées par des membranes poreuses et contenant différents types cellulaires afin de recréer des interactions entre différents tissus (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*). Il est par ailleurs possible d'y intégrer des forces physiques et mécaniques afin d'observer la réponse spécifique des organes, comme le recrutement de cellules immunitaires en réaction à des traitements anticancéreux. Les puces microfluidiques sont souvent fabriquées par lithographie douce³³¹. Il s'agit d'une technologie d'impression qui permet de graver le motif spécifique souhaité sur des plaquettes de silicium par photolithographie, en incluant par exemple des microcanaux permettant d'intégrer au modèle divers paramètres fluidiques et chimiques pour une modélisation précise de l'environnement cellulaire. L'impression est suivie d'un moulage de la plaquette de silicium avec un polymère liquide, généralement le polydiméthylsiloxane (PDMS). En effet, le PDMS est le matériau de prédilection pour le moulage de dispositifs microfluidiques en raison de sa grande élasticité, sa perméabilité aux gaz, sa transparence optique et sa biocompatibilité³³¹. Une fois polymérisé, le PDMS est décollé de la plaquette et on obtient une

réplique de la structure de la puce en PDMS (*Figure 20*). Afin de favoriser l'injection de cellules et de fluides, les entrées et sorties du dispositif microfluidique peuvent être percées à l'aide d'une aiguille ou d'un emporte-pièce de la taille des réservoirs microfluidiques ou des pompes. L'application de ces systèmes de culture microfluidique aux modèles de culture 3D repose sur le simple dépôt de sphéroïdes ou d'organoïdes, préalablement préparés, sur la puce microfluidique, ensuite complété de milieu adéquat ou de traitements médicamenteux par perfusion à l'aide des microcanaux³³¹⁻³³³.

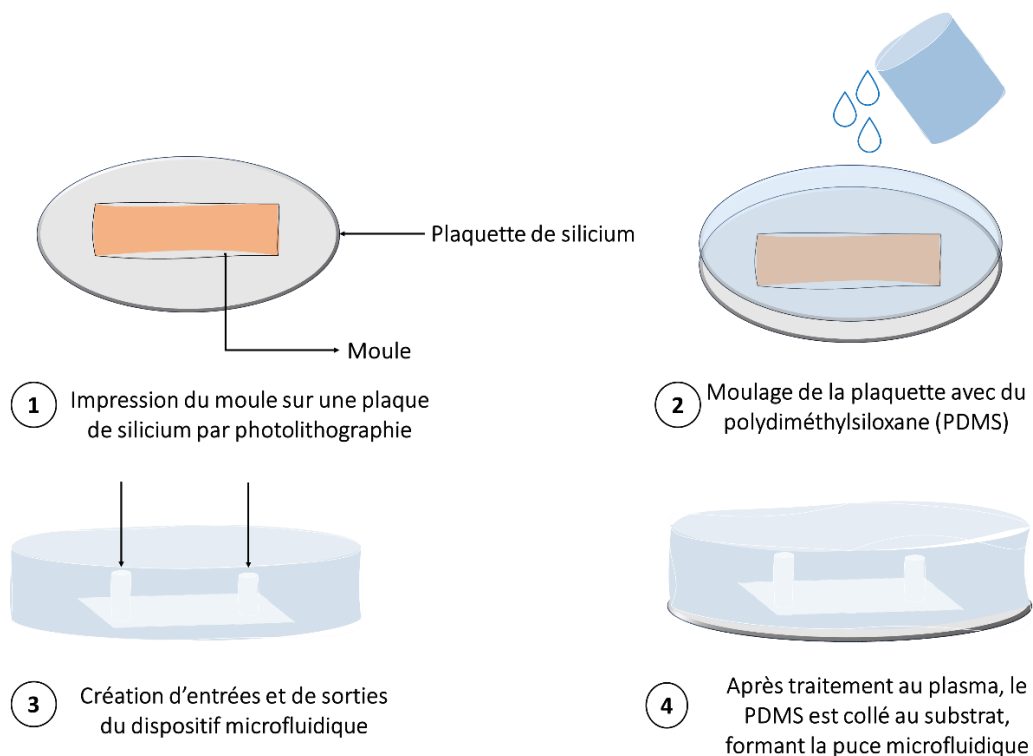


Figure 20: Représentation schématique des étapes nécessaires à la création d'une puce microfluidique (figure originale).

L'avantage de cette technologie microfluidique réside dans la conception de systèmes de culture 3D complexes au sein desquels divers paramètres (forces mécaniques, gradients chimiques...) peuvent être pris en compte, modifiés et contrôlés indépendamment. Néanmoins, le coût ainsi que les compétences nécessaires à la fabrication des puces microfluidiques constituent une limite dans l'utilisation standardisée de ce modèle (*résumé dans le Tableau 2, voir page 88*)³³¹. C'est ainsi que l'avènement de l'impression 3D a permis d'une part de réduire les coûts de production et d'autre part le développement d'un autre type

d'organe sur puce basé sur une encapsulation cellulaire au sein de microsphères d'alginate^{277,334}. Ce dispositif de culture microfluidique repose sur l'impression d'un dispositif de coextrusion formé par l'impression de trois couches de résine photopolymérisable au moyen d'une imprimante DLP (Digital Light Processing), qui offre une bonne résolution et la possibilité d'imprimer des canaux dans un bloc de résine³³⁴. Les trois entrées du dispositif sont connectées à trois seringues, montées sur des pompes et chargées de solutions qui vont être injectées dans le dispositif microfluidique (*Figure 21*). Ces seringues sont composées :

- D'une solution d'alginate qui permet de former les microsphères et qui s'écoule dans le canal qui relie le capillaire conique externe,
- D'une solution intermédiaire dépourvue de calcium qui s'écoule dans le canal qui relie le capillaire conique intermédiaire et qui fait barrage à la diffusion de calcium libéré par les réserves intracellulaires, évitant ainsi le blocage du dispositif par gélification de l'alginate déclenchée par les ions calcium,
- D'une solution contenant la suspension cellulaire, seule ou en présence de Matrigel, qui s'écoule dans le canal qui relie le capillaire conique interne. En amont de cette seringue, on retrouve un dispositif thermostaté qui maintient la température à 4°C afin que le Matrigel reste liquide et ne gélifie pas.

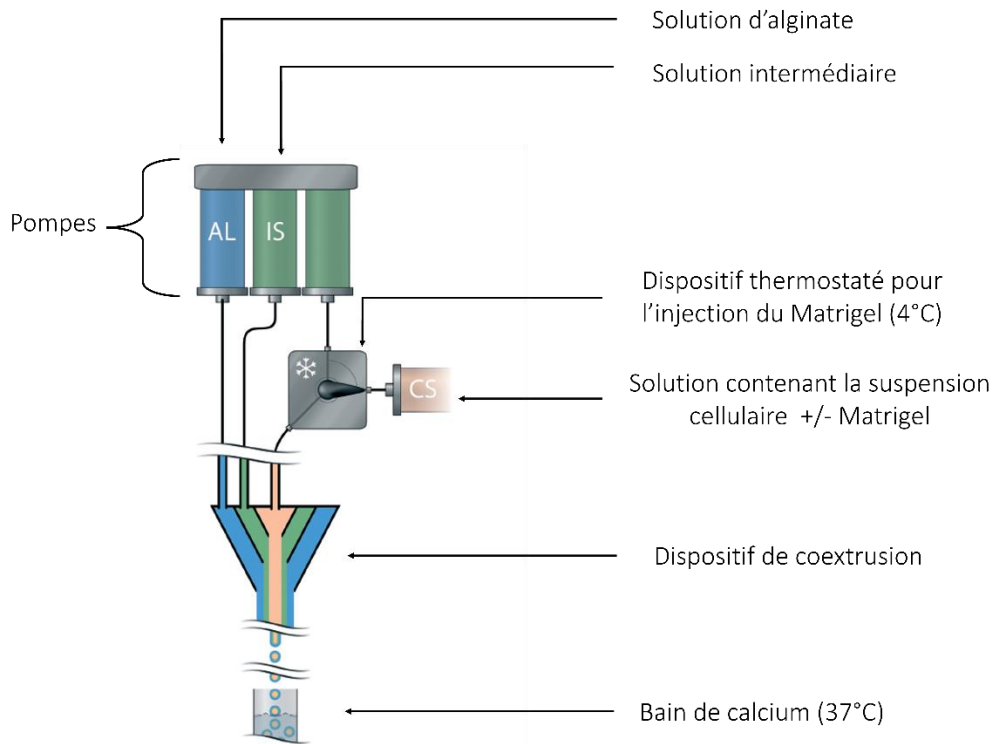


Figure 21: Dispositif microfluidique basé sur l'encapsulation cellulaire au sein de microsphères d'alginate (d'après Alessandri et al. Lab Chip, 2016³³⁴).

Le débit d'écoulement des différentes solutions est contrôlé, il émerge sous forme de jet qui se fragmente ensuite en gouttelettes du fait de l'instabilité capillaire. Les microsphères d'alginate sortent du dispositif par un capillaire en verre d'un diamètre de 150 μm et tombent dans un bain de calcium chaud ($T = 37^\circ\text{C}$) pour figer la structure et ainsi permettre aux cellules de rester encapsulées. Encore et toujours initialement développé pour les cancers solides, ce modèle a par la suite été adapté pour les tumeurs hématologiques, notamment pour le LF (voir paragraphe « L'application du modèle d'organe sur puce aux cellules de lymphomes »). Bien que son utilisation ne soit pas standardisée, il est susceptible de favoriser le développement de modèles pré-cliniques *in vitro* plus complets et pertinents dans l'étude de la réponse au traitement.

➔ Le tableau 2 ci-dessous résume les différents modèles mentionnés, ainsi que leurs avantages et inconvénients.

Tableau 2 : Récapitulatif des différents modèles de culture actuellement utilisés dans la recherche en cancérologie.

	Modèles	Avantages	Inconvénients	Références	
2D <i>in vitro</i>		Peu cher Mise au point simple Fortement reproductible Possibilité de culture à long terme	Modifie la forme des cellules, les interactions cellules-cellules et la prolifération cellulaire Altère la sensibilité au traitement Faible représentation du microenvironnement tumoral	185,190,191,237	
	In vivo	Souris Immunocompétentes	Souris Syngéniques	Conservation du système immunitaire Taux de greffe élevé	212–214
Souris Humanisées			Imite correctement le microenvironnement tumoral humain Prédiction de la réponse au traitement	Coûteux Techniquement compliqué à mettre en place	231,232,234
Souris Immunodéficientes		GEMMs	Progression graduelle de la tumeur avec son microenvironnement Etude des mutations à l'origine de la pathologie	Différences inter-espèces Latence du développement néoplasique Risque de transgénèse aléatoire	215–218,222,223
		PDX	Retient l'hétérogénéité de la tumeur et le microenvironnement tumoral	Longue période d'incubation et risque de perte du microenvironnement au cours des passages Coûteux	185,226
3D <i>in vitro</i>	Sphéroïdes	Favorise la culture à long terme Bonne représentation des tumeurs solides Peu coûteux	Utilisation de lignées cellulaires Faible reproductibilité avec la méthode de la goutte suspendue	185,191,266	
	Organoides	Permet de mimer le microenvironnement tumoral Représentation plus fidèle du développement tumoral Peu coûteux	Importance du biomatériau utilisé Importance du fragment tumoral utilisé (PDO)	191,303,307,308,311	
	Organe sur puce	Permet la conception de système complexe Permet de perfuser les cellules en continue Criblage thérapeutique plus pertinent	Coûteux Nécessite des compétences spécifiques pour la fabrication de puces	191,331,334	
	Bio-impression	Permet d'avoir une bonne représentation de la disposition spatiale des cellules	Coûteux Stress cellulaire provoqué par les contraintes mécaniques d'impression	185,320,326,327	

3. Quelles sont les applications de la culture 3D?

3.1. Les tumeurs solides cancéreuses, les élues de la culture 3D

La majorité des modèles de culture 3D cités dans la littérature sont davantage applicables aux cancers solides qu'aux hémopathies malignes, et leur transfert vers la modélisation des lymphomes est assez limitée. De ce fait, de nombreuses tumeurs solides ont pu être étudiées grâce à l'avènement de la culture 3D, avec les sphéroïdes comme modèle de prédilection.

Le modèle de sphéroïdes tumoraux multicellulaires ou MCTS a permis de grandes avancées dans le cadre des recherches menées sur le cancer colorectal, le cancer gastrique ou le cancer ovarien³³⁵⁻³³⁷. Initialement, les études menées sur ce modèle ne rapportaient la formation de sphéroïde que par la monoculture de lignées cellulaires cancéreuses, ce qui ne reflète pas de façon pertinente la composition des tumeurs. Pour cela, il est nécessaire de co-cultiver ces cellules avec des cellules du microenvironnement tumoral, qui jouent un rôle essentiel dans la biologie de la tumeur, notamment dans la progression tumorale et la résistance thérapeutique. L'incorporation de fibroblastes associés au cancer (CAFs) a été rapporté par une étude menée par l'équipe de Jeong et al., qui a permis de mettre en évidence que les CAFs stimulent la croissance de la lignée cellulaire de carcinome colorectal humain dans les MCTS et les protège de la mort cellulaire induite par le paclitaxel, un médicament de chimiothérapie antinéoplasique³³⁶. Plus récemment, l'équipe de Courau et al. a co-cultivée des sphéroïdes dérivant d'une lignée cellulaire de cancer colorectal avec des cellules NK et des cellules T afin d'étudier l'infiltration des cellules immunitaires³³⁷. Il a été mis en évidence, au sein des MCTS, un infiltrat de cellules NK, TCD8 cytotoxiques et TCD4, responsable de l'apoptose des cellules tumorales et de la dissociation des sphéroïdes. Il a été rapporté dans la littérature que les interactions entre NKG2D et ses ligands MICA/B activent la cytotoxicité des cellules NK et représentent un signal de costimulation important pour les cellules T³³⁸. Or, certaines cellules TCD4 présentaient une forte expression de NKG2D. Dans cette étude, le ciblage de l'axe NKG2D avec un anti-NKG2D bloquant a alors mis en évidence une diminution significative de l'infiltration des cellules NK et des TCD8, de même qu'une diminution de l'apoptose des cellules tumorales³³⁷. Ceci suggère que MICA/B sont des cibles majeures des cellules cytotoxiques qui

infiltrer les sphéroïdes et que le ciblage de cet axe pourrait constituer une immunothérapie dans le cadre du cancer colorectal. Lorsqu'une étude a démontré qu'un nouvel anticorps monoclonal ciblant la région proximale de la mésothéline, une glycoprotéine de surface cellulaire surexprimée dans les tumeurs solides et jouant un rôle central dans la prolifération, l'invasion et les métastases, l'équipe de Zhang et al. a mis au point des cellules CAR-T qui ciblent les régions distale et proximale de la mésothéline afin d'évaluer leur efficacité *in vivo*^{335,339}. Il a été mis en évidence qu'au sein des MCTS, les cellules CAR-T qui ciblent la région proximale de la mésothéline infiltrer davantage les sphéroïdes et sont plus létales pour les cellules cancéreuses que les cellules CAR-T qui ciblent la région distale.

Le modèle de sphéroïdes tumoraux dérivés de tissus ou TDTS a quant à lui montré des résultats prometteurs dans la prédiction de la réponse des patients aux traitements anticancéreux. Di Liello et al. ont utilisé ce modèle afin de cultiver des cellules issues d'une biopsie de patient atteint du cancer du poumon non à petites cellules sur une MEC (Matrigel), ensuite traitées avec une chimiothérapie à base de cisplatine ou d'anti-PD1³⁴⁰. Il a alors été rapporté que la réponse à la chimiothérapie évaluée dans ces cultures était cohérente avec la réponse clinique du patient. Il est toutefois important de préciser que l'étape de digestion du tissu, permettant de récupérer une suspension cellulaire, préserve les interactions entre les cellules tumorales mais ne préserve pas celles avec les cellules stromales, et il en va de même pour l'architecture tissulaire. Afin de pallier cet effet, une étude a rapporté le développement d'un modèle au sein duquel les cellules tumorales obtenues par digestion du tissu tumoral d'origine sont co-cultivées avec des fibroblastes qui expriment la vimentine³⁴¹. Contrairement à la culture des cellules tumorales seules, la coculture de ces cellules avec les fibroblastes induit une augmentation de la résistance à la gemcitabine, démontrant ainsi l'importance des cellules du microenvironnement dans la réponse au traitement.

Les sphéroïdes organotypiques multicellulaires ou OMS ont également été exploités dans l'optique de prédire la réponse clinique des patients. Une étude, menée sur des OMS d'explants de tumeurs mammaires, a permis de faire la distinction entre une tumeur sensible et une tumeur résistante au traitement³⁴². La réponse des fragments de tumeur mammaire, après traitement par chimiothérapie FAC (5-FU, Adriamycine et Cyclophosphamide), est similaire à la réponse clinique des patients, ouvrant ainsi la possibilité d'utiliser ce modèle pour prédire la réponse au traitement. Bien que la composante immunitaire soit cruciale dans la réponse de la

tumeur au traitement, les auteurs ne l'ont pas décrit dans cette étude. Le microenvironnement immunitaire tumoral dans les OMS a été étudié dans un modèle de culture d'adénocarcinome canalaire pancréatique³⁴³. Le maintien en culture de fragments tumoraux dérivés d'adénocarcinome canalaire pancréatique a permis d'étudier le microenvironnement immunitaire tumoral. Il a alors été rapporté la présence de lymphocytes T CD8 (CD3+ CD8+), de lymphocytes T régulateurs (CD3+ FOXP3+) et de macrophages (CD68+ CD163+ HLA-DR+), démontrant la possibilité d'étudier le comportement du microenvironnement immunitaire grâce à ce modèle OMS. Powley et al. ont alors entrepris de traiter des OMS dérivés de mélanome avec le nivolumab, un inhibiteur de point de contrôle immunitaire qui se lie au récepteur PD-1 et qui bloque son interaction avec PD-L1 et PD-L2³⁴⁴. L'efficacité de cet inhibiteur a été mise en évidence au sein de ces cultures *ex vivo*, suite à l'augmentation de la distance entre les lymphocytes T CD8+ effecteurs et les lymphocytes T régulateurs CD4+ FOXP3+, évitant ainsi la suppression des TCD8+ médiée par les T régulateurs.

Le modèle d'organoïdes dérivés de patients ou PDO a largement été utilisé pour les tumeurs solides, notamment par Neal et al. qui ont permis la génération de PDO à partir de 100 tumeurs de patients individuelles, représentant 14 sites tissulaires distincts et mimant 28 sous-types de maladies³¹⁷. Cette étude a permis de mettre en évidence que les PDO conservent à la fois l'architecture de la tumeur, le stroma avec l'expression de l'Actine Musculaire Lisse Alpha (SMA) et de la vimentine, ainsi que les caractéristiques cellulaires des biopsies dont ils sont issus. Il a également été observé que les PDO préservent la composante immunitaire comme les macrophages, les lymphocytes TCD8 et TCD4, les cellules NK... Toutefois, cette étude confirme qu'il est impossible de conserver la composante immunitaire dans le temps. En effet, il a été observé que les lymphocytes infiltrant la tumeur ne cessent de diminuer et disparaissent après un mois de culture, bien qu'il soit possible de maintenir un peu plus longtemps les TCD3+ en culture en ajoutant de l'IL-2 dans le milieu. Par ailleurs, le traitement de ces PDO avec le nivolumab a permis de prédire la réponse au traitement, avec des taux de réponses aux anti-PD-1/PD-L1 similaires avec ce qui avait déjà été observé dans les différents essais cliniques.

Bien que **le modèle d'organe sur puce** soit moins standardisé, il a été rapporté un modèle 3D complexe permettant la reconstitution d'une tumeur du sein HER2⁺ en combinant la culture de 4 lignées cellulaires différentes au sein d'une puce microfluidique, en vue d'évaluer l'effet d'un anticorps monoclonal anti-HER2, le trastuzumab³⁴⁵. Ces 4 lignées cellulaires ont été cultivées

dans les différentes chambres de la puce, une monocouche de cellules endothéliales dans la chambre centrale, la lignée cellulaire de tumeur du sein et les PBMC dans les deux chambres latérales et les CAFs dans une seule des deux chambres latérales, puis perfusées avec le trastuzumab. Il a alors été observé que l'effet cytotoxique de l'anticorps était fortement réduit dans la chambre qui contenait les CAFs, suggérant que ces cellules modulent les fonctions des cellules immunitaires en réduisant leur temps de contact avec les cellules tumorales.

3.2. L'avènement de la culture 3D en hématologie

Contrairement aux tumeurs solides, les hémopathies malignes comme les syndromes myélodysplasiques, les leucémies et les lymphomes à cellules B et à cellules T ont été fortement négligés en ce qui concerne le développement de systèmes 3D pertinents. Pour ces pathologies, la recherche pré-clinique s'est largement appuyée sur la culture traditionnelle 2D de lignées cellulaires pour des essais d'agents thérapeutiques, sans tenir compte de la niche microenvironnementale au sein de laquelle les tumeurs se développent, induisant une surestimation ou une sous-estimation de leur efficacité et par conséquent la perte de composés potentiellement efficaces. Les cancers hématologiques sont plus complexes à étudier que les cancers solides en raison de leur capacité à proliférer efficacement en suspension et à proliférer ou à se différencier dans des compartiments tels que la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, la rate, le thymus ou encore les tissus non-hématopoïétiques, tout en ayant un pronostic plus grave lorsque les cellules cancéreuses s'échappent dans le compartiment sanguin³⁴⁶. Un grand nombre de ces hémopathies sont dépendantes des signaux fournis par le microenvironnement tumoral, qui apporte à la fois des signaux de survie et de prolifération aux cellules cancéreuses et qui diminue l'efficacité des traitements anticancéreux, permettant aux cellules d'échapper à la mort cellulaire induite^{347,348}. Ainsi, afin d'étudier ces tumeurs et leur microenvironnement de façon pertinente, il est nécessaire de cultiver les cellules cancéreuses primaires de patients dans un environnement représentant dans une moindre mesure le microenvironnement tumoral, puis de les exposer à divers médicaments anticancéreux afin d'identifier les molécules les plus efficaces pour tuer ces cellules. Dans la littérature, la plupart des modèles qui rapportent l'étude d'hémopathies malignes utilisent des lignées cellulaires cultivées seules ou parfois co-cultivées avec des cellules de soutien. Ceci s'explique par la

difficulté à cultiver sur du long terme les cellules tumorales primaires, en plus de la mort cellulaire induite en l'absence du microenvironnement tumoral. Ainsi, l'un des plus grands obstacles dans l'étude des hémopathies malignes est le manque de systèmes expérimentaux pertinents. En vue d'offrir la représentation la plus pertinente et native du cancer étudié, il est crucial de mettre au point des modèles *in vitro* qui incluent l'architecture tridimensionnelle retrouvée *in vivo* et le microenvironnement tumoral associé. Bien qu'il ne soit rapporté que très peu de systèmes dans la littérature, certaines équipes se sont affairées à la mise au point de modèles qui permettraient l'étude des hémopathies malignes.

3.2.1. Les modèles mimant l'environnement médullaire

La moelle osseuse, tissu situé au centre des os, est le site d'origine de l'hématopoïèse. Le terme niche, utilisé pour la première fois en 1978 par Schofield³⁴⁹, décrit l'environnement de la moelle osseuse dans lequel les cellules souches hématopoïétiques (CSH) résident, s'auto-renouvellent et se différencient progressivement en progéniteurs spécifiques responsables de la formation de tous les types cellulaires qui circulent dans le sang. Impliqué dans le développement des tumeurs hématopoïétiques, le microenvironnement de la moelle osseuse est composé d'ostéoblastes, d'ostéoclastes, de cellules endothéliales et de cellules souches mésenchymateuses (MSCs) mais aussi de composants non cellulaires tels que la MEC, le facteur de cellules souches (SCF), l'ostéopontine et la cadhérine qui jouent tous ensemble un rôle crucial dans la fonction des CSH et dans la création de niches de soutien pour les cellules souches cancéreuses (CSC)^{350,351}. Bien que la modélisation des tumeurs hématologiques ait permis l'établissement de plusieurs modèles murins contenant de la moelle osseuse humaine, ou dans lesquels ont été implantés des biomatériaux renfermant des MSCs de la moelle osseuse en vue de recréer un microenvironnement localisé chez des souris immunodéficientes, ces approches *in vivo* n'ont pas permis d'étudier les CSH malignes humaines sur de longues durées³⁵²⁻³⁵⁴. Il a été rapporté que des modèles 2D *in vitro*, basés sur la co-culture de cellules progénitrices de la leucémie aigüe myéloïde (LAM) avec des MSCs indifférenciées de la moelle osseuse ou des lignées cellulaires, favorisent leur auto-renouvellement pendant 3 à 6 semaines³⁵⁵⁻³⁵⁷. Néanmoins, comme ces modèles 2D ne récapitulent pas les interactions complexes des HSPCs malignes avec le microenvironnement de la moelle osseuse humaine

native, des modèles de culture 3D ont alors émergé pour pallier ces limites. Au cours de ces dernières années, des travaux ont rapporté le développement de modèles 3D pertinents permettant de mimer l'organisation complexe de la niche, les interactions entre les cellules tumorales et le microenvironnement ainsi que l'importance de ces modèles dans l'évaluation des traitements anticancéreux³⁵⁸⁻³⁶⁷. Globalement, le procédé de développement est assez similaire avec i) l'utilisation de biomatériaux adaptés, proche de la structure de la moelle osseuse comme le Spongostan ou l'hydroxyapatite, ii) la combinaison des biomatériaux utilisés à un bioréacteur ainsi qu'à un système de perfusion, mimant davantage la moelle osseuse et iii) la mise en place d'un environnement reproduisant les caractéristiques propres à la moelle osseuse *via* l'établissement d'une certaine tension en oxygène, mais aussi *via* l'addition de certains types cellulaires, facteurs et cytokines.

Parmi les travaux les plus pertinents, on retrouve ceux basés sur l'utilisation de biomatériaux macroporeux rappelant l'architecture de la moelle osseuse³⁶⁰⁻³⁶³. En utilisant un biomatériau poreux en hydroxyapatite, qui imite la composante minérale de l'os trabéculaire, couplé à un bioréacteur permettant de perfuser au sein du biomatériau des cellules nucléées de la moelle osseuse humaine (*Figure 22*), l'équipe d'Ivan Martin a permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques du tissu osseux³⁶⁰⁻³⁶². En effet, l'implantation *in vivo* de cette structure, capable de contenir entre 7×10^4 et 18×10^6 cellules, a permis d'observer dans les pores du biomatériau i) la présence de lacunes ostéocytaires, ii) le recrutement de cellules hématopoïétiques matures et de progéniteurs multipotents précoces (monocytes ou mégacaryocytes) et iii) la génération de vaisseaux sanguins d'origine humaine après perfusion d'une fraction vasculaire stromale dérivée de tissu adipeux humain³⁶⁰⁻³⁶².

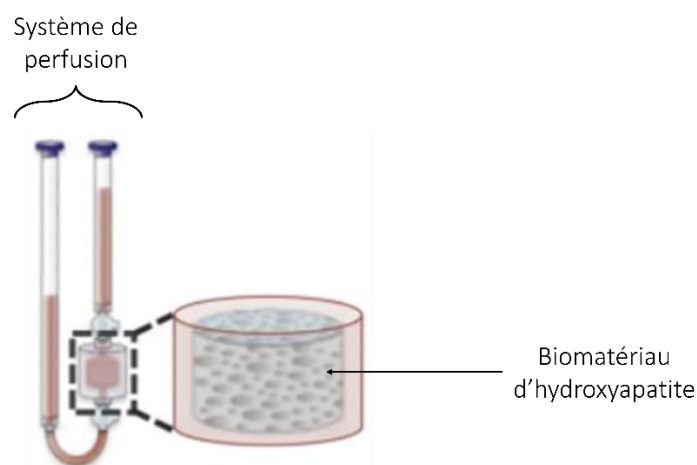


Figure 22: Exemple de système de perfusion couplé à un biomatériau d'hydroxyapatite (d'après Garcia-Garcia et al. Proc Natl Acad Sci, 2021³⁶²).

On constate par ailleurs que l'addition de cellules de soutien au sein de ces différents modèles a permis d'améliorer la survie des cellules de patients, jusqu'à parfois trois semaines de culture^{362-364,367}. Bien que le système de perfusion n'ait pas d'impact significatif sur la viabilité cellulaire par rapport à la condition statique, il a été rapporté qu'il a un effet sur la différenciation des CSH³⁶³. En effet, alors qu'il n'y a pas de différence en terme de nombre de progéniteurs myéloïdes précoces dans les deux systèmes, la différenciation en cellules érythroïdes CD71⁺ est significativement plus importante dans le système dynamique, soulignant l'importance de la perfusion dans la différenciation des cellules CD34⁺³⁶³. De plus, la mise en place d'un environnement similaire à celui de la moelle osseuse, en terme de tension en oxygène, d'ajout de MSCs, d'ajout de cytokines et d'acides aminés spécifiques, favorise la croissance des cellules souches leucémiques (LSC) après 72h de culture³⁶⁴. Parmi ces modèles, certains ont permis la culture de cellules malignes hématopoïétiques provenant de patients atteints de LAM ou de néoplasies myéloprolifératives (MPN), tandis que d'autres ont permis la culture de cellules primaires, issues de myélome, de LAM ou de leucémie lymphoïde chronique (LLC), co-cultivées avec des cellules stromales de la moelle osseuse^{362,364,366,367}. Le nombre de cellules de patients ensemencées au sein des différents modèles varie entre 5×10^4 et 3×10^6 cellules. Outre l'objectif de maintenir ces cellules en culture avec une bonne viabilité cellulaire, l'évaluation de l'efficacité des traitements anticancéreux au sein d'un environnement pertinent reste l'intention principale. Il a été rapporté que lorsqu'elles ont été exposées à la cytarabine, un agent de chimiothérapie, la viabilité des cellules maintenues au sein des biomatériaux 3D

est supérieure par rapport à la culture 2D (60% vs 5-10% respectivement)³⁶². Par ailleurs, la capacité du système de perfusion à évaluer la myélotoxicité a été mise en évidence lorsqu'après traitement au 5-fluorouracile, une chimiothérapie affectant le système hématopoïétique, l'apoptose induite est plus importante en culture 3D qu'en culture 2D, où la toxicité de la drogue est sous-estimée. Il a en effet été observé que le pourcentage d'apoptose était de 36% dans la culture statique, 22% dans la culture dynamique et 6% en 2D³⁶³. Une plateforme multiparamétrique reproduisant certaines caractéristiques de la moelle osseuse (environnement pauvre en oxygène et contenant des MSCs) a rapporté le criblage thérapeutique de 23 molécules sur des cellules primaires de LAM, en vue de réduire le pool de cellules leucémiques GPR56³⁶⁴. Il s'avère alors que la combinaison d'une chimiothérapie intensive (daunorubicine plus cytarabine, DNR-AraC) avec le vénétoclax, le selinexor ou le ruxolitinib apporte une amélioration nette de l'activité anti-LSC. De plus, les cellules leucémiques présentaient des phénotypes distincts, caractéristiques de l'activité de ces agents thérapeutiques (phénotype cytotoxique, phénotype d'inhibition du potentiel souche et phénotype d'activité de différenciation), et analogue à ce qui est retrouvé en clinique chez ces patients³⁶⁴. Barbaglio et al. rapportent également la co-culture de cellules leucémiques primaires de LLC et de cellules stromales au sein du Spongostan, un biomatériau similaire à la structure trabéculaire de la moelle osseuse, l'ensemble étant maintenu au sein d'un bioréacteur rotatif³⁶⁶. Il a été mis en évidence que l'expression de la forme inactive de la protéine du cytosquelette HS1 (hematopoietic lineage cell-specific protein 1) dans les cellules leucémiques, médiée par les cellules stromales, favorise leur rétention au sein du biomatériau mimant la moelle osseuse, tel qu'observé dans la LLC³⁶⁸. L'incubation avec l'ibrutinib induit toutefois le dépeuplement du biomatériau et une mobilisation, dans le milieu de culture, des cellules leucémiques ayant une forme active de la protéine HS1, corrélant avec les LLC dont le pronostic est plus agressif et où les cellules isolées dans la moelle osseuse ont tendance à ne pas être affectées par le traitement anticancéreux³⁶⁹. Le bortezomib, le traitement de référence du myélome multiple, a également démontré son efficacité sur des cellules primaires de myélome cultivées en 3D avec une augmentation de la mort cellulaire induite des cellules cancéreuses, passant de 23% en condition non traitée à 79% après traitement³⁶⁷. Bien que moins représentatifs, d'autres modèles rapportent l'utilisation de lignées cellulaires associées à la pathologie étudiée, telles que la LAM et la LLC ^{365,366}. Il a été observé que les cellules leucémiques de la LAM co-cultivées avec des cellules de soutien au sein d'un hydrogel

magnétique réagissent différemment lorsqu'elles sont exposées à des traitements anticancéreux³⁶⁵. Bien que les cellules cultivées en 2D soient également affectées, il a été rapporté qu'au sein de l'hydrogel, l'exposition au cyclophosphamide (CPA) des HSPC co-cultivées avec des MSCs affecte davantage la prolifération et la survie des HSPC (viabilité de 20% par rapport au contrôle après 6 jours de culture), reflétant une meilleure évaluation de la toxicité du traitement par rapport à la 2D. La différenciation des HSPC est également impactée avec une diminution significative du nombre de cellules différenciées CD34⁺/CD45RA⁺ lors de l'exposition au 5-fluorouracile et au CPA, à la fois en 2D et en 3D³⁶⁵. Les cellules KG-1a (lignée cellulaire représentative de la LAM) co-cultivées avec les MSCs ont également montré un pourcentage de viabilité plus faible ainsi qu'une prolifération altérée lorsqu'elles sont exposées au CPA à la fois en 2D et en 3D, avec toutefois une résistance à la chimiothérapie supérieure en 3D et une prolifération plus impactée en 2D. La tri-culture des cellules KG-1a/HSPC/MSCs a mis en évidence l'apparition d'un profil de cellules quiescentes, moins prolifératives et potentiellement responsables de la résistance au traitement, et une protection des HSPC de l'apoptose induite par le traitement³⁶⁵. Par ailleurs, il a été constaté une altération des métabolites en réponse à la chimiothérapie, notamment une consommation altérée du glucose et une augmentation dans la production de lactate et d'adénosine³⁶⁵. Ainsi, l'ensemble de ces études témoignent de la pertinence quant à l'utilisation de modèles de culture 3D appropriés pour maintenir la survie des cellules leucémiques, pour tester l'efficacité des chimiothérapies et pour faire du criblage thérapeutique.

3.2.2. Les modèles mimant les organes lymphoïdes secondaires

Tout comme pour les hémopathies malignes se localisant dans la moelle osseuse, des modèles de culture 3D ont été développés pour étudier les hémopathies dérivées des organes lymphoïdes secondaires dont le lymphome du manteau, le LBDGC et le LF. Ces pathologies ayant une très forte dépendance à leur microenvironnement, qui fournit des signaux de survie et de prolifération aux cellules lymphomateuses mais également une protection contre l'apoptose induite par les traitements anticancéreux de référence utilisés, il est nécessaire que les modèles développés disposent du minimum requis afin d'être représentatifs de l'*in vivo*. Ces dernières années, l'absence de modèles pertinents constituait un obstacle majeur dans la

compréhension de ces pathologies, en particulier dans l'étude du dialogue entre les cellules lymphomateuses et les cellules du microenvironnement ainsi que dans l'impact de cette interaction dans la résistance au traitement. Nous allons donc exposer, dans les paragraphes suivants, les modèles cités dans la littérature permettant de pallier ces problématiques.

3.2.2.1. *L'adaptation du modèle sphéroïde aux cellules de lymphomes*

A l'inverse des tumeurs solides, les cellules de lymphomes se développent en suspension *in vitro*, ce qui peut compliquer l'obtention de sphéroïdes cohésifs. Lorsque par diverses techniques (méthode de la goutte suspendue ou utilisation de plaques ULA) ces cellules sont contraintes à former des sphéroïdes, on obtient des agrégats relativement plats, avec une faible reproductibilité et une très grande variabilité dans leur taille^{272,273}. Plusieurs travaux ont toutefois permis l'étude des lymphomes au moyen de sphéroïdes.

Parmi les équipes pionnières dans le développement **de modèles sphéroïdes applicables à l'étude du LF *in vitro***, on retrouve l'équipe de Christine Bezombes et leur système de culture de type sphéroïde appelé MALC donc l'acronyme signifie « agrégats multicellulaires de cellules de lymphome ». A l'instar du modèle MCTS, le modèle MALC utilisé, obtenu par la méthode de la goutte suspendue, repose sur la capacité des cellules de lignées cellulaires de LF transformé (dont la lignée RL) à s'agréger entre elles afin de former une structure sphérique qui peut être maintenue en culture jusqu'à 3 semaines^{261,271,370}. Il a été rapporté dans un premier temps que ce modèle favorise l'obtention d'une architecture similaire à celle observée dans le LF. En effet, l'agrégation cellulaire induisait une augmentation du dépôt de collagène de type I, de fibronectine et de laminine mais également une densification de la structure 3D à l'origine d'une augmentation de l'hypoxie au cœur des MALC, induite par HIF1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha), rappelant la niche tumorale du LF^{271,370,371}. L'agrégation cellulaire était favorisée par une prolifération accrue des cellules au cours de la première semaine de culture, suivie d'une diminution progressive de la croissance cellulaire en raison de la sortie d'un grand nombre de cellules du cycle cellulaire³⁷⁰. L'intérêt majeur dans le développement de ce type de modèle est l'évaluation de l'efficacité de traitements anticancéreux, ce qui est le cas du modèle MALC. Alors qu'on s'attendrait à ce que l'organisation tridimensionnelle des cellules les protège davantage contre l'effet apoptotique des deux anticorps, l'ajout de rituximab et

d'obinutuzumab (GA101) a mis en évidence une mort cellulaire plus importante en 3D qu'en 2D²⁷¹. Cela peut s'expliquer par le fait qu'au sein de la structure 3D, certaines cibles des anticorps thérapeutiques sont suractivées, les rendant ainsi plus efficace. Toutefois, et conformément à ce qui est observé en clinique dans le LF, ce modèle a démontré que le GA101 est plus efficace que le rituximab^{261,271}. Alors que les cellules semblaient être plus sensibles à ces deux anticorps, leur exposition à la doxorubicine et à la bendamustine induit une résistance au traitement plus importante¹⁸⁰. La présence de cellules quiescentes, qui sortent du cycle cellulaire, pourrait potentiellement expliquer ce phénomène de résistance à la chimiothérapie, de même que l'expression de gènes impliqués dans la protection et la survie, et la sous-expression de la cible principale de la doxorubicine, la topoisomérase II- α ^{271,370}. La pertinence du modèle MALC à récapituler la résistance des cellules de LF aux cellules NK a été mise en évidence lors de la co-culture de lignées cellulaires de LF transformées avec des cellules NK issues de PBMC de donneurs sains. Grâce à un test de libération du Chromium-51, il a été observé que les cellules tumorales au sein des MALC étaient résistantes aux NK, avec un pourcentage de lyse très inférieur par rapport aux cellules cultivées en 2D³⁷⁰. Toutefois, dans les mêmes conditions, l'ajout de rituximab ou du GA101 provoquait la mort des cellules tumorales, suggérant qu'ensemble, les cellules NK et les anticorps monoclonaux sont capables de pénétrer dans la structure 3D et de tuer les cellules tumorales²⁶¹. Bien que ce modèle soit pertinent pour la pathologie du LF, il n'avait, jusqu'à très récemment, été testé que sur des lignées cellulaires. Faria et al. rapportent en effet un modèle sphéroïde dérivé de patients atteints de LF permettant la culture de cellules primaires dans des plaques ULA³⁷² (*résumé dans le Tableau 3, voir page 109-110*). Sur la base du volume des sphéroïdes, cette étude rapporte la possibilité de maintenir en culture les cellules primaires avec une bonne viabilité cellulaire sur une durée de 6 jours. Les sphéroïdes obtenus à partir de cellules de patients (n=9) diffèrent par leur morphologie et leur dynamique d'agrégation, soulignant une hétérogénéité inter-patient au cours de la culture cellulaire. Il a par ailleurs été observé que le microenvironnement tumoral issu des biopsies de patients était bien conservé au sein des sphéroïdes, avec peu de pertes cellulaires de j3 à j6. On note par exemple la présence de cellules T à la fois des cellules CD4⁺ et CD8⁺, mais également des cellules NK et des lymphocytes T γ/δ . De plus, par rapport à la biopsie d'origine, ce modèle permet de maintenir le phénotype exhausted des lymphocytes T CD4 et T CD8. Ce modèle dérivé de cellules primaires de patients atteints de LF semble également récapituler certaines caractéristiques du LF, avec notamment la surexpression de

signatures associées à la survie et à la prolifération et la sous-expression de signatures associées à l'apoptose et aux réponses immunitaires, par rapport à la biopsie d'origine. Enfin, l'exposition des cellules primaires de LF a des traitements anticancéreux comme le GA101 ou le nivolumab a mis en évidence que la déplétion des cellules B CD19⁺ induite par le traitement (seul ou en combinaison) est inversement corrélée au pourcentage de cellules T CD8⁺/PD-1⁺/TIM-3⁺, plus communément appelés lymphocytes T CD8 exhausted (fonctionnellement épuisés), traduisant ainsi une réponse plus faible au traitement.

D'autres types de modèles sphéroïdes ont permis **l'étude du lymphome du manteau**. On retrouve à la fois l'utilisation de lignées cellulaires représentant la pathologie (HBL-2 ou Z-138) mais aussi de cellules primaires permettant la prédiction de la réponse aux traitements^{373,374}. Il a été démontré qu'à l'inverse de la monoculture, l'ajout de fibroblastes dermiques humains aux lignées cellulaires favorisait la formation spontanée d'agrégats, induite par une augmentation de la prolifération cellulaire, soulignant la nécessité de l'interaction entre les cellules tumorales et les cellules de soutien³⁷⁴. Bien qu'on ne puisse pas en faire une généralité, cette étude a souligné l'importance de l'optimisation des modèles utilisés pour étudier une pathologie donnée. En effet, il a été observé que contrairement à la lignée HBL-2 dérivée des ganglions lymphatiques, la lignée Z-138 dérivée de la moelle osseuse a faiblement proliféré en présence de cellules stromales, ce qui laisse supposer que l'hétérogénéité du microenvironnement tumoral est spécifique au site tumoral et qu'il est crucial d'apporter les signaux spécifiques à la tumeur étudiée pour mettre au point un modèle pertinent. C'est par ailleurs ce que démontre l'étude menée par Araujo-Ayala et al. sur des cellules primaires de lymphome du manteau cultivées au sein d'un milieu de culture optimisé contenant les signaux fondamentaux délivrés par les Tfh_s et les cellules stromales, comme le CD40 ligand, l'IL-4 et BAFF respectivement (*résumé dans le Tableau 3, voir page 109-110*)³⁷³. Dans ce contexte, et aidées par l'ajout de monocytes, les cellules primaires ont formé des sphéroïdes et la viabilité et la prolifération des cellules B ont été largement augmenté par rapport à la condition contrôle, passant de 20 à 60%, et de 10 à 40% respectivement. La différenciation des monocytes en macrophages de type M2 a également été observée, avec l'expression de marqueurs spécifiques comme le CD206 et CCL22. L'avantage majeur de cette étude est la prédiction *in vivo* de la réponse des patients à l'ibrutinib après la culture d'échantillons de patients dont le suivi clinique quant à cette thérapie était connu³⁷³. En effet, les patients bons

répondeurs ont montré *in vitro* une diminution de la viabilité des cellules B lors de l'ajout d'ibrutinib. Par ailleurs, il a été mis en évidence que la combinaison de l'ibrutinib avec le nivolumab induit, *in vitro*, une diminution plus importante des cellules B chez les patients qui ne répondaient pas à l'ibrutinib seul *in vivo*. Il semblerait que l'addition du nivolumab active le système immunitaire en vue d'une réponse antitumorale car il a été observé une concentration plus importante d'IFN- γ et de granzyme B dans la culture, reflétant une réponse cytotoxique des cellules immunitaires et une efficacité supérieure suite à la combinaison des deux traitements.

Les modèles sphéroïdes ont également pu être appliqués aux cellules de LBDGC, à la fois sur des lignées cellulaires représentatives de la pathologie et des cellules primaires de patients (résumé dans le Tableau 3, voir page 109-110)^{203,273}. Bien que l'étude menée sur les lignées cellulaires soit moins pertinente, le modèle de micropuits en hydrogel utilisé a permis l'obtention de sphéroïdes uniformes, outrepassant les contraintes observées avec les méthodes classiques (gouttes suspendues ou ULA)²⁷³. L'ajout de cellules de soutien dans la culture favorise la survie cellulaire jusqu'à 14 jours pour la lignée cellulaire et 8 jours pour les cellules primaires, avec une viabilité qui passe de 63 à 48% et 30 à 80% respectivement^{203,273}. Toutefois, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence par rapport à la culture 2D, que ce soit en terme de survie cellulaire ou d'interaction entre les cellules primaires et les cellules de soutien (macrophages dérivés de monocytes (MDM) et cellules souches dérivées d'adipocytes (ADSC))²⁰³. Ces deux études évaluaient également l'efficacité de traitements anticancéreux. Le rétrécissement des sphéroïdes, synonyme d'apoptose cellulaire, était plus important lorsque la dose de doxorubicine était augmentée (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ par rapport à 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mais l'ibrutinib, à la dose de 0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$, induisait un rétrécissement plus important de la taille du sphéroïde, témoignant d'une plus grande efficacité de ce traitement²⁷³. Selon le modèle, il est nécessaire de prendre en considération le fait que l'utilisation d'un biomatériau de type hydrogel (collagène de type I ou Matrigel) joue un rôle dans la pénétration des drogues de chimiothérapie. En effet, contrairement à l'utilisation d'une solution de collagène à 2 mg/mL pour former la matrice, la solution à 1 mg/mL permettait l'obtention d'une matrice moins rigide, facilitant la pénétration du rituximab au sein de la structure et l'induction de l'ADCP, la phagocytose cellulaire dépendante d'anticorps²⁰³. Toutefois, et même dans ce contexte de diffusion facilitée du traitement au sein des sphéroïdes, il n'y avait aucune différence

significative en termes de diminution du nombre de cellules primaires entre la condition traitée et non traitée. Bien que ce modèle mime certaines caractéristiques du microenvironnement tumoral du LBDGC, *via* la co-culture des cellules primaires avec des fibroblastes et des macrophages dans un milieu suppléé en cytokines (IL-4, TNF- α et lymphotoxine α - β), l'analogie des résultats obtenus entre la culture 2D et la culture 3D questionne sur l'intérêt de son utilisation.

3.2.2.2. *L'application du modèle d'organe sur puce aux cellules de lymphomes*

Bien que l'application des modèles d'organe sur puce soit encore assez peu pratiquée dans les hémopathies malignes, on retrouve certains modèles particulièrement pertinents et adaptés à l'étude du LBDGC et du LF^{375,376}. Pour **l'étude du LBDGC**, le modèle est construit sur la base d'une macrostructure en PDMS qui enveloppe un fil d'acier inoxydable, autour duquel un réservoir d'hydrogel a été créé à l'aide d'un poinçon à biopsie de 4 mm de diamètre (*Figure 23*)³⁷⁶. L'hydrogel, composé d'un mélange de Glycosil et de Gelin-S, contient une suspension cellulaire composée i) de cellules tumorales obtenues suite à l'implantation de la lignée murine A20, équivalente au LBDGC humain, dans des souris Balb/C naïves, ii) de cellules T CD3⁺ et iii) de macrophages CD11b⁺ isolés à partir de ces mêmes souris. Une fois l'hydrogel polymérisé, le fil d'acier inoxydable est retiré, laissant un microcanal perforant l'hydrogel et le PDMS (*Figure 23*). Au sein de ce microcanal, des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires de souris sont injectées par le biais d'un système de perfusion, afin de mimer le microenvironnement du LBDGC et notamment l'interaction entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales. Ce système de perfusion a permis l'étude de l'impact de l'anticorps anti-CSF-1R, dont la liaison du ligand est nécessaire à la croissance et à la survie des macrophages CD11b⁺^{376,377}. Perfusé dans le système *via* le microcanal, cet anticorps a induit l'apoptose spécifique des macrophages par rapport à la condition contrôle où leur viabilité était similaire à celle des cellules tumorales (50% vs 70%)³⁷⁶. Par ailleurs, il a été mis en évidence que la diffusion des anticorps est plus importante lorsqu'il y a des cellules tumorales, révélant une tendance déjà observée *in vivo* dans le LBDGC, à savoir que la présence des cellules tumorales augmente la perméabilité endothéliale^{376,378}. Bien que ce modèle ne porte pas sur des cellules primaires de patients

atteints de LBDGC, il permet de récapituler dans une moindre mesure le microenvironnement tumoral mais surtout l'administration ciblée de médicaments.

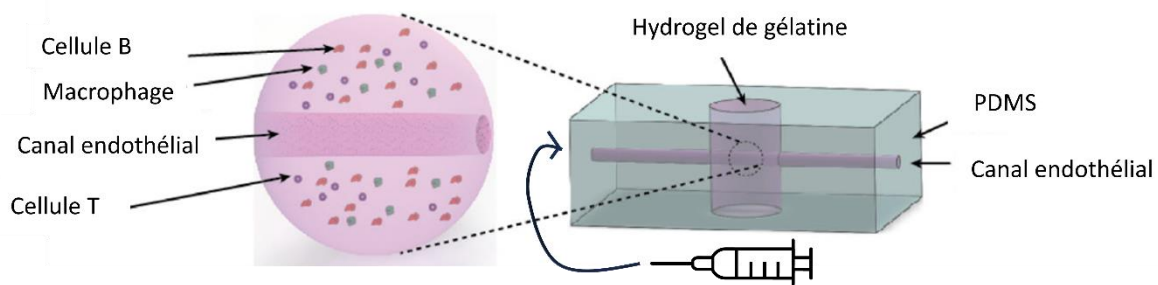


Figure 23: Modèle d'organe sur puce ayant permis l'étude du LBDGC (d'après Mannino et al. Lab Chip, 2017³⁷⁶).

L'étude portant sur le LF utilise le modèle que nous avons décrit plus haut, basé sur une encapsulation cellulaire au sein de microsphères d'alginate avec l'utilisation d'un dispositif microfluidique (Figure 21), et fait partie des rares études ayant relevé le challenge quant à la culture de cellules primaires de LF (résumé dans le Tableau 3, voir page 109-110)³⁷⁵. La majorité des résultats a été obtenue avec des lignées cellulaires, comme la lignée DOHH2, représentative du LF, co-cultivées ou non avec des cellules stromales d'amygdales (TSC) pour étudier l'impact du microenvironnement. Là où la plupart des autres modèles nécessitent un ensemencement cellulaire important, la force de ce modèle repose sur un ensemencement à j0 faible, avec environ 18 cellules par microsphères d'alginate, d'un diamètre de 216 μm , qui vont ensuite proliférer. Il est rapporté qu'en 3D le pourcentage de cellules mortes est très bas pendant la première semaine de culture (environ 20%), suivi par une augmentation de l'apoptose jusqu'à environ 60% après 8 à 12 jours de culture. Le pourcentage d'apoptose semble cependant plus important en 3D qu'en 2D. L'ajout de TSC a par ailleurs légèrement diminué ce pourcentage, mais ce n'est pas significatif. Bien que les microsphères semblent favoriser davantage la résistance des cellules à la doxorubicine par rapport à la 2D, il existe un biais. En effet, lorsque les cellules arrivent à confluence dans la sphère, la diffusion de la doxorubicine est altérée ce qui explique potentiellement la résistance observée et suggère une sous-estimation de l'effet du traitement dans ce modèle. Au vue de la viabilité des lignées

cellulaires dans les microsphères, il serait cohérent de supposer que le maintien des cellules primaires soit difficile dans ces conditions. Or, il est rapporté dans l'article que les cellules primaires de LF ont pu être maintenues en culture pendant 11 jours et que l'addition de cellules stromales et de Matrigel favorise leur survie. Toutefois, les pourcentages de survie indiqués sont rapportés au jour 3 de la culture et rien n'indique le taux de survie entre j0 et j3, biaisant potentiellement l'interprétation de ces données sur la survie cellulaire dans ce modèle³⁷⁵.

3.2.2.3. Les applications du modèle organoïde

3.2.2.3.1. Les modèles organoïdes qui imitent la réaction du centre germinatif

Le CG, lieu de rencontre avec l'antigène et de différenciation des cellules B en cellules B à mémoires et en plasmocytes, est le berceau du développement de certains lymphomes, comme le LF ou le LBDGC de type GCB (Germinal Center B-cell). Par conséquent, l'étude de la réaction qui s'y produit est cruciale pour comprendre ces pathologies. Il est rapporté dans la littérature plusieurs systèmes qui sont parvenus à mimer la réaction qui se produit dans le CG^{308,379,380,199}. En effet, bien que les cellules et les méthodes employées diffèrent, ces modèles mettent en évidence une différenciation en cellules B du CG. Wagar et al. rapportent l'utilisation d'inserts de culture cellulaire ayant une membrane perméable appelés Transwell au sein desquels les cellules B, issues de tissus amygdaliens congelés, sont cultivées et se réagrègent spontanément en cluster après 7 jours de culture³⁸⁰. Dans cette étude, la différenciation de ces cellules B ne s'effectue qu'après stimulation avec le vaccin antigrippal vivant atténué (LAIV) avec une transition précoce vers le phénotype pré-GC (CD38⁺/CD27⁻) et l'apparition de Tfh. La structure obtenue est toutefois semblable à celle d'un CG, avec une organisation de type zone claire et zone sombre et l'identification de cellules B ayant les marqueurs caractéristiques de ces zones (CD83 et CXCR4 respectivement). De plus, une augmentation de l'expression de l'enzyme AID a été détectée dans les cellules B pré-GC et GC à 4 jours de culture dans la structure. Le modèle organoïde utilisé par Singh et al. est plus complexe et s'appuie sur l'emploi d'un hydrogel composé de polyéthylène glycol à 4 bras fonctionnalisé par des extrémités de maléimide (PEG-4MAL)^{308,379}. Chaque MAL du PEGMAL est ensuite fonctionnalisé avec des peptides adhésifs à terminaison cystéine se liant à des

intégrines par une réaction d'addition de type Michael. Considérant l'importance du microenvironnement retrouvé dans le CG, les auteurs ont inclus au sein même de l'hydrogel des peptides ligands d'intégrine qui vont venir mimer les interactions entre les cellules B et les cellules du microenvironnement (Figure 24). Parmi eux, le peptide « REDV » (GREDVGC) mime la molécule d'adhésion aux cellules vasculaires VCAM-1 qui se lie à l'intégrine $\alpha4\beta1$ sur les cellules B. Selon les expériences menées, le peptide « RGD » (GRGDSPC) a été utilisé et mime la vitronectine, une protéine de la MEC qui interagit avec les cellules B par l'intégrine $\alpha4\beta3$. L'hydrogel est ensuite réticulé avec le peptide « VPM » (GCRDVPMSMRGGDRCG), en raison de sa grande sensibilité à la dégradation par les métalloprotéinases matricielles (MMP), et un réticulant non dégradable, le dithiothréitol (DTT), dans un rapport de 1:1, afin de maintenir la stabilité de l'hydrogel tout en favorisant la survie des cellules en son sein. Ainsi, au sein de ces hydrogels, la co-culture de cellules primaires murines B naïves avec des cellules stromales CD40LB, qui expriment le CD40L murin à la surface et qui sécrètent BAFF, permet aux cellules B d'acquérir un phénotype de type CG en seulement 4 jours avec l'expression du marqueur GL7⁺ et des marqueurs spécifiques de l'une des deux zones du CG, à savoir la zone claire (CD83^{high} CXCR4^{low}) ou la zone sombre (CXCR4^{high} CD83^{low})³⁰⁸. Graney et al. ont rapporté l'utilisation de ce modèle organoïde afin d'étudier la bactérie résistante aux antibiotiques *Klebsiella pneumoniae*, qui ne parvient pas à induire une réponse des cellules B du CG compliquant ainsi la production d'anticorps pour lutter contre son infection, et ont identifié le mode de présentation des antigènes protéiques intégrés à la membrane³⁶⁸.

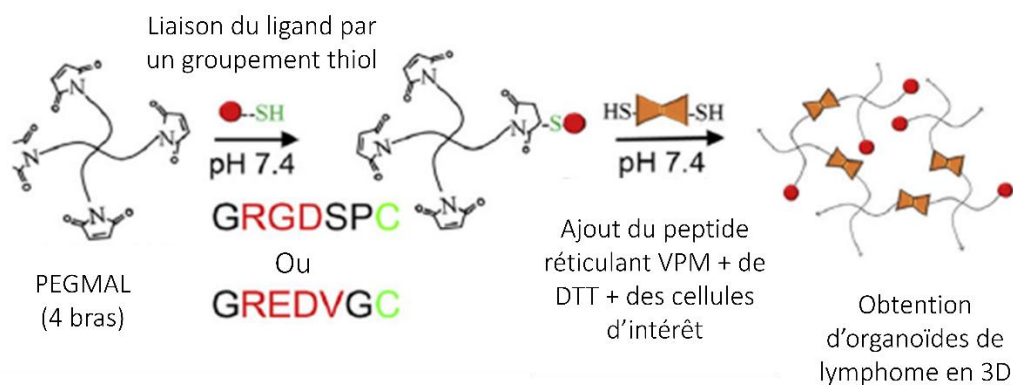


Figure 24: Représentation schématique de la formation des hydrogels permettant la formation d'organoïdes (d'après Tian et al. *Biomaterials*, 2015¹⁹³).

Braham et al. rapportent l'utilisation d'un modèle similaire à celui de Singh et al., avec la formation d'hydrogels à partir de PEGMAL et de peptides comme le peptide REDV¹⁹⁹. La co-culture de cellules B normales obtenues à partir de PBMC avec des fibroblastes murins exprimant le CD40L humain et des cellules stromales lymphoïdes dérivées d'amygdale humaine, a favorisé la différenciation terminale des cellules B en plasmablastes et en plasmocytes matures. Par ailleurs, l'ajout de diverses cytokines, dont l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-15 et l'IL-21 entre autres, dans le milieu de culture a contribué à la différenciation cellulaire. Ces trois études rapportent également la commutation de classe d'isotype des cellules B cultivées au sein de ces modèles. En effet, après 7 jours de culture dans les Transwell, le séquençage du BCR des cellules B totales non naïves a mis en évidence une commutation de classe d'isotype principalement d'IgM à IgG1³⁸⁰. Il en est de même pour l'étude de Singh et al. où la culture de cellules B murines naïves, provenant de la rate de souris EZH2^{fl/fl} Cγ1-cre, dans l'organoïde a mis en évidence une diminution significative de l'expression d'EZH2 par rapport au groupe contrôle, signifiant qu'il y a eu commutation de classe d'isotype³⁰⁸. En effet, l'excision du gène *EZH2* est induite par l'expression de la recombinaise Cre spécifiquement dans les cellules B du GC ayant subi la commutation de classe d'IgM à IgG1³⁰⁸. Braham et al. démontrent également une commutation de classe d'isotype des cellules B naïves CD19⁺IgD⁺ en cellules IgG⁺ ou IgA⁺¹⁹⁹. Ces modèles sont également parvenus à mimer la différenciation terminale des cellules B avec une diminution de l'expression des marqueurs du GC (BCL6 et EZH2) et une augmentation de l'expression des marqueurs plasmocytaires (IRF4 et CD138) après stimulation des cellules ayant switchées avec un anti-IgM dans l'étude de Singh³⁰⁸, l'apparition d'une proportion plus importante de plasmablastes après stimulation des cellules à l'immunogène LAIV et la production d'anticorps IgG spécifiques dans l'étude de Wagar³⁸⁰ ainsi que dans l'étude de Braham¹⁹⁹. Enfin, dans les études de Singh et Wagar, les modèles utilisés ont permis l'obtention de cellules ayant une forte affinité pour l'antigène NP (4-hydroxy-3-nitrophénylacétyl) et l'hémagglutinine après stimulation du récepteur de mort cellulaire FAS et stimulation avec LAIV respectivement^{308,380}. Parmi les études mentionnées plus haut, seule celle de Braham et al. rapporte la comparaison de la culture organoïde à la culture 2D, où il a été mis en évidence une meilleure survie cellulaire en 3D, avec des clusters de cellules mortes plus importants en 2D¹⁹⁹. Par ailleurs, il est important de prendre en considération l'avantage du modèle de Singh dans la mise au point du modèle en termes de consommation en cellules. En effet, là où il n'y a besoin que de 10x10⁴ cellules B par hydrogel, le modèle de Wagar requiert

entre 2 à 6×10^6 cellules B^{308,380}. Contrairement à la disponibilité généralisée d'amygdales humaines, pour des échantillons tumoraux et notamment dans le cas de lymphomes comme le LF, la réserve est très limitée et un tel ensemencement n'est pas possible si l'on souhaite faire plusieurs réplicats et multiplier les conditions.

3.2.2.3.2. *Adaptation du modèle organoïde aux cellules de lymphomes*

Deux études rapportent l'utilisation du modèle de Singh afin d'évaluer la réponse des cellules de lymphomes B à certaines thérapies dans un système prenant en considération le microenvironnement tumoral^{193,381}. Bien que toutes deux intéressantes, elles diffèrent néanmoins par la pertinence des cellules cultivées dans les organoïdes, des lignées cellulaires pour l'une¹⁹³ et des cellules primaires pour l'autre (*résumé dans le Tableau 3, voir page 109-110*)³⁸¹. Tian et al. démontrent que la co-culture de lignées cellulaires de LF transformé (DOHH2 et SUDHL-6) ou de LBDGC (HBL-1) avec la lignée cellulaire HK favorise la résistance des cellules B à des drogues de chimiothérapie conventionnelle comme la doxorubicine ou à des médicaments épigénétiques comme le panobinostat, un inhibiteur des histones désacétylases¹⁹³. Dans le LBDGC, la protéine MALT1 (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma translocation protein 1) est nécessaire à la prolifération et à la survie cellulaire, en agissant comme une paracaspase pour cliver les inhibiteurs de NF- κ B³⁸². Les cellules primaires de patients atteints de LBDGC de type ABC (Activated-B-cell) cultivées avec des fibroblastes murins transfectés avec du CD40L humain montrent une résistance à l'inhibiteur de la protéine MALT1, MI2 (Menin-MLL Inhibitor)^{381,382}. Toutefois, en absence de signal CD40L, MI2 induit une mort cellulaire plus importante, ce qui souligne le rôle protecteur de ce signal. Outre les cellules de soutien et le signal CD40L, l'interaction des cellules tumorales avec les protéines de la MEC par le biais d'intégrines joue également un rôle dans cette chimiorésistance³⁸³. Il a en effet été démontré qu'en absence de CD40L, les hydrogels fonctionnalisés avec REDV (VCAM-1), RGD (vitronectine) ou avec du collagène-1 modulent la réponse des lignées cellulaires aux inhibiteurs de MALT1 avec un renforcement de la signalisation de MALT1 et une diminution de l'efficacité de son inhibition³⁸¹. Une autre étude rapporte que l'inhibition pharmacologique de l'intégrine $\alpha\beta$ 3 avec le cilengitide, un inhibiteur sélectif des intégrines $\alpha\beta$ 3 et $\alpha\beta$ 5, diminue la prolifération des cellules T malignes à la fois *in vitro* et dans un modèle de xénogreffes de

souris dérivées de patients³⁸⁴. Ceci souligne la nécessité de prendre en considération l'ensemble des éléments du microenvironnement lors de l'évaluation des thérapies. En vue d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients, la combinaison de plusieurs thérapies ciblant différentes cellules du microenvironnement pourrait potentiellement atténuer la résistance au traitement. L'étude menée par Shah et al. a alors mis en évidence que la combinaison de MI2 avec le dasatinib ou le masitinib, des inhibiteurs agissant sur la voie des Src kinases qui joue un rôle dans l'activation chronique de la signalisation du BCR dans les ABC-LBDGC, a considérablement réduit la viabilité de la lignée cellulaire HBL-1 (représentative du LBDGC) (environ 30 à 40 % par rapport aux conditions contrôles)³⁸¹. De plus, la combinaison de l'idelalisib, un inhibiteur de PI3K, avec MI2 a induit une diminution de la survie de 100% à 65% par rapport à la condition non traitée, que ce soit avec la lignée cellulaire HBL-1 ou pour les cellules primaires issues de PDX. Bien que dans l'étude de Shah et al. certaines expériences aient été menées sur des cellules primaires de patients, il ne s'agit pas de cellules primaires obtenues d'une biopsie tumorale de patient ensuite cultivées dans l'hydrogel, mais plutôt de cellules primaires ayant d'abord été greffées chez la souris puis récupérées et cultivées au sein de l'hydrogel, ce qui peut introduire des biais. En effet, l'un des risques majeurs de ce procédé est la perte du microenvironnement tumoral en raison du nombre de passages effectués chez la souris, ce qui n'est alors pas représentatif de la complexité tumorale et peut être responsable d'une sous-estimation ou d'une surestimation de la réponse aux traitements observée ici. Par ailleurs, un autre biais est que ce procédé peut induire la sélection d'un clone résistant, non représentatif de l'hétérogénéité tumorale. Néanmoins, cette étude a fait ressortir une observation intéressante, importante dans le cadre de mon projet de thèse et en corrélation avec les résultats obtenus au cours des expériences que nous avons menées. Il a en effet été établi que l'addition de cellules stromales exprimant le CD40L au sein des organoïdes a induit une augmentation de la concentration inhibitrice médiane (IC50) lorsque les cellules étaient traitées par MI2, dasatinib, masatinib ou encore idelalisib, témoignant d'une sorte de protection fournie par le signal CD40L, dont nous reparlerons un peu plus tard notamment dans la partie résultat ainsi que la discussion de ce manuscrit.

➔ Le tableau 3 ci-dessous récapitule les diverses études réalisées sur des cellules primaires de LF, de LBDGC et de lymphome du manteau.

Tableau 3 : Récapitulatif des études menées sur des cellules primaires de lymphomes.

	Pathologie étudiée	Modèle utilisé	Nombre de cellules ensemencées	Viabilité cellulaire	Criblage thérapeutique réalisable ?	Avantage 3D par rapport à la culture 2D ?
<i>Goval et al., Haematologica, 2008</i>	Lymphome folliculaire	Culture 2D de cellules primaires de LF	5x10 ⁵ cellules primaires avec 1x10 ⁶ cellules stromales	Les cellules stromales améliorent la viabilité des cellules : 30 à 40% d'apoptose vs à 80% lorsque les cellules sont cultivées seules à J6	Pas de criblage thérapeutique dans cette étude	Pas de comparaison 3D vs 2D
<i>Epron et al., Leukemia, 2012</i>	Lymphome folliculaire	Culture 2D de cellules primaires de LF	7,5x10 ⁵ cellules primaires par mL avec 1,5x10 ⁵ monocytes/macrophages	Les monocytes/macrophages améliorent la survie des cellules primaires de LF à J7	Pas de criblage thérapeutique dans cette étude	Pas de comparaison 3D vs 2D
<i>Foxall et al., Frontiers in Immunology, 2021</i>	Lymphome B diffus à grandes cellules	Utilisation d'une matrice de collagène de type I pour former des sphéroïdes	10 ⁶ cellules primaires de LBDGC avec un ratio de 100 cellules primaires pour 1 cellule stromale (MDM + ADSC)	Entre 30 et 80% à 8 jours de culture (échantillons dépendante)	Oui mais la rigidité de la matrice peut altérer la diffusion des drogues de chimiothérapie	Analogie des résultats obtenus
<i>Araujo-Ayala et al., Leukemia, 2023</i>	Lymphome du manteau	Culture dans des plaques ULA pour former des sphéroïdes	5x10 ⁴ cellules primaires et 1,25x10 ⁴ cellules stromales	Les cellules stromales améliorent la viabilité des cellules B : 20 à 60% par rapport à la condition contrôle	Oui, parvient même à prédire la réponse des patients à l'ibrutinib	Meilleurs résultats obtenus en 3D
<i>Lamaison et al., Blood Adv, 2021</i>	Lymphome folliculaire	Utilisation de microsphères d'alginate associées à un dispositif microfluidique pour former des sphéroïdes	Encapsulation d'environ 18 cellules par sphères (lignées cellulaires ou cellules primaires) en présence de cellules stromales	Bien que le nombre de cellules par capsule diminue de moitié, il y a moins de 10 cellules mortes par capsule à J3 et J14	Oui, sur lignées cellulaires mais pas sur cellules primaires. Mais l'arrivée à confluence des cellules dans la sphère, la diffusion est altérée	Meilleurs résultats obtenus en 3D
<i>Shah et al., Nature Materials, 2023</i>	Lymphome B diffus à grandes cellules	Utilisation d'un modèle d'hydrogel permettant de former des organoïdes	8x10 ⁴ -2x10 ⁵ cellules primaires issus de PDX avec 5x10 ⁴ cellules stromales exprimant le CD40L	La survie des cellules primaires de LBDGC est nettement améliorée lorsqu'elles sont cultivées en présence de CD40L	Oui, mise en évidence que le modèle parvient à diminuer la survie des cellules primaires avec la combinaison de plusieurs traitements.	Meilleurs résultats obtenus en 3D

<p><i>Faria et al. J Immunother. Cancer, 2023</i></p>	<p>Lymphome folliculaire</p>	<p>Culture de cellules primaires dans des plaques ULA pour former des sphéroïdes dérivés de cellules de patients.</p>	<p>25x10³ cellules primaires issues de biopsies de LF</p>	<p>Bien qu'il n'y ait pas de données de viabilité, l'augmentation du volume des sphéroïdes obtenus (de j0 à j6) semble attester d'une viabilité/ prolifération cellulaire plus importante.</p>	<p>Oui, les cellules primaires ont été traité avec un anti-CD20 et un anti-PD-1. Diminution de la survie cellulaire sous traitement.</p>	<p>Pas de comparaison 3D vs 2D</p>
---	------------------------------	--	--	--	--	------------------------------------

OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif de cette thèse était de développer un modèle de culture 3D permettant de maintenir en culture des cellules primaires de LF issues de biopsies dans l'optique de faire du criblage thérapeutique de médicaments anticancéreux couramment utilisés dans cette pathologie. Pour ce faire, nous avons adapté le modèle 3D organoïde mis au point par l'équipe de Singh et al., initialement utilisé pour reproduire la réaction du CG mais également pour évaluer l'effet de certains traitements. Dans un premier temps, nous avons évalué la survie des cellules primaires de LF cultivées au sein du modèle 3D organoïde. L'ajout de certains signaux initialement fournis par les cellules du microenvironnement tumoral, comme le facteur d'activation des cellules B (BAFF) et le CD40L, nous permettront, le cas échéant, de prolonger la survie des cellules tumorales. En parallèle, nous avons travaillé sur des échantillons de patients atteints de LF au diagnostic, c'est-à-dire avant traitement, et pour lesquels le suivi clinique était disponible et connu quant à l'immunochimiothérapie de type R-CHOP. Les patients étaient considérés comme bons répondeurs si la maladie ne progressait pas dans les 24 mois suivant le diagnostic, et mauvais répondeurs si la maladie progressait dans les 24 mois suivant l'initiation au traitement (POD24). Les cellules de ces patients ont été exposées au R-CHOP dans le modèle 3D organoïde afin de comparer la réponse obtenue *in vitro* par rapport à celle obtenue *in vivo*, et ainsi établir un modèle permettant de prédire la réponse des patients au traitement. Des données de single-cell RNA-seq issues d'une cohorte de patients atteints de LF, à la fois bons et mauvais répondeurs, ont également été exploitées en vue i) d'investiguer l'hétérogénéité intra-tumorale du LF et d'identifier à l'échelle « single-cell » des signatures transcriptomiques obtenues lors du profilage de l'expression génique d'échantillons de LF provenant de l'essai clinique PRIMA mais également, dans la mesure du possible ii) de corréler les mécanismes de chimiorésistance chez les patients qui ne répondent pas au traitement.

Le modèle 3D organoïde dérivé de patients atteints de LF a permis de démontrer la possibilité de maintenir en culture ces cellules jusqu'à 3 jours, avec un pourcentage de cellules primaires de LF significativement supérieur en 3D qu'en 2D. L'évaluation de la réponse thérapeutique au R-CHOP a mis en évidence que les réponses au traitement observées au sein du modèle 3D organoïde corrélaient étroitement avec ce qui est observé *in vivo*. Nous rapportons ici que les Tfh, une sous-population de cellules T, semblent impliqués dans la chimiorésistance.

Les résultats de ce travail de thèse seront présentés sous forme de deux articles scientifiques en phase de soumission. Une première partie de ces travaux rapporte les résultats

que nous avons obtenus grâce au modèle 3D organoïde, qui seront soumis dans la revue scientifique Blood, tandis que la deuxième partie est axée sur l'analyse des données de scRNA-seq issues de notre cohorte de patients atteints de LF, leur interprétation et leur corrélation aux résultats obtenus sur du bulk RNA-seq par notre équipe en 2018, dont les résultats seront soumis dans la revue scientifique Leukemia.

RESULTATS

ARTICLE 1

En cours de soumission

Tfh cells predict response to chemoimmunotherapy in a primary follicular lymphoma organoid model

**Narimène Houmera^{1,2}, Aurélie Verney^{1,2}, Léo-Paul Heraud^{1,2}, Laurent Genestier^{1,2#},
Sarah Huet^{1,2,3#}**

¹ CIRI - Centre International de Recherche en Infectiologie, Team Lymphoma Immunobiology, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, Lyon, France.

² Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon-sud, Université de Lyon, Oullins, France.

³ Laboratory of Hematology, Centre Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France.

LG and SH contributed equally as senior authors.

Short title: Organoid model of primary follicular lymphoma

Corresponding author: Laurent Genestier, laurent.genestier@inserm.fr and Sarah Huet, sarah.huet@chu-lyon.fr

Funding: This investigation was supported by INSERM and UCBL grants and by grant from la Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) and la Société Française d'Hématologie (SFH) to NH.

Abstract

Follicular lymphoma (FL) is the second most common subtype of non-Hodgkin lymphoma (NHL) in western countries. Several observations pinpoint the crucial role of the surrounding microenvironment in the development and/or progression of FL cells. Although chemoimmunotherapy (RCHOP) induces high rates of complete remission, almost all FL patients will experience multiple relapses post-treatment. Therefore, *in vitro* models mimicking heterogeneity of FL with their cellular environment are urgently required for a better clinical care of patients. In this regard, we adapted a 3D organoid model recapitulating extracellular matrix and tumoral microenvironment of FL tumors. Cryopreserved FL samples (n=18) from diagnostic biopsies were thawed and all cells from the FL biopsy were seeded in the 3D organoid model. We first demonstrated that culture of primary FL samples in the 3D organoid improves FL cell survival compared to the 2D culture. Surprisingly, addition of exogenous CD40L signal, that has been previously shown to prevent FL cell death in 2D culture, was detrimental for primary FL survival in the 3D organoid culture. This result suggests that introduction of CD40L signal in addition to those delivered by endogenous T follicular helper (Tfh) cells may potentially lead to new therapeutic solutions for FL patients. Second, we found that the 3D organoid captures clinical heterogeneity of FL patients to chemoimmunotherapy, with poor clinical responders showing significant higher resistant to RCHOP in the 3D organoid model compared to good responder patients. We then demonstrated that response to RCHOP in the 3D organoid culture was correlated to the proportion of Tfh cells in the primary FL sample. Finally, although CD40 signaling can trigger chemoresistance of good responder FL samples to RCHOP in the 3D organoid culture, it was not the only factor responsible for resistance associated to Tfh of poor responder patients to RCHOP.

Introduction

Follicular lymphoma (FL) is the second most common subtype of non-Hodgkin lymphoma (NHL) in western countries¹. FL arises from developmentally blocked germinal centre (GC) B cells that retain phenotypic and functional features of normal GC B cells and persistence of a follicular structure with tight interactions with the GC microenvironment². FL B cells are strongly dependent on a permissive microenvironment supported by a dense stromal network of follicular dendritic cells (FDC), T follicular helper (Tfh) cells and extracellular matrix^{3,4}. In addition, the FL niche is also characterized by a bias in the differentiation of mesenchymal stromal cells towards lymphoid-like stromal cells⁵. As a consequence, the FL microenvironment promotes tumor growth and treatment resistance, mainly by activating B cell receptor (BCR), producing pro-tumoral cytokines such as IL-4 by Tfh cells and fostering immune escape^{2,3,6-9}. Although FL typically presents as an indolent disease, most patients will require treatment with a chemoimmunotherapy combining an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab or obinituzumab) with cyclophosphamide, hydroxyadriamycine, vincristine and prednisone (CHOP) or bendamustine, followed by a 2-year maintenance with anti-CD20¹⁰. Outcomes after first-line treatment remain heterogeneous with a particularly poor prognosis for 20% of the patients experiencing disease progression during the first 24 months (POD24)¹¹. Despite numerous efforts to prospectively identify these patients through analyzing driver mutations or gene expression, none have been successful in personalizing first-line treatment^{12,13}. An alternative approach, known as functional precision oncology, which measures the response of living cells to perturbations, has the potential to improve the prediction of response to therapy¹⁴. However, this type of analysis has been so far limited in FL due to the lack of adequate *in vitro* models and the rare and high-cost models of patient-derived xenografts in immunodeficient mice¹⁵. Patient-derived 3D organoids have become important preclinical model systems for cancer research¹⁶. Compared to the 2D cultured cancer cell lines, these organoid models genetically and phenotypically mirror the original tumor, which paves the way for translational applications, such as high-throughput drug screens and personalized medicine¹⁷. However, most patient-derived 3D organoid models originate from epithelial cancers and hematological malignancies such as lymphomas remain a major challenge in organoid technology. Here, we adapted a patient-derived 3D organoid FL model using a previously engineered 3D tumor organoid presenting adhesive peptides mimicking interactions between the vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) expressed by FDC and $\alpha 4\beta 1$ (VLA4)

integrin on B-cells in the context of GC interactions^{18,19}. We provide evidence that interpatient heterogeneity regarding treatment response is better evidenced in the 3D organoid compared to 2D culture and depends on Tfh cell numbers present in the FL sample.

Methods

Primary FL samples and fibroblastic L-cells

Biopsy samples from FL patients, obtained at diagnosis and for which clinical follow-up was available regarding R-CHOP immunochemotherapy, were provided by the Centre de Ressources Biologiques of the Hospices Civils de Lyon and from CeVi collection (CALYM), and were preserved as frozen cell suspensions in 10% fetal calf serum (FCS) and dimethylsulfoxide (DMSO) at -150°C until use. Written informed consent for the use of their samples in research protocol was obtained from the patients in accordance with the Declaration of Helsinki. Mouse fibroblastic L-cells stably transfected either with the human CD40 ligand (CD40L) (L-cells CD40L) or without CD40L (L-cells) described before^{20,21} were obtained from Schering-Plough (Lyon, France) and cultured in RPMI 1640 medium with GlutaMax™ (Gibco) supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin streptomycin (P/S). When cultured, L-cells CD40L were constantly selected with medium containing 0.5 mg/mL geneticin (G418) (Sigma Aldrich, catalog number 108321-42-2).

Polymers and peptides

Four-arm PEG-MAL 20K with a molecular weight of 20 kDa was purchased from Laysan Bio (Arab, AL) with >90% purity (catalog number 4arm-PEG-MAL-20K-5g). Peptides were custom purchased from AAPPTec (Louisville, KY) and include the VCAM-1 protein-mimicking peptide « REDV » (GREDEVGC, purity >95%) and the matrix metalloproteinases (MMP)-9 sensitive crosslinker (GCRDVPMSMRGGDRCG, purity >95%). The non-degradable crosslinker dithiothréitol « DTT » was purchased from Sigma Aldrich (catalogue number DTT-RO).

Chemical compounds, drug compounds and soluble factors

Mitomycin C was purchased from Sigma-Aldrich (catalogue number MO503). RCHOP compounds were purchased from the hospital pharmacy facilities of Lyon Sud Hospital (Pierre-Bénite, France). Human recombinant IL-4 was purchased from Peprotech (catalog number 200-04). Recombinant Human BAFF (carrier-free) was purchased from BioLegend (catalog number BLE559604). Recombinant Human CD40 Ligand/TNFSF5 (HEK293-expressed) (carrier-free) was obtained from R&D System (catalog number 6420-CLB) with HA-Tag purchased from Cell Signaling (catalog number 3724). In vitro blocking of CD40/CD40L signaling was performed with InVivoMAb anti-human/monkey CD40L (CD154) with a control condition using InVivoMAb mouse IgG2a isotype control obtained from BioXCell (catalog number BE0292 and BE0085 respectively).

Antibodies

Anti-human antibodies used for flow cytometry experiments include anti-human Light Chain λ (BD Horizon™, BV421, catalog number 562893), anti-human CD335 (NKp46) (BioLegend, Pacific Blue™, catalog number 331911), anti-human CD21 (BD OptiBuild™, BV480, catalog number 746613), anti-human CD278 (ICOS) (BD OptiBuild™, BV510, catalog number 744930), anti-human CD20 (BD Horizon™, BV711, catalog number 563126), anti-human CD195 (CCR5) (BD Horizon™, BV786, catalog number 565001), anti-human CD19 (MACS Miltenyi Biotec, VioBright B515, 130-113-175), anti-human CD14 (BD Biosciences™, PerCP, 345786), anti-human CD45 (BD Biosciences™, PerCP-Cy5.5, 332784), anti-human CD4 (BD OptiBuild™, BB700, 745981), anti-human CD16 (BD Pharmingen™, PE, 555407), anti-human CD10 (BD Horizon™, PE-CF594, 562396), anti-human CD279 (PD-1) (BD Pharmingen™, PE-Cy7, 561272), anti-human Kappa (BD Biosciences™, APC, 341108), anti-human CD116 (BD Pharmingen™, Alexa Fluor647, 564046), anti-human CD3 (BD Horizon™, APC-R700, 565119), anti-human CD8 (BD Pharmingen™, APC-H7, 560179). Human Fc Block and Annexin V FITC were purchased from BD Biosciences (catalog number 564220 and 556419 respectively).

Hydrogel-based organoids preparation

The organoids were engineered using a 7.5% (w/v) PEG-4MAL macromer concentration supplemented with adhesive peptides and crosslinker. PEG-MAL macromers were first functionalized at 7.4 pH with thiolated adhesive peptide REDV at a 4:1 MAL-to-peptide molar ratio during 30 minutes at 37°C. MMP-9 protease-sensitive crosslinker VPM and non-degradable crosslinker DTT were combined at a 1:1 VPM-to-DTT molar ratio and adjusted to pH 6. Both mixtures were resuspended using PBS⁺⁺ supplemented with 1% of HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid). The cell suspension, containing all primary cells from patients with FL, is obtained by thawing the patient sample on the day of the experiment. Prior to cell encapsulation, 100000 total cells from FL biopsies alone or with 40000 CD40L-expressing L-cells or control L-cells were suspended in the crosslinker solution. Hydrogel organoids were formed by depositing 5 µL of PEGMAL solution in the middle of a well of a non-treated 96 well plate to which 5 µL of cell-containing crosslinkers solution was added and mixed with the first droplet by pipeting 2-3 times. Once all the hydrogel droplets were prepared, they were polymerized during 15 minutes at 37°C for complete crosslinking. After that, 200 µL of RPMI 1640 medium with GlutaMax™ (Gibco) supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS), 1% penicillin streptomycin (P/S), 10 ng/mL of human IL-4 and 20 ng/mL of soluble BAFF were added to each well containing hydrogel organoids. Depending on culture condition, 100 ng/mL of soluble CD40L, 5 µg/mL of anti-CD40L blocking or isotype control were added to the media. The cells were cultured for 3 days, and the medium was changed on day 2, i.e., 48 hours after seeding the cells in the hydrogel.

Drug response in 3D organoids

Patients' response to chemotherapy in organoids was studied at d1 post-encapsulation of primary cells within the organoids. RCHOP was added to the culture on d0 and for 16h, at the following concentrations:

	Rituximab ($\mu\text{g/mL}$)	Cyclophosphamide ($\mu\text{g/mL}$)	Hydroxyadriamycine ($\mu\text{g/mL}$)	Vincristine ($\mu\text{g/mL}$)	Methylprednisolone ($\mu\text{g/mL}$)
C1	0.156	0.313	0.020	0.0006	0.017
C2	0.313	0.625	0.042	0.001	0.035
C3	0.625	1.250	0.083	0.002	0.007

After a 16-hour incubation with R-CHOP, primary cells were extracted from the hydrogels through a one-and-a-half-hour enzymatic digestion using a solution of collagenase type IA. This solution is composed of collagenase resuspended in serum-free media, resulting in a final concentration of 125 U/mL. Cells were then stained for flow cytometry analysis as described below.

Flow cytometry analysis

Cell phenotypes were performed on primary FL samples after dissociation or after harvest from hydrogel organoids immediately at d0 post-encapsulation, at d1 and at d3 of culture with enzymatic degradation for 1h30 using collagenase solution. Cells were first re-suspended in FACS buffer containing human Fc Block (1:25 dilution), then incubated at 4°C in the dark for 10 minutes. After a FACS buffer wash, cells were re-suspended in brilliant buffer containing antibodies and incubated at 4°C in the dark for 15 minutes. Finally, after another FACS buffer wash, cells were re-suspended in Annexin V 1X buffer containing Annexin V (1:25 dilution) at room temperature in the dark for 10 minutes and then re-suspended in the same buffer before the plate being load in the plate reader of the Cytel Aurora. Flow cytometry data were acquired using Cytel Aurora 4 lasers (Spectral Flow Cytometry, Cytel Biosciences) and analyzed with SpectroFlow® software. For multiparametric analyses, dimensional reduction and clustering were done using OMIQ data analysis software (OMIQ, Inc. Santa Clara, CA) after preliminary cleaning of data for aggregates, and debris. All living cells (annexin V negative) from all samples were selected for subsequent analysis on the OMIQ platform. Subsequently, an opt-SNE analysis was performed to visualize the different subsets in group and the expression level of relevant markers.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (La Jolla, CA). Data are generally presented as Mean \pm S.E.M with significance as defined in figure legends. Most statistics involved non-parametric t-test as Wilcoxon for paired data or Mann-Whitney for unpaired data, as indicated in figure legends. As only a single vial is usually available, and patient samples are precious, all experiments involved 3 to 5 replicates, but have not been repeated several times for some samples.

Results

The 3D organoid improves FL cell survival compared to the 2D culture

Primary FL cells are highly dependent on their microenvironment to survive, which may explain why previous attempts to grow these cells in *in vitro* 2D culture have failed²². We therefore hypothesized that a 3D organoid model fostering interactions between tumor cells, tumor microenvironment and extracellular matrix could offer a supportive context. We therefore developed a patient-derived 3D organoid FL model using a previously engineered 3D tumor organoid using PEG-MAL macromers that were functionalized with thiolated adhesive peptide REDV, mimicking VCAM-1 and then crosslinked with MMP-9 protease-sensitive crosslinker VPM and degradable crosslinker DTT^{18,19}. Viably cryopreserved FL samples (n=18) from diagnostic biopsies ([Supplementary Table 1](#)) were thawed and 10⁵ total cells from the FL biopsy were cultured within the organoids. Culture medium supplemented with BAFF and IL-4, to mimic the selective signaling of soluble factors produced by FDC and Tfh cells, respectively, was then added to immerse the organoid ([Figure 1A, B](#)). To document immune phenotype and survival of FL cells in the 3D organoid, we designed an 18-color flow cytometry panel allowing identification of tumor FL cells, normal B cells, T cells, Tfh cells, FDC, NK cells, monocytes/macrophages ([Supplementary Table 2](#)). To define the different populations presents in the 3D organoid, we conducted unsupervised analyses using concatenated samples from all patients cultured from d0 to d3 without RCHOP treatment. Two dimensions reduction, using t-distribution stochastic neighbor embedding (t-sne) and computer-driven clusterisation through FlowSOM done on cell all markers, identified 30 clusters ([Supplementary Figure 1](#)) corresponding to classical immune lineages (B cells, T cells, NK cells and macrophages) ([Figure 1C](#)). Projection of selected markers such as CD19 and CD10 defining FL cells, CD3

defining T cells and CD3, CD4, PD1 and ICOS defining Tfh cells showed maintenance of the primary cell phenotype from day 0 to day 3 (Figure 1D). Distribution of the tumor FL cells, Tfh cells and NK cells was not significantly impacted in the 3D organoid culture for 3 days whereas macrophages decreased throughout the culture (Figure 1E). Of note, stromal cells such as FDC (CD45⁻ CD21⁺) were not detected whatever the time point studied, reinforcing the rationale for adding the REDV peptide mimicking VCAM-1 (interacting with VLA4 on FL cells) and soluble BAFF, both expressed by FDC. To assess the suitability of this 3D organoid model for culturing primary FL cells compared to traditional 2D culture, we compared the survival of these cells by culturing them under the same growth conditions (addition of soluble BAFF and IL-4) in both culture models. Survival of primary FL cells was studied using supervised analysis (Supplementary Figure 2) and showed a significant improvement at day 1 when cultured in the organoid model compared to the 2D culture (Figure 1F). However, at d3 the difference between the two culture conditions was not significant. To improve survival of these cells and to culture them over a longer period, CD40L-expressing L-cells were added to the culture medium to increase survival signal delivered by Tfh cells. Surprisingly, addition of further CD40L via L-cells significantly decreased the number of primary FL cells compared to conditions under which FL cells were cultured in the absence of L-cells or with control L-cells (Figure 1G). The effect of CD40 signaling on FL cells was mainly associated with an increased percentage of apoptosis (Supplementary Figure 3A). This result was confirmed when primary FL cells were cultured in 3D organoid supplemented with increasing concentration of trimeric soluble CD40L (Supplementary Figure 3B), suggesting that excess of CD40 signaling was detrimental for primary FL survival, when cultured in the presence of Tfh cells in the 3D organoid.

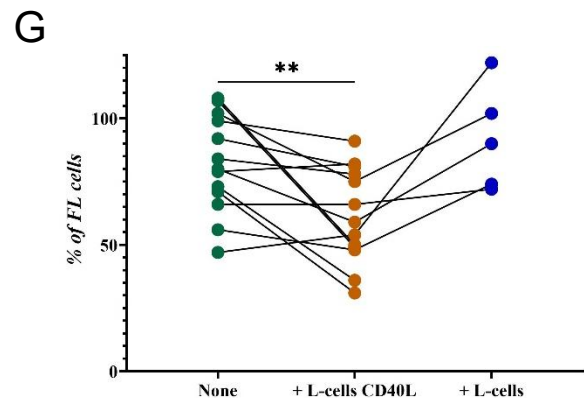
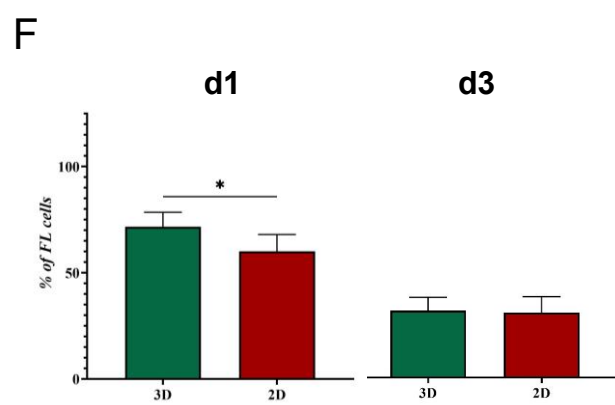
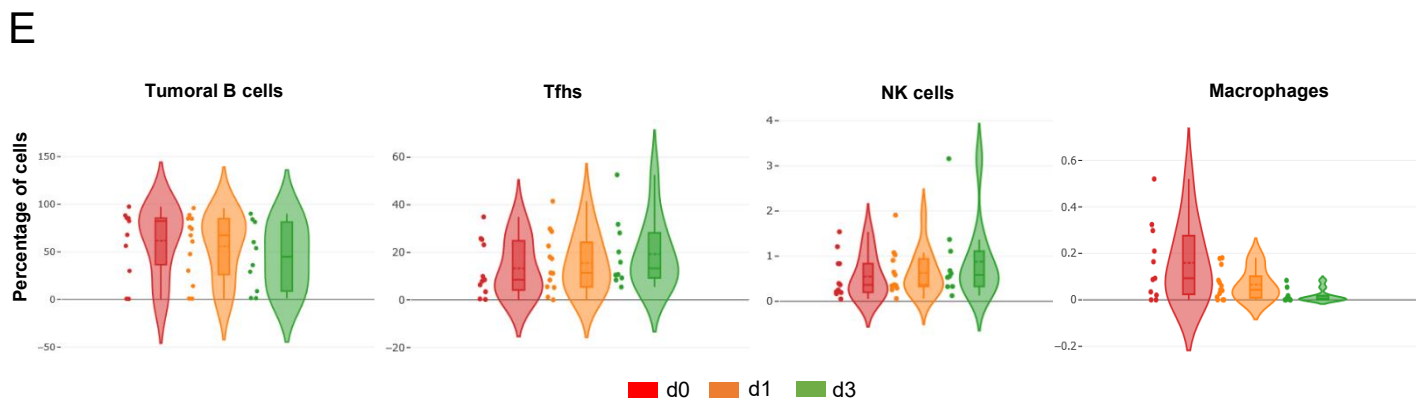
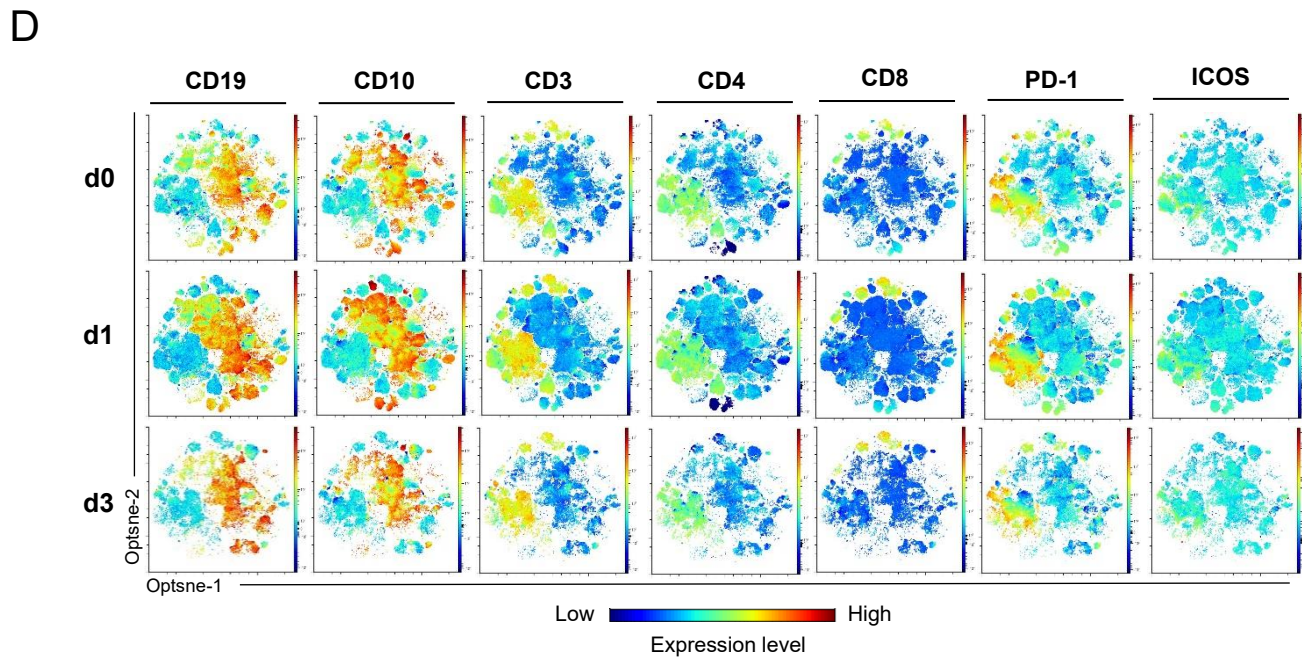
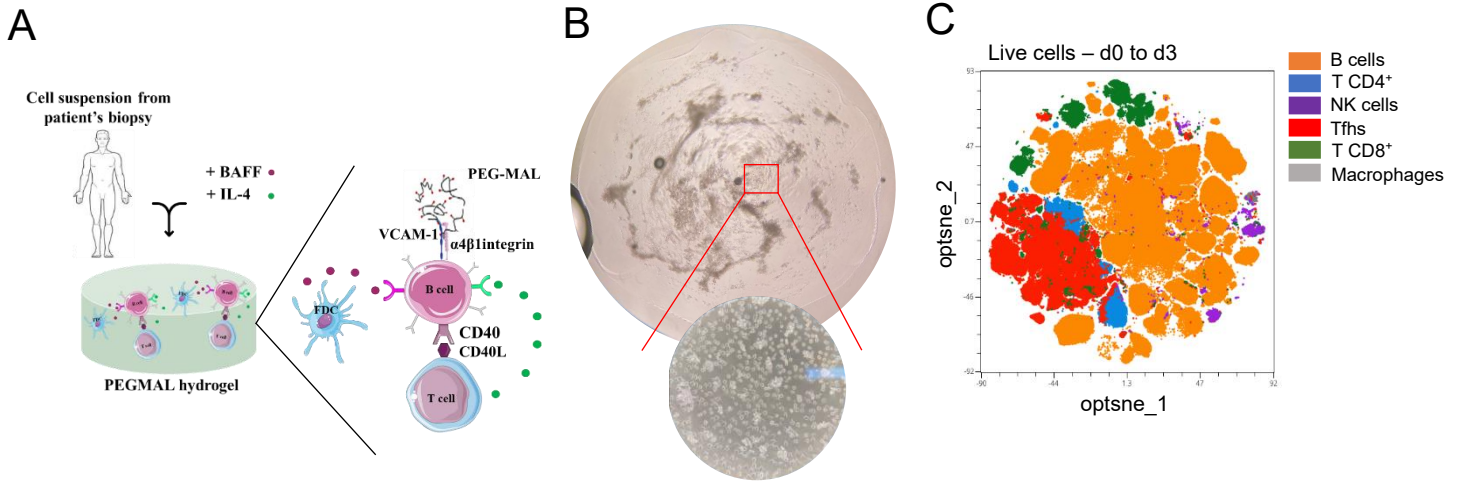


Figure 1: The 3D organoid model promotes survival of both FL cells and cells from the microenvironment.

A) Schematic representation of the 3D organoid model. **B)** Visualization of an organoid observed at day 1 under an inverted microscope at the magnification x4, then zoomed at the magnification x40. **C)** Opt-sne visualization among d0 to d3 untreated samples cultured in 3D organoids and FlowSOM distribution of clusters defined by expression of the 18 markers in all concatenated samples from d0 to d3 in the absence of RCHOP. Recolored samples were performed automatically based on expression of markers in FlowSOM clusters. **D)** Projection of selected markers in concatenated samples. **E)** Violine plots from unsupervised analysis showing the proportion of the different cell population from the concatenated samples from d0 to d3. **F)** Proportion of live FL cells after culture 1-day and 3-days within the 3D organoids or in 2D relative to d0 upon manual gating (n = 13; Mean ± SEM; *p-value = 0.0396, Wilcoxon matched-pairs signed rank test). **G)** Effect of CD40L on FL survival at d1 relative to d0 (n = 13; Mean ± SEM; *p-value = 0.0029, Wilcoxon matched-pairs signed rank test). FL biopsies were co-cultured at d0 either alone, with 40000 L-cells or CD40L-expressing L-cells in the organoid model and then survival of FL cells was assessed at d1 by spectral flow cytometry and analyzed using manual gating.

The 3D organoid model captures clinical heterogeneity of FL patients to chemoimmunotherapy

In order to assess the ability of the 3D organoid model to capture interpatient heterogeneity of the therapeutic response, we cultured primary FL cells from 17 patients treated initially with chemoimmunotherapy and anti-CD20 maintenance, including 7 poor responders with FL progression during the first 24 months (POD24) and 10 good responders with long progression free survival ([Supplementary Table 1](#)). These samples were cultured both in the 3D organoid model and in traditional 2D culture, then treated with different concentrations of R-CHOP at d0. Cell count and FL cell viability were monitored by flow cytometry after 16h of culture using the 18-color flow cytometry panel. Using supervised analyses based on traditional manual gating ([Supplementary Figure 4](#)), we were able to show that at the highest concentration of RCHOP (C2 and C3), the mean viability of FL cells was significantly reduced in good responders compared to poor responder patients in the 3D organoid culture ($p=0.0417$ for C2 and $p=0.025$ for C3) ([Figure 2A](#)). In contrast, in the 2D culture, response to RCHOP was not significantly different between good and poor responders whatever RCHOP concentrations ([Figure 2B](#)). Altogether these results indicate that in contrast to 2D culture, the 3D organoid heterogeneous response to RCHOP is correlated to clinical outcome of FL patients.

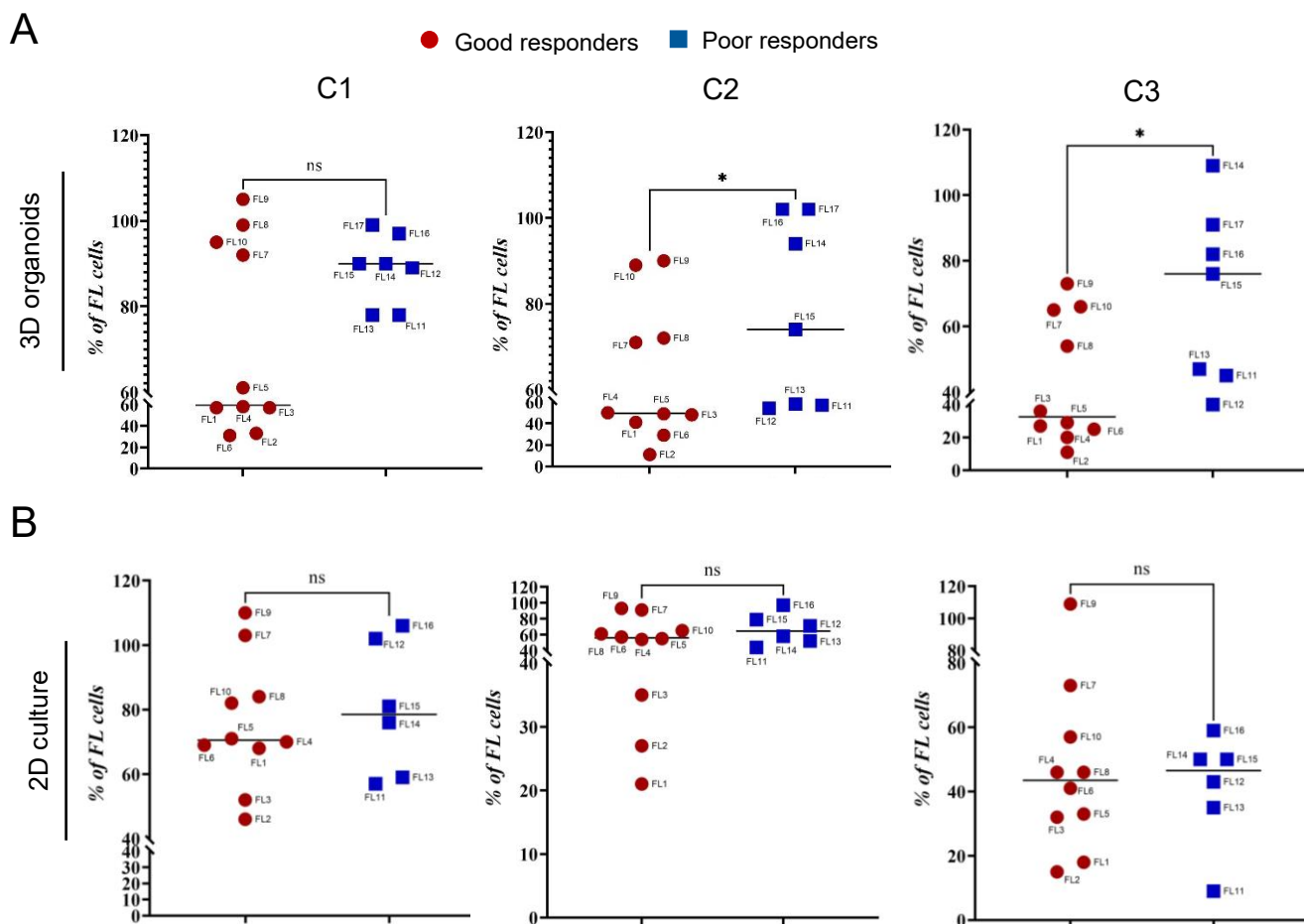


Figure 2: The 3D organoid model captures clinical heterogeneity of FL patients regarding R-CHOP chemoimmunotherapy. FL samples, clinically identified as good or poor responders according to disease progression within 24 months of initial treatment (= POD24), where cultured: **A)** within the 3D organoid or **B)** in 2D and exposed at d0 to different concentrations of R-CHOP (C1 to C3) during 16h to assess the proportion of live FL cells using spectral flow cytometry and upon manual gating (n = 10 good responders and n = 7 poor responders; C2 *p-value = 0.0417 and C3 *p-value = 0.025, Mann Whitney test).

Numbers of Tfh cells predict response to RCHOP in the patient-derived 3D organoid FL model

Interestingly, in the good responder FL cohort, response to RCHOP in the 3D organoid model was heterogeneous with 4 patients (patients 7, 8, 9 and 10) showing lower susceptibility to RCHOP compared to the other 6 patients (Figure 2A). In order to identify specific immune populations associated with this heterogeneity, we re-analyzed our 18-color flow cytometry data of the 3D organoid focusing on the T cell compartment of good responders (the 6 best responders), bad responders and the 4 patients (outliers) showing a lower susceptibility to RCHOP (Figure 3A). Using an unsupervised analysis on all concatenated patients after 16h of culture in the presence or absence of RCHOP, five main subsets of T cells were identified, as CD4⁺ T cells, CD4⁺ PD1⁺ T cells, Tfh cells (expressing CD4, PD1 and ICOS), CD8⁺ cells and exhausted CD8 T cells (expressing CD8 and PD1) (Figure 3A, B). This unsupervised analysis showed a difference in the proportion of Tfh cells between good responders and bad responders with significant lower numbers of Tfh in good responders without RCHOP treatment (C0) (Figure 3C, D). After treatment with RCHOP (C3), the number of Tfh cells decreased in all patients but remained higher in poor responders compared to the good responders (Figure 3C, D). Similarly to the bad responders, the 3 of 4 outlier FL patients showing lower susceptibility to RCHOP in the good responder cohort exhibited high numbers of Tfh cells (Figure 3C, D). These results support that in the patient-derived 3D organoid FL model, Tfh cells predict response to RCHOP.

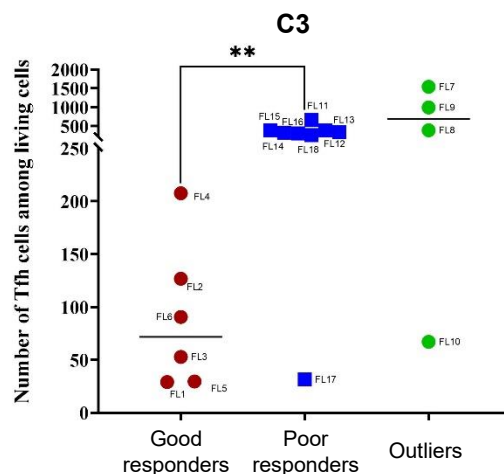
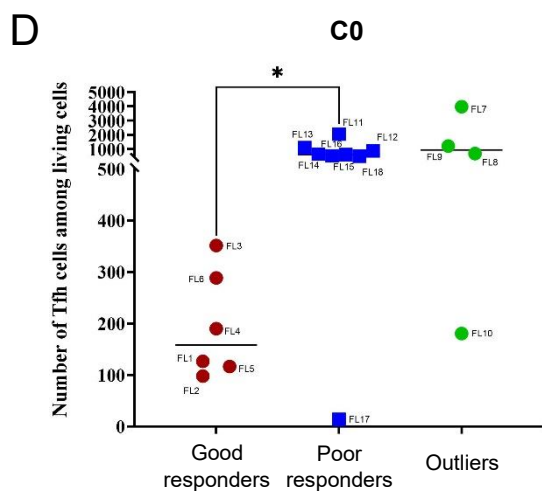
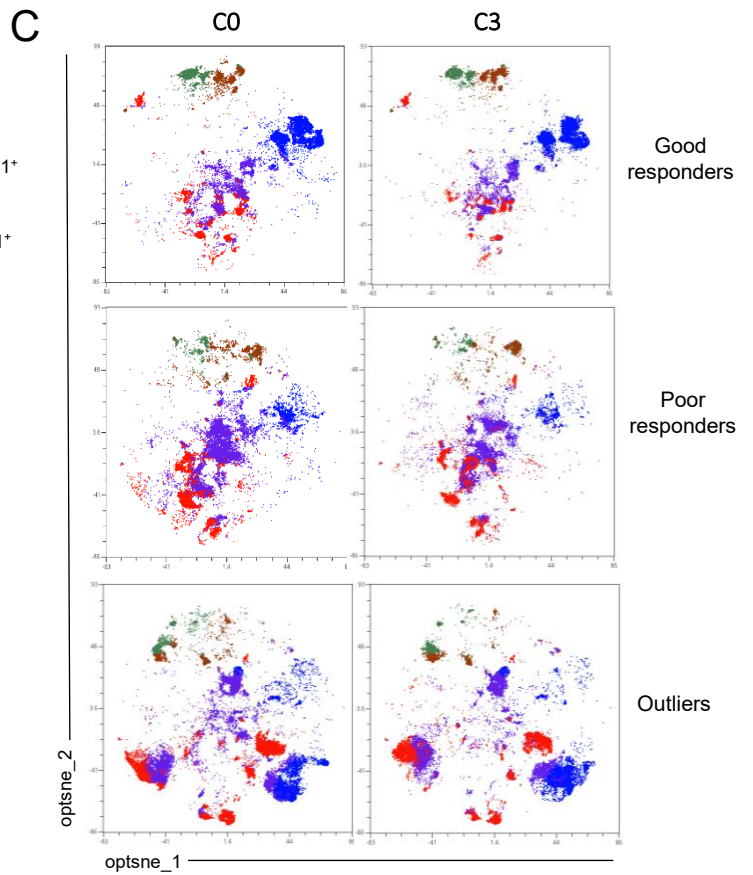
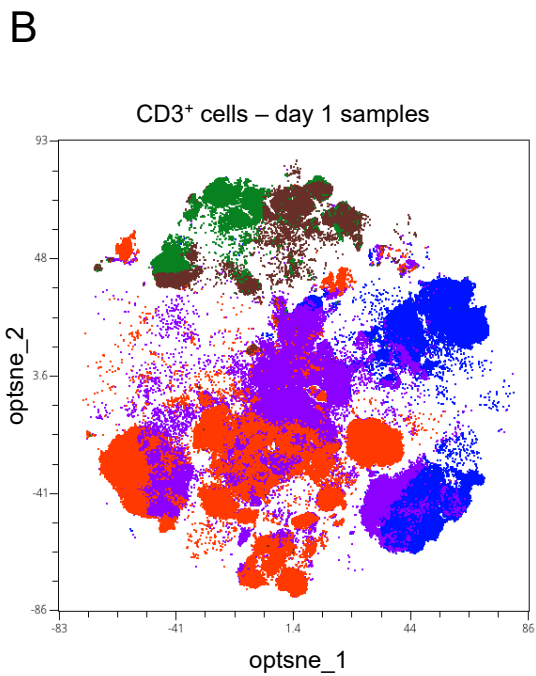
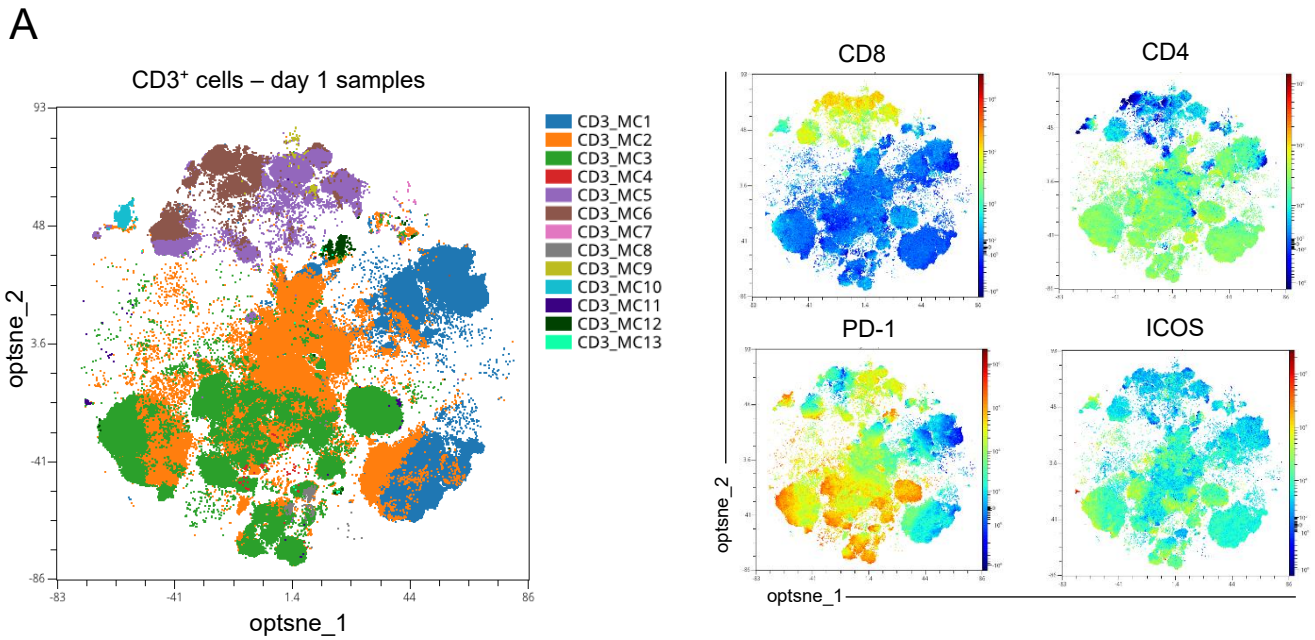


Figure 3: Tfh predict response to R-CHOP in the patient-derived 3D organoid FL model. A) Opt-sne visualization among live CD3⁺ T cells and FlowSOM distribution of clusters and projection of the markers in concatenated 3D organoid samples from d1 treated or not with RCHOP. B) Opt-sne visualization among live CD3⁺ T cells and FlowSOM distribution of clusters defined by expression of the 4 markers in concatenated samples from d1 treated or not with RCHOP. Recolored samples were performed automatically based on expression of the 4 markers in FlowSOM clusters. C) Opt-sne visualizations showing that the same FlowSOM clusters as in B but limited to some FL patients depending on their response to R-CHOP. D) Tfh numbers in 3D organoid samples at d1 in the 3 categories of patients (n = 6 good responders, n = 7 poor responders and n = 4 outliers) treated (C3) or not (C0) with RCHOP. Tfh numbers were determined using spectral flow cytometry and analyzed using manual gating (C0 *p-value = 0.02 and C3 **p-value = 0.008, Mann Whitney test).

CD40L triggers chemoresistance of good responders FL samples to RCHOP in the 3D organoid model

Interactions between Tfh and FL B cells involved several ligand/receptor interactions and CD40L/CD40 have been particularly described to prevent GC and FL B cell apoptosis^{23,24}. We thus first addressed whether signals through CD40 could protect primary FL cells from RCHOP in the 3D organoid culture in good responders. As we were limited by the cell number in some primary FL samples, we analyzed 5 of 6 good responders FL described above. Addition of CD40L-expressing L-cells in the 3D organoid culture increases viability of FL cells compared to culture in the presence of L-cells alone (Figure 4A). To ensure that this effect was directly associated to CD40 signals, we added soluble CD40L to the 3D organoid culture and observed a similar effect, although this was not significant due to the low number of samples (n=3, Figure 4B). In contrast, in poor responders FL samples, addition of CD40L-expressing L-cells to the 3D organoid culture did not significantly increase survival of FL cells (Figure 4C). Assuming that signals from CD40 in good responders FL samples increases resistance to RCHOP treatment, we wondered whether the protective effect of Tfh cells of poor responders' patients in the 3D organoid culture may be mediated through CD40L/CD40 interactions. To test this hypothesis, we tested whether an anti-CD40L blocking antibody could restore susceptibility to RCHOP treatment of poor responder FL samples in the 3D organoid culture. Again, due to cell number limitations in some primary FL samples, we analyzed only 2 poor responders patient samples and despite no significant differences, we observed a downward trend in survival of FL cells in the presence of blocking anti-CD40L antibodies compared to the isotype control culture (Figure 4D). Thus, although CD40 signaling can trigger chemoresistance of good

responder FL samples to RCHOP in the 3D organoid culture, it was probably not the only factor responsible for resistance associated to Tfh of poor responder patients to RCHOP.

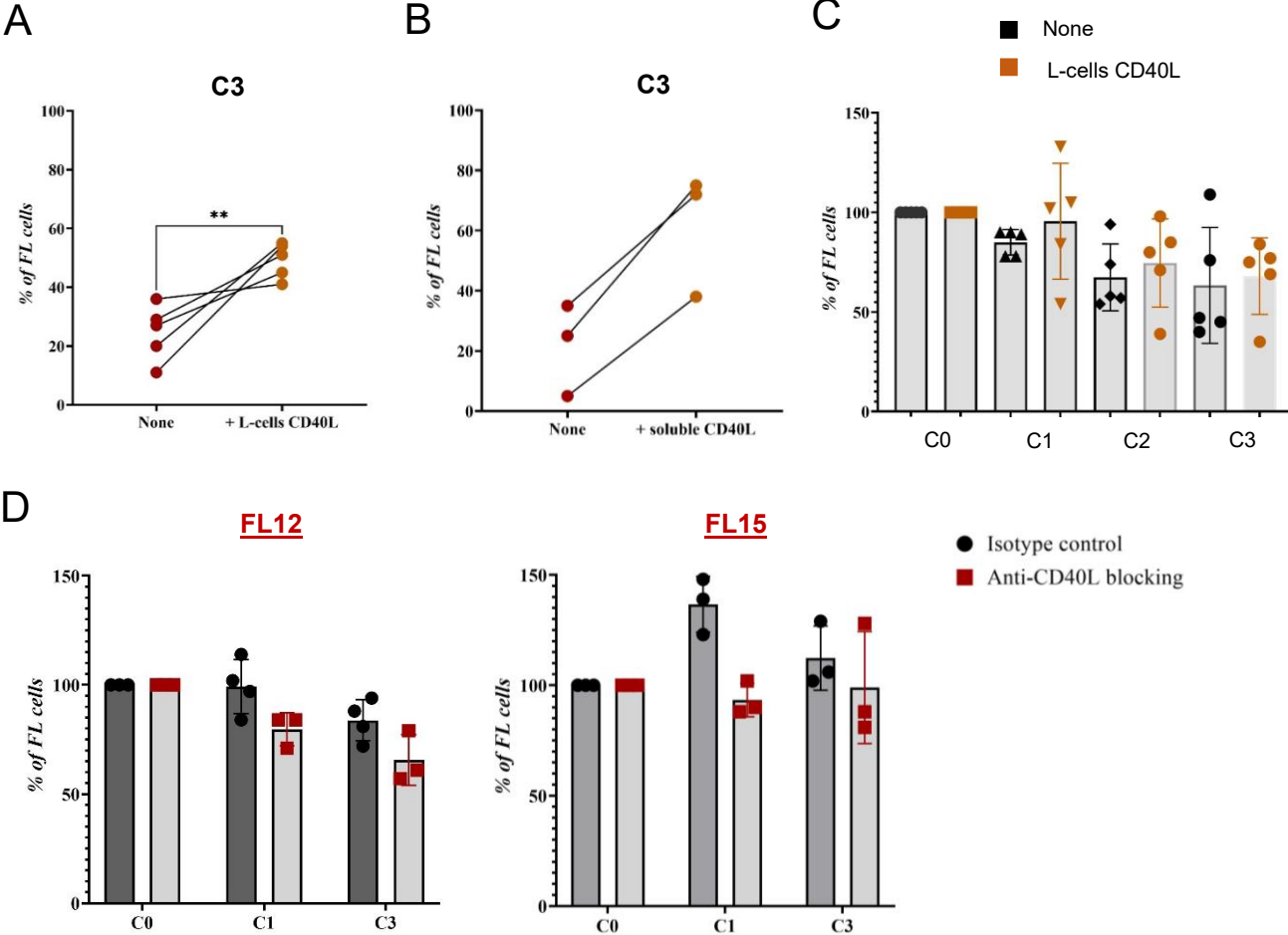


Figure 4 : CD40L triggers chemoresistance of good responders FL samples to RCHOP in the 3D organoid model. **A)** Effect of CD40L signaling delivered by L-cells on treatment response in good responders. FL samples from good responder patients were cultured at d0 either alone or with CD40L-expressing L-cells in the 3D organoid and treated with R-CHOP (C3). Proportion of live FL cells relative to day-0 was then assessed at d1 by spectral flow cytometry and analyzed using manual gating (n = 5 good responders, **p-value = 0.0079, Mann Whitney test). **B)** Effect of soluble CD40L signaling on treatment response in good responders. FL samples from good responder patients were cultured in the 3D organoid at d0 either alone or with 100 ng/mL of soluble CD40L added in the medium culture, and then treated with R-CHOP (C3). Proportion of live FL cells relative to day-0 was then assessed at d1 by spectral flow cytometry and analyzed using manual gating (n = 3 good responders). **C)** Effect of CD40L signaling delivered by L-cells on treatment response in poor responders. FL samples from poor responder patients were cultured at d0 either L cells or with CD40L-expressing L-cells in the 3D organoid and treated (C1 to C3) or not (C0) with R-CHOP. Proportion of live FL cells relative to untreated culture (C0) was then assessed at d1 by spectral flow cytometry and analyzed using manual gating (n = 5 poor responders). **D)** Effect of anti-CD40L blocking antibody on treatment response in poor responders. FL samples from poor responder patients were cultured in the 3D organoid at d0 either alone or with 5 µg/mL of anti-CD40L blocking antibody added in the medium culture, and then treated with R-CHOP immunochemotherapy in non-treated or treated conditions. Proportion of live FL cells relative to untreated culture (C0) was then assessed at d1 by spectral flow cytometry and analyzed using manual gating (n = 3 poor responders).

Discussion

All lymphoma therapeutic candidates tested in humans have preclinical activity, yet more than 90% of these agents fail during clinical development²⁵. Most of preclinical models used are based on 2D culture using mainly cell lines and more rarely primary lymphoma cells^{26–30}. To develop new therapeutic strategies that would better benefit to patients, we need new *in vitro* models recapitulating the tumor microenvironment, its spatial organization but also the genetic heterogeneity of tumor cells. This is particularly true for FL that are strongly dependent on their microenvironment but also exhibit high level of tumor heterogeneity fostering tumor growth and treatment resistance^{31–33}. Here we report the development of a patient-derived 3D organoid FL model using a previously engineered 3D tumor organoid that has been mainly used with lymphoma cell lines and more recently on xenografts established from DLBCL patients^{18,34}. The use of primary FL patient samples in the 3D organoid brings several advantages to this model: 1) In our unsupervised flow cytometry study, while cells from microenvironment did not cluster based on sample origin, but according to their immune lineage, FL B cells generated several B cell clusters displaying a strong interpatient heterogeneity (Supplementary Figure 5), probably reflecting the genetic tumor heterogeneity, as previously described using single cell

RNA-seq and mass cytometry studies^{33,35-37}; 2) Although most stromal cells, and FDC in particular, are completely lost from the primary samples, probably upon thawing or digestion, functionalization of the 3D organoid with thiolated adhesive peptide REDV, mimicking VCAM-1 that interacts with VLA4 ($\alpha 4\beta 1$ integrin) on primary FL cells and addition to soluble BAFF in the culture medium, deliver most of survival signals from FDC; 3) While in other 3D FL culture models, NK cells were added exogenously and therefore do not reflect the immunological status of the patient NK cells, in our 3D organoid culture NK cells have been maintained for 3 days^{38,39}. This is particularly important for FL for which the NK cell number in the peripheral blood predicts the clinical outcome, probably associated to the use of anti-CD20 antibodies for FL treatment and the crucial role played by NK cells triggering antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC)⁴⁰. Survival of primary FL cells in 3D culture model has not been extensively studied. Using a microfluidic method based on cell encapsulation inside permeable alginate microspheres generating 3D FL spheroids, FL survival from one patient was maintained from day 3 to day 7 in the presence of tonsil stromal cells²⁸. In our 3D organoid FL model, survival of FL cells was heterogeneous depending on FL patients but did not exceed 50% in most FL samples beyond 3 days of culture, with the exception of 2 FL samples whose cells were maintained for up to 5 days in 3D organoid culture (data not shown). In this context, we were quite surprised that addition of IL-15 or CD40L in the 3D organoid, that were previously described to increase FL survival in 2D culture, did not increase FL survival and even triggered apoptosis of FL cells in the case of CD40L²⁷. In chronic lymphocytic leukemia (CLL), CD40 stimulation sensitizes tumoral cells to apoptosis in addition to anti-CD20 mAbs such as rituximab and GA101 by a mechanism involving lysosomal cell death⁴¹⁻⁴³. Whether this mechanism is also responsible for FL cell apoptosis triggered by CD40 signaling in the 3D organoid in the absence of anti-CD20 treatment will deserve further investigation. Another possible mechanism would be associated with the immune-stimulatory effect of activating CD40 in normal B cells, dendritic cells and monocytes fostering expression of costimulatory molecules, MHC molecules and production of pro-inflammatory cytokines, contributing to enhanced helper T-cell priming and activation⁴⁴. In this goal, a clinical trial (NCT03892525) evaluating intratumoral agonistic anti-CD40 (Selicrelumab) in combination with anti-PDL1 (Atezolizumab) in patients with refractory or relapsed B cell lymphoma is currently being evaluated.

Besides the development of a new 3D organoid model using primary FL samples, one of our aims was to investigate whether this model could predict patient response to chemoimmunotherapy. Using RCHOP as a proof of concept, we observed a clear correlation

between response to RCHOP in the 3D organoid and clinical outcome, demonstrating that clinically relevant information can be derived from functional testing of FL in this 3D organoid model. However, 4 of the 18 patients did not strictly correlate to *in vivo* clinical response in the 3D organoid model. In the field of hematological malignancies, there is only one reported patient-derived 3D model using spheroids in mantle cell lymphoma that recapitulates patient response to ibrutinib³⁰. Using spectral flow cytometry and unsupervised analysis, we identified Tfh cells as the main population of FL microenvironment responsible for resistance to RCHOP. A prospective study with 52 NHL explored the clinical significance of the dynamic change in Tfh cells before and after chemotherapy⁴⁵. The authors reported the increased number of Tfh cells in NHL patients compared to healthy individuals, but also in patients with no response or progressive disease compared to patients in complete remission after the sixth treatment course, suggesting a role for Tfh cells in tumor progression and treatment resistant. In the same study, the authors also reported IL-21, a Tfh cytokine, has a main contributor of Tfh resistance in NHL. This last result is in line with our own data demonstrating that CD40L signals delivered by Tfh cells was not sufficient to trigger resistant to RCHOP of poor responders in the 3D organoid, as demonstrated by the marginal effect of blocking CD40L/CD40 interactions in poor responder patients. A clinical trial using lincatumumab, a fully human antagonistic CD40 mAb, in several B-cell NHL entities, and FL in particular, demonstrated modest activity in relapsed/refractory patients, confirming in patients our *in vitro* data obtained using the 3D organoid model⁴⁶. In conclusion, our work identified Tfh cells as a main contributor to chemoimmunotherapy resistance in FL that is probably mediated by several surface receptor/ligand such as CD40L and soluble factors such as cytokines.

References

1. Alaggio, R. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* **36**, 1720–1748 (2022).
2. Huet, S., Sujobert, P. & Salles, G. From genetics to the clinic: a translational perspective on follicular lymphoma. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 224–239 (2018).
3. Amé-Thomas, P. & Tarte, K. The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin Cancer Biol* **24**, 23–32 (2014).
4. Wang, X., Rodda, L. B., Bannard, O. & Cyster, J. G. Integrin-Mediated Interactions between B Cells and Follicular Dendritic Cells Influence Germinal Center B Cell Fitness. *The Journal of Immunology* **192**, 4601–4609 (2014).
5. Mourcin, F. *et al.* Follicular lymphoma triggers phenotypic and functional remodeling of the human lymphoid stromal cell landscape. *Immunity* **54**, 1788-1806.e7 (2021).
6. Amin, R. *et al.* DC-SIGN-expressing macrophages trigger activation of mannose-6-phosphate receptor in follicular lymphoma. *Blood* **126**, 1911–1920 (2015).
7. Linley, A. *et al.* Lectin binding to surface Ig variable regions provides a universal persistent activating signal for follicular lymphoma cells. *Blood* **126**, 1902–1910 (2015).
8. Amé-Thomas, P. *et al.* Characterization of intratumoral follicular helper T cells in follicular lymphoma: role in the survival of malignant B cells. *Leukemia* **26**, 1053–1063 (2012).
9. Pangault, C. *et al.* Follicular lymphoma cell niche: identification of a preeminent IL-4-dependent T(FH)-B cell axis. *Leukemia* **24**, 2080–2089 (2010).
10. Salles, G. How do I sequence therapy for follicular lymphoma? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2020**, 287–294 (2020).
11. Casulo, C. *et al.* Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk

- for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2516–2522 (2015).
12. Pastore, A. *et al.* Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol* **16**, 1111–1122 (2015).
 13. Huet, S. *et al.* A gene-expression profiling score for prediction of outcome in patients with follicular lymphoma: a retrospective training and validation analysis in three international cohorts. *Lancet Oncol.* **19**, 549–561 (2018).
 14. Letai, A., Bhola, P. & Welm, A. L. Functional precision oncology: Testing tumors with drugs to identify vulnerabilities and novel combinations. *Cancer Cell* **40**, 26–35 (2022).
 15. Townsend, E. C. *et al.* The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice. *Cancer Cell* **29**, 574–586 (2016).
 16. Bleijs, M., van de Wetering, M., Clevers, H. & Drost, J. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J* **38**, e101654 (2019).
 17. Sachs, N. *et al.* A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* **172**, 373–386.e10 (2018).
 18. Tian, Y. F. *et al.* Integrin-specific hydrogels as adaptable tumor organoids for malignant B and T cells. *Biomaterials* **73**, 110–119 (2015).
 19. Purwada, A. *et al.* Ex vivo synthetic immune tissues with T cell signals for differentiating antigen-specific, high affinity germinal center B cells. *Biomaterials* **198**, 27–36 (2019).
 20. Van Kooten, C. *et al.* Cross-linking of antigen receptor via Ig-beta (B29, CD79b) can induce both positive and negative signals in CD40-activated human B cells. *Clin Exp Immunol* **110**, 509–515 (1997).

21. Garrone, P. *et al.* Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med* **182**, 1265–1273 (1995).
22. Scott, D. W. & Gascoyne, R. D. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer* **14**, 517–534 (2014).
23. MacLennan, I. C. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* **12**, 117–139 (1994).
24. Ribeiro, P. *et al.* CD40 regulation of death domains containing receptors and their ligands on lymphoma B cells. *Br J Haematol* **103**, 684–689 (1998).
25. Kola, I. & Landis, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* **3**, 711–715 (2004).
26. Goval, J.-J. *et al.* The prevention of spontaneous apoptosis of follicular lymphoma B cells by a follicular dendritic cell line: involvement of caspase-3, caspase-8 and c-FLIP. *Haematologica* **93**, 1169–1177 (2008).
27. Epron, G. *et al.* Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. *Leukemia* **26**, 139–148 (2012).
28. Lamaison, C. *et al.* A novel 3D culture model recapitulates primary FL B cell features and promotes their survival. *Blood Adv* bloodadvances.2020003949 (2021) doi:10.1182/bloodadvances.2020003949.
29. Foxall, R. *et al.* Developing a 3D B Cell Lymphoma Culture System to Model Antibody Therapy. *Front Immunol* **11**, 605231 (2020).
30. Araujo-Ayala, F. *et al.* A novel patient-derived 3D model recapitulates mantle cell lymphoma lymph node signaling, immune profile and in vivo ibrutinib responses. *Leukemia* **37**, 1311–1323 (2023).
31. Okosun, J. *et al.* Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat. Genet.* **46**, 176–181 (2014).

32. Araf, S. *et al.* Genomic profiling reveals spatial intra-tumor heterogeneity in follicular lymphoma. *Leukemia* **32**, 1261–1265 (2018).
33. Haebe, S. *et al.* Single-cell analysis can define distinct evolution of tumor sites in follicular lymphoma. *Blood* **137**, 2869–2880 (2021).
34. Shah, S. B. *et al.* Combinatorial treatment rescues tumour-microenvironment-mediated attenuation of MALT1 inhibitors in B-cell lymphomas. *Nat Mater* **22**, 511–523 (2023).
35. Attaf, N. *et al.* Functional plasticity and recurrent cell states of malignant B cells in follicular lymphoma. 2022.04.06.487285 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2022.04.06.487285> (2022).
36. Wang, X. *et al.* Single-cell profiling reveals a memory B cell-like subtype of follicular lymphoma with increased transformation risk. *Nat Commun* **13**, 6772 (2022).
37. Andor, N. *et al.* Single-cell RNA-Seq of follicular lymphoma reveals malignant B-cell types and coexpression of T-cell immune checkpoints. *Blood* **133**, 1119–1129 (2019).
38. Gravelle, P. *et al.* Cell growth in aggregates determines gene expression, proliferation, survival, chemoresistance, and sensitivity to immune effectors in follicular lymphoma. *Am J Pathol* **184**, 282–295 (2014).
39. Decaup, E. *et al.* A Tridimensional Model for NK Cell-Mediated ADCC of Follicular Lymphoma. *Front Immunol* **10**, 1943 (2019).
40. Klanova, M. *et al.* Prognostic Impact of Natural Killer Cell Count in Follicular Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma Patients Treated with Immunochemotherapy. *Clin Cancer Res* **25**, 4634–4643 (2019).
41. Jak, M. *et al.* CD40 stimulation sensitizes CLL cells to lysosomal cell death induction by type II anti-CD20 mAb GA101. *Blood* **118**, 5178–5188 (2011).

42. Jak, M., van Bochove, G. G. W., van Lier, R. a. W., Eldering, E. & van Oers, M. H. J. CD40 stimulation sensitizes CLL cells to rituximab-induced cell death. *Leukemia* **25**, 968–978 (2011).
43. Delgado, R. *et al.* Co-Stimulatory versus Cell Death Aspects of Agonistic CD40 Monoclonal Antibody Selicrelumab in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers (Basel)* **13**, 3084 (2021).
44. Vonderheide, R. H. & Glennie, M. J. Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. *Clin Cancer Res* **19**, 1035–1043 (2013).
45. Zhou, D.-M. *et al.* The role of follicular T helper cells in patients with malignant lymphoid disease. *Hematology* **22**, 412–418 (2017).
46. Fanale, M. *et al.* Phase IA/II, multicentre, open-label study of the CD40 antagonistic monoclonal antibody lincatumumab in adult patients with advanced non-Hodgkin or Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* **164**, 258–265 (2014).

Acknowledgements

We thank Ankur Singh (Georgia Institute of Technology) for his help in setting up the 3D organoid model. We thank the Cevi_collection group: (<https://experts-recherche-lymphome.org/calym/explorer-les-ressources-du-consortium/collection-cevi/centres-participants-a-la-collection-cevi/>) from the CALYM Carnot Institute funded by the French National Research Council (ANR), for providing FL samples. This project was funded by grants from le Ligue Contre le Cancer (Rhône). NH was supported by a scholarship from the Ligue Nationale Contre le Cancer and by the Société Française d'Hématologie (SFH).

Supplemental Tables and Figures

Supplemental Table 1 : FL patient characteristics.

Patients	Sex/Age ^a	Sample type ^b	Stage ^c	Treatment ^d	Disease status ^e
FL1	F/77	LN	1-2	G-CHOP	RC
FL2	F/40	LN	3A	R-CHOP	RC
FL3	M/78	LN	3A	R-CVP	RC
FL4	NA/51	LN	1-2	R-CHOP	RC
FL5	M/50	LN	1-2	G-CHOP	RC
FL6	NA/53	LN	3A	R-CHOP	RC
FL7	M/60	LN	1-2	G-CHOP+ G	RC
FL8	F/72	LN	1-2	G-CVP + G	RC
FL9	M/61	LN	1-2	G-CHOP	RC
FL10	NA/73	LN	1-2	R-CHOP	RC
FL11	F/30	LN	3	CHOP	POD24
FL12	M/56	LN	1	CHOP then R alone	POD24
FL13	M/48	LN	1-2	Mini CHVP then R alone	POD24
FL14	M/48	LN	2	R-CHOP	POD24
FL15	M/52	LN	3A	R-CHOP	POD24
FL16	NA/68	LN	3A	R-CHOP	POD24
FL17	NA/77	LN	1-2	R-CHOP	POD24
FL18	NA	LN	1-2	R-CHOP	POD24

^a F: Female, M: Male

^b LN: Lymph node.

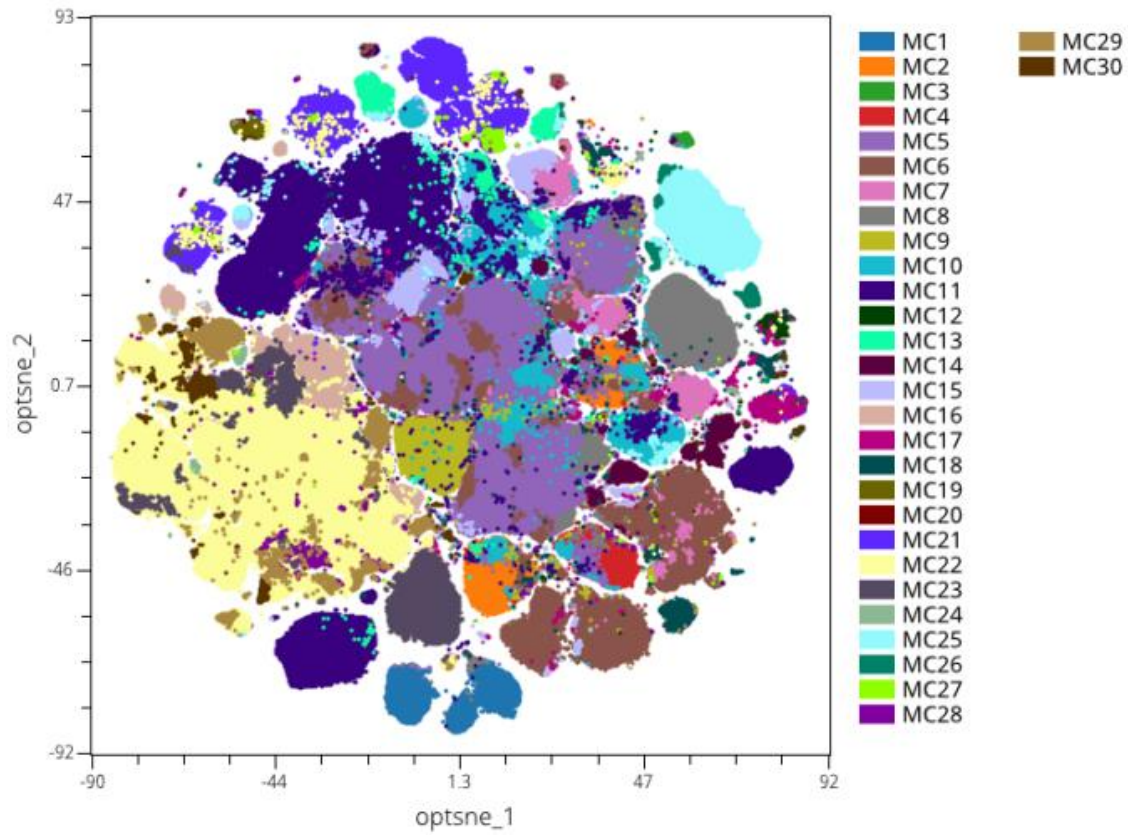
^c Grade according to WHO classification.

^d Chemoimmunotherapy – R-CHOP (Rituximab, Cyclophamide, Hydroxydramicin, Oncovin, Prednisolon), G (Obinutuzumab), CVP (Cyclophamide, Vincristine/Oncovin, Prednisolon).

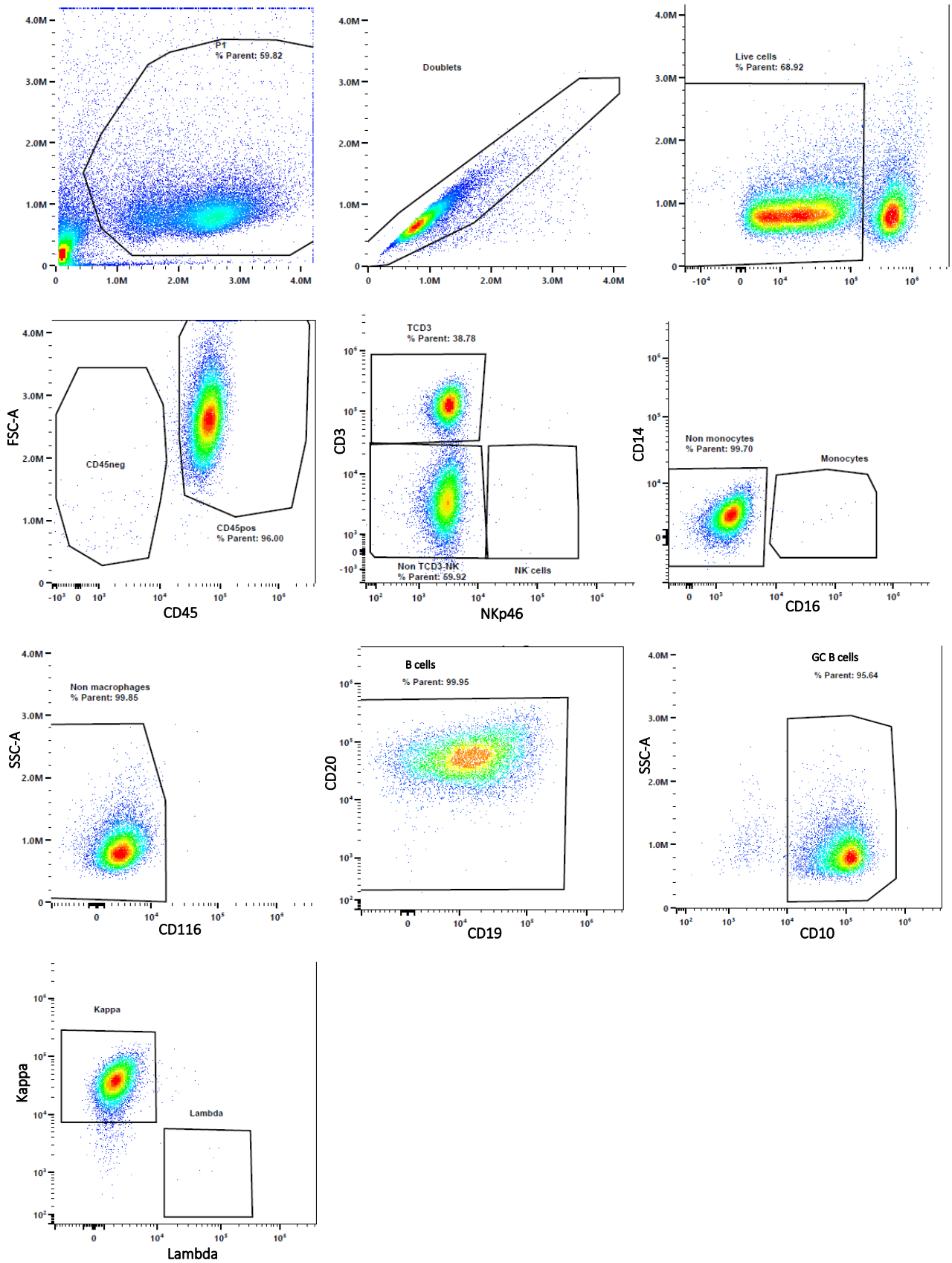
^e RC: complete response, POD24

Supplemental Table 2 : The 18-color flow cytometry panel.

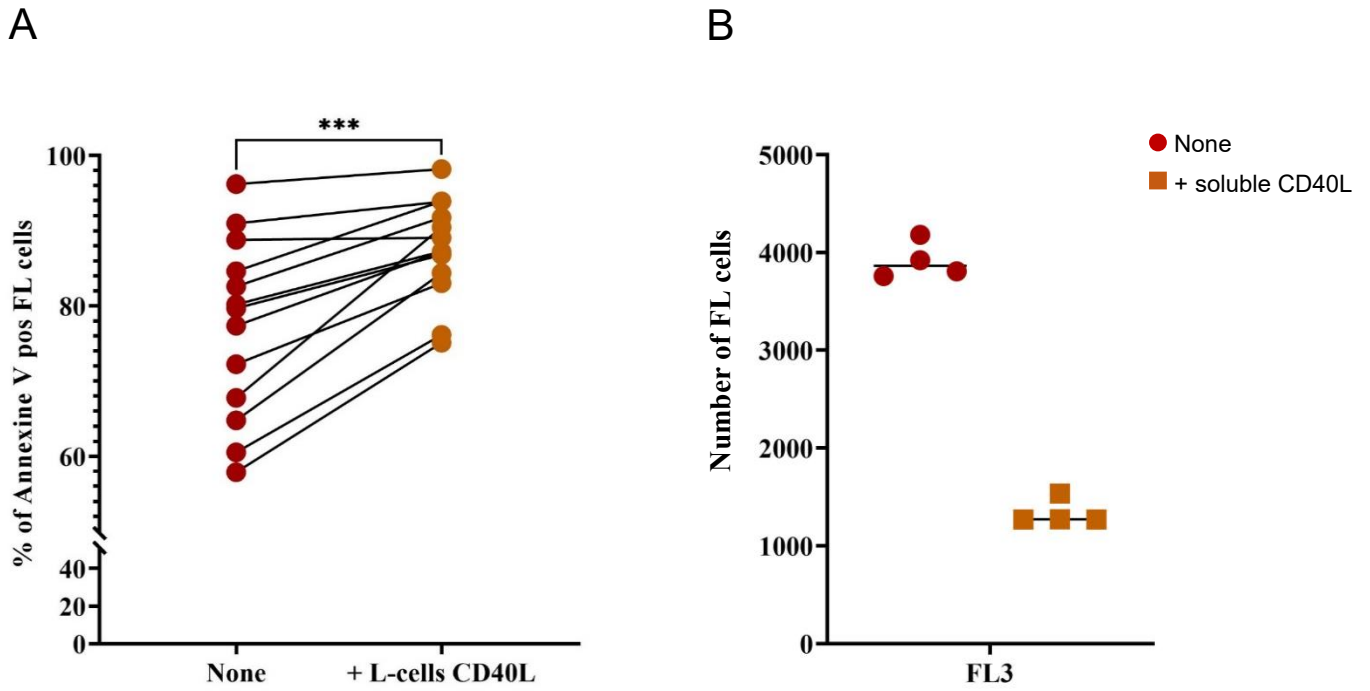
Marker	Target	Fluorochrome
CD20	B cells	BV711
CD19	B cells	VioBright515
CD10	GC B cells	PE-CF594
Kappa	Ig Kappa	APC
Lambda	Ig Lambda	BV421
CD45	Hematopoietic cells	PerCPCy5.5
CD14	Macrophages	PerCP
CD116	Macrophages	AF647
CCR5	Macrophages	BV786
CD16	Macrophages/NK	PE
NKp46	Natural Killer cells	Pacific Blue
CD3	T cells	APC-R700
CD8	T CD8 cells	APC-H7
CD4	T CD4 cells	BB700
ICOS	Tfh cells	BV510
PD-1	Tfh cells	PECy7
CD21	Follicular Dendritic cells	BV480
Annexin V	Apoptotic cells	FITC



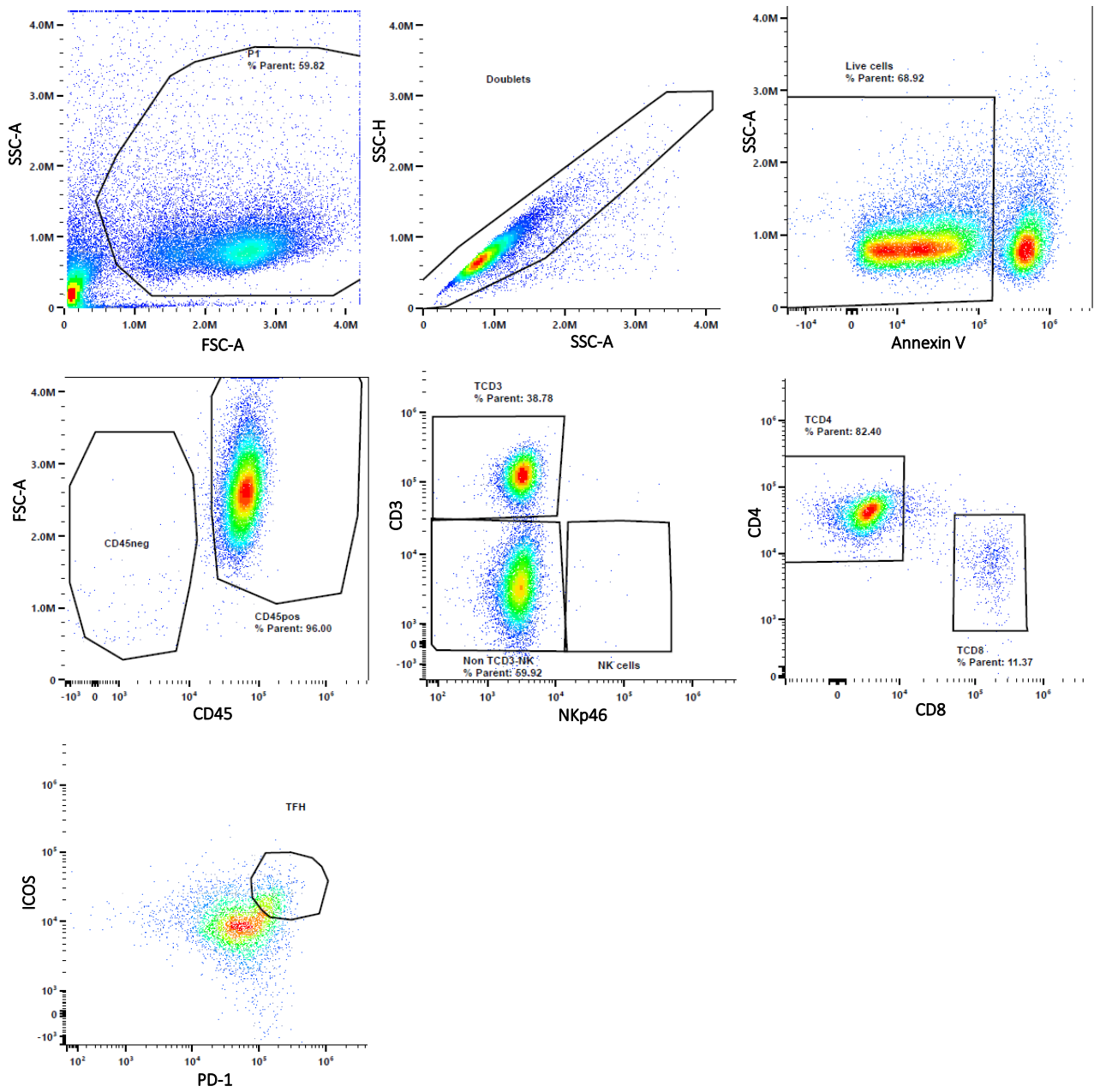
Supplemental Figure 1 : Opt-sne visualization among d0 to d3 untreated samples cultured in 3D organoids and FlowSOM distribution of clusters.



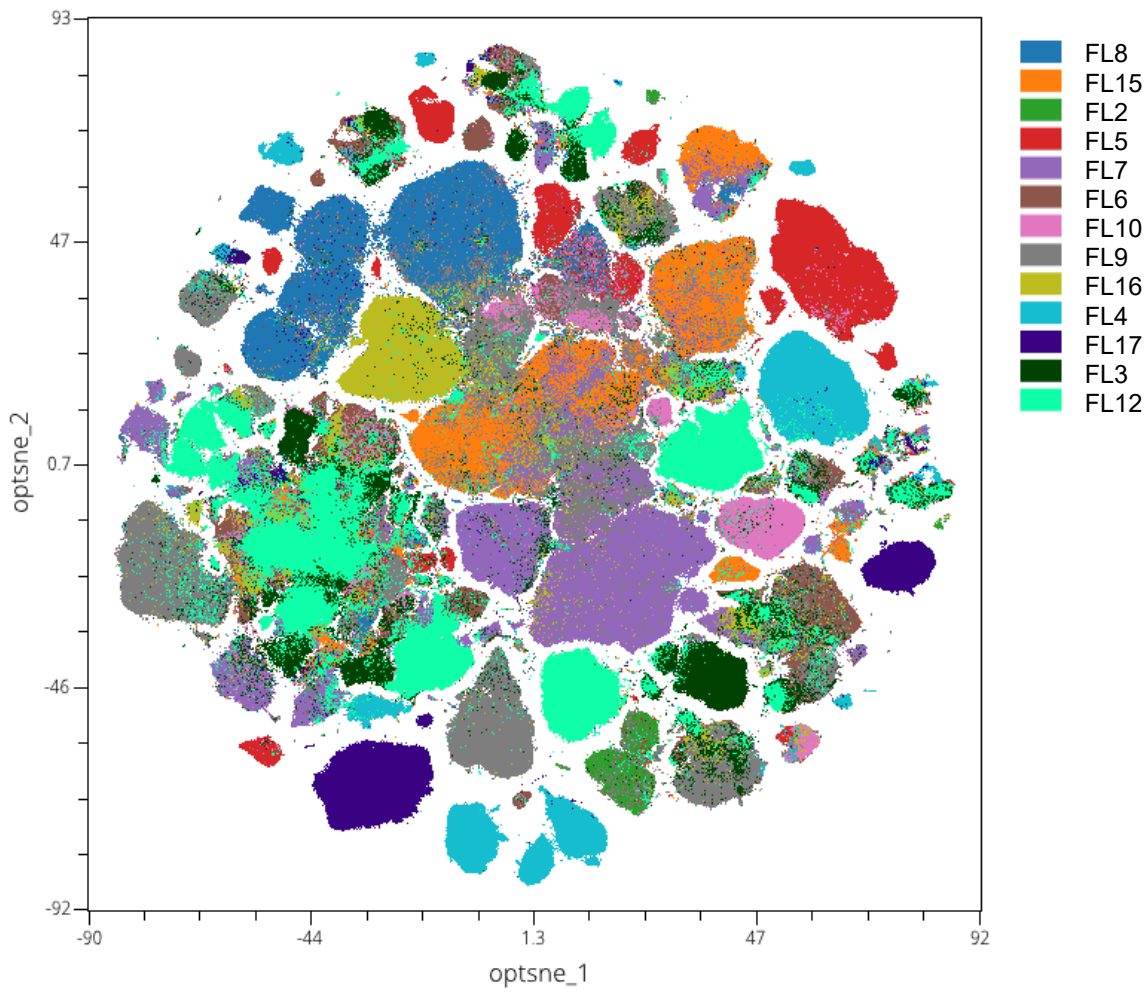
Supplemental Figure 2: Flow cytometry gating strategy allowing identification of live FL cells.



Supplemental Figure 3 : A) Effect of CD40L signaling delivered by L-cells on FL survival. FL biopsies were cultured at d0 either alone or with CD40L-expressing L-cells in the 3D organoids. Survival was then assessed at d1 measuring the Annexin V^{pos} FL cells using spectral flow cytometry and manual gating (n = 13 good responders, ***p-value = 0.0002). **B) Effect of soluble CD40L on FL survival.** FL cells of one sample were cultured at d0 either alone or with 100 ng/mL of soluble CD40L in the 3D organoids. Proportion of live FL cells relative to untreated culture (C0) was then assessed at d1 by spectral flow cytometry and analyzed using manual gating.



Supplemental Figure 4: Flow cytometry gating strategy allowing identification of live Tfh cells.



Supplementary Figure 5: Cells from microenvironment clustered based on their immune origin, whereas FL B cells clustered depending on their donor origin (to compare to Figure 1C to identify B cells vs microenvironment clusters).

ARTICLE 2

En cours de soumission

Integrative bulk and single-cell gene-expression profiling analysis informs on main sources of cellular dynamics in follicular lymphoma

B. Tesson*¹, N. Houmera*^{2,3}, E. Thomas⁴, M. Carrère⁵, A. Verney^{2,3}, M. Zala^{2,3}, S. Mareschal^{2,3}, A. Traverse-Glehen⁶, P. Sujobert^{2,3,7}, G. Salles⁸, L. Genestier^{2,3}, S. Huet^{2,3,7}.

¹ Bioinformatics Department, LYSARC, Paris, France

² CIRI - Centre International de Recherche en Infectiologie, Team Lymphoma Immunobiology, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, Lyon, France.

³ Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon-sud, Université de Lyon, Oullins, France.

⁴ Synergie Lyon Cancer, Plateforme de Bioinformatique

⁵ Centre Léon Bérard, Département de Recherche Translationnelle et d'Innovation, Génomique des Cancers, Lyon, France

⁶ Service d'Anatomie Pathologie, Hopital Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France

⁷ Laboratory of Hematology, Centre Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France.

⁸ Service d'Hématologie Clinique, Hopital Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France

* Contributed equally to this work

Corresponding author: Sarah Huet, sarah.huet@chu-lyon.fr

Abstract

Follicular lymphoma (FL) is an incurable B-cell malignancy, that has a variety of clinical behaviors. In this pathology, the tumor microenvironment (TME) plays a crucial role in both progression and resistance to anti-cancer treatments. It also plays a part in the biological heterogeneity found between patients and within the FL tumors. This heterogeneity is due partly to sub-clonal genomic diversity, but also to extrinsic factors stemming from the tumor microenvironment, which is specific to each tumor. However, tumor heterogeneity remains poorly characterized in FL and represents a major obstacle to accurate prognosis and prediction of response to precision therapies. In the present study, we aimed at revealing the key cell subtypes and tumor molecular features that determine the intra-tumor and inter-patient heterogeneity. For that purpose, we integrated bulk transcriptomic signatures, obtained from previous data which enabled discovery of major biological processes acting in FL cells and in the TME and highlighted their respective impact on patient outcome, to single-cell transcriptomic data. This combined data allowed us to identify some relevant features that drive FL intra- and inter-tumor heterogeneity. Among them, we identified transcriptomic signatures associated with the tumor microenvironment, signatures recapitulating inter-tumor heterogeneity in FL, including specific genetic profiles associated with copy number alterations (del6q, del10q, +X), as well as signature associated with intra-tumoral heterogeneity as the ICA13 transcriptomic signature associated with shorter progression-free survival.

Introduction

Follicular lymphoma (FL), an incurable B-cell malignancy, has a variety of clinical behaviors. Multiple relapses after treatment occur at varying intervals and a subset of patients suffer early cancer-related mortality¹. Numerous studies have provided evidence of the prognostic impact of infiltrating immune subsets from the tumor microenvironment (TME)². More recently, growing evidence has shown the direct role of FL cells' molecular features in the risk of disease progression^{3,4}. However, studies examining the mutational pattern of FL tumors from multiple sites and at different disease time-points highlighted a divergent evolution of FL subclones and a much higher intra-tumor heterogeneity than previously thought⁵⁻⁷. Consequently, disease progression likely occurs as a result of evolution of pre-existing but potentially undetectable clones, or emergence of new clones that have managed to evade or subvert the host immune response⁸. Thus, although several determinants of FL tumorigenesis and progression have been identified, tumor heterogeneity remains poorly characterized in FL and represents a major obstacle to accurate prognosis and prediction of response to precision therapies.

Next-generation studies of large cohorts of FL patients provided a detailed mutational landscape of this malignancy⁹⁻¹¹. However, mutational patterns do not allow the identification of which subclones will eventually expand at relapse. Moreover, even if specific mutations in well-known genes (e.g. *EZH2*, *CREBBP*, *TNFRSF14*) have functional consequences on the cellular interactions between tumor and surrounding immune cells¹²⁻¹⁴, mutational pattern reflect the TME contribution to the tumor dynamics only in an incomplete and indirect manner. Gene-expression microarrays have first highlighted the major role of TME in FL¹⁵. Later, deconvolution-based algorithms have been developed to infer the cellular composition from bulk analyses^{16,17} but do not provide a precise view of the potential heterogeneity between tumor subclones at the transcriptomic level. Currently, single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) technologies represent a powerful way to analyze thousands of cells and derive significant insights into a tumor's cellular heterogeneity. However, this technology is currently impractical on large sample cohorts due to the requirement of a large sample number and high cost. Finally, the consistency between single-cell and bulk-derived information has never been assessed.

In the present study, we hypothesized that the integration of the bulk transcriptomic profiles together with single-cell transcriptomic sequencing would reveal the key cell subtypes and tumor molecular features that determine the intra-tumor and inter-patient heterogeneity. We first performed gene-expression and copy-number profiling in a large cohort of 148 FL samples

from the PRIMA clinical trial, which enabled discovery of major biological processes acting in FL cells and in the TME and highlighted their respective impact on patient outcome. Then, we investigated these transcriptomic signatures in single-cell suspensions from FL biopsies to accurately distinguish differences among coexisting tumor subclones. This combined bulk and single-cell analysis highlighted variable but also recurrent phenotypes among patients, shedding light on relevant features that drive FL intra- and inter-tumor heterogeneity.

Methods

Patients and samples

Fresh-frozen tissue tumor biopsies and bulk gene-expression data. Fresh-frozen tissue (FFT) tumor biopsies were prospectively obtained from 148 untreated patients participating in the phase III randomized PRIMA trial, in high-tumor-burden FL patients¹⁸. Gene-expression profiling was performed using the Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 array (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) as previously described³ (data available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE93261>).

Single-cell suspensions. Biopsy samples from 6 FL patients, obtained at diagnosis, were provided by the Centre de Ressources Biologiques of the Hospices Civils de Lyon and cryopreserved as frozen cell suspensions in 10% fetal calf serum (FCS) and dimethylsulfoxide (DMSO) in liquid nitrogen.

All tissue samples consisted of pretreatment diagnostic biopsies and were confirmed as FL grade 1-3a by expert hematopathologists. Written informed consent for the use of their samples in research protocol was obtained from the patients in accordance with the Declaration of Helsinki.

SNP-arrays

Copy-number abnormalities (CNA) were assessed on DNA samples of patients from the PRIMA cohort (n=144/148) using the high-resolution Cytoscan HD single-nucleotide polymorphism array (Affymetrix, Santa Clara, CA USA). Detection of absolute segmental copy numbers and genotype status was performed using the GAP algorithm¹⁹.

Unsupervised analysis of bulk gene-expression data

Unsupervised clustering. Gene clustering was performed on expression data from Affymetrix microarrays by means of an Independent Component Analysis^{20–22} (ICA) using the fastICA algorithm from R package. ICA identifies expression signatures (“components”) capturing major underlying sources of variation. For each component, the most influential genes (“leading genes”) were retrieved.

Gene set enrichment analysis. To infer potential biologic relevance of ICA components, we compared their leading genes with the Molecular Signature Database (MSigDB) v5.0 and LLMPP databases of precompiled gene sets^{23,24}. Significant overlaps between components and gene sets were evaluated using one-sided Fisher Test and multiple-testing correction to account for the number of gene sets within each collection²⁵.

Integration with copy-number values. Correlation was computed between copy number at every possible genome location and ICA component score. Significant correlations were evaluated by permutation test and by taking the first percentile as threshold for each individual component.

Details regarding unsupervised clustering and enrichment analyses are provided in the Supplementary Appendix.

Single cell preparation, RNA-library construction and sequencing

Frozen cell suspensions were thawed at 37°C in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) plus 10% FCS, washed with phosphate buffer saline (PBS) and then resuspended in flow-cytometry buffer (5% FCS and 2 mM EDTA in PBS) at a concentration of 20x10⁶ cells per mL for staining. Cells were first incubated with Human Fc Block (BD Biosciences) for 10 minutes on ice. After a wash with flow-cytometry buffer, cells were incubated with Annexin V PE (BD Biosciences) for 10 minutes, in order to collect only living cells. Cells were resuspended in 1X Annexin V binding buffer (0.1 M HEPES, 1.4 M NaCl and 25 mM CaCl₂ in distilled water) at 1x10⁷ per mL. The cell sorting procedure was done using a FACS Aria III cytometer (Becton, Dickinson and Company).

The scRNA-seq libraries were prepared according to the manufacturer’s instructions (Chromium Next GEM Single Cell 5' Reagent Kits v2 (Dual Index)). The sorted live cells were centrifugated and then resuspended with Master Mix Reagents before being loaded into the

Chromium Controller (10X Genomics, Pleasanton, California). After this step, the reverse transcription was followed by PCR to amplify the cDNA, with the following program: 45 seconds at 98°C, followed by 13 cycles of 20 seconds at 98°C, 30 seconds at 63°C and 1 minute at 72°C, and a final elongation step for 1 minute at 72°C. The amplification of 50 ng of cDNA allowed the generation of 5' Gene Expression library with primers and sample indexes included in the kit. The V(D)J library was amplified with two PCR of 6 and 8 cycles with primers recommended by 10X Genomics (for heavy and light chains respectively) using 2 µL of the cDNA obtained post-amplification. The final BCR library was construct using Nextera XT reagents (Illumina San Diego, California), including the i5 forward and Nextera i7 reverse primers used to amplified the 800 pg of the sequences obtained during previous steps. The two libraries were then quantified using Qubit Fluorometers (ThermoFisher Scientific), whose values were then validated by qPCR and Bioanalyzer 2100 (Agilent). Gene expression and V(D)J libraries were pooled in a 1:1 ratio and paired-end (2x150pb) sequenced (375M reads) on a HiseqX platform (Macrogen Seoul, South Korea).

Single-cell data demultiplexing, quality controls and normalization

BCL files were converted to FASTQ using CellRanger mkfastq (R1 : 26 base pairs, R2 : 150 base pairs). Raw FASTQ from gene expression libraries were aligned on the GRCh38 human genome and processed using CellRanger Count (10x Genomics Cell Ranger 4.0.0). Cells were then demultiplexed using the Seurat HTODemux function. Before quality controls, filtering and normalization, an object of class Seurat was created using CreateSeuratObject. Quality controls were used to filter out cells that have more than 5% mitochondrial reads, associated with dying cells, cells that have less than 750 features with at least one read or more than 10⁴ features with at least one read and cells that have less than 10% RNA from ribosomal genes, which are good housekeeping controls. The resulting filtered UMI count matrices were log-normalized using Seurat SCTransform(), which replaces NormalizeData(), ScaleData() and FindVariableFeatures().

Dimensionality reduction, clustering and metadata creation

PCA is ran on the samples using RunPCA (npcs=5) and UMAP clustering is performed based on the 30 first principal components. Cell phenotype was first investigated using simple markers as CD3, CD8, CD4, MS4A1 and CD79A and then confirmed using SingleR package with the BluePrintEncodeData database (The ENCODE Project Consortium, 2012, Martens JHA and

Stunnenberg HG, 2013). Using a list of predefined genes, we generated a heatmap of our data to identify specific groups of B and T cells but also different types of TME cells (DC, macrophages, NK...). Tumor cell assignment was done with CellRanger VDJ (10x Genomics Cell Ranger 4.0.0) using FASTQ files from the VDJ library and the GRCh38 reference genome. BCR contigs contained in 'filtered_contig_annotations.csv' have been first investigated to obtain immunoglobulin light and heavy chains for each cell. Initially, only the productive chains are kept, both the heavy and light chains (with the highest number of UMIs). We then checked that the tumour chain (i.e., gene V and gene J) was found in the cell for both heavy and light chains, with a number of UMI $>$ or $=$ 5. Cell cycle analysis was performed using the list of genes provided by Seurat cc.genes.updated.2019, allowing the identification of cells in G1, G2M or S phase, and with the Seurat function CellCycleScoring. Specific clusters of proliferative cells were identified according to the expression of genes related to S and G2M phases of the cell cycle. The establishment of a score in these clusters allows the comparison with the non-proliferative ones.

Single-cell data integration

The sample-specific objects were loaded individually and aggregated as a list after subsetting to cells of interest, tumor cells on the one hand and microenvironment cells on the other. Standard LogNormalization was first applied to each sample separately. If required, SCTransform() was also applied and used for integration and subsequent PCA, UMAP and clustering. Integration was performed using SelectIntegrationFeatures, FindIntegrationAnchors and IntegrateData. The resulting integrated object was normalized, scaled and embedded in two dimensions with RunUMAP.

Doublets

As scRNA-seq is often accompanied by doublet rate problems that disturb the analysis, a check for doublets was performed. Doublets can be of mixed cell types, displaying both B and T cells phenotype, and tend to have more nFeatures, or can be of same cell types which is very difficult to identify. One solution would be the use of a strict nFeatures threshold, however in some samples, proliferation can also be responsible of more nFeatures. The strategy to overcome this issue was to i) look at cluster homogeneity in terms of cell type, ii) look whether there is a significant difference in nFeatures between the different cell types in the cluster, iii) use the database BlueprintEncodeData to determine individual cell type scores and check what score

of the majority celltype the cells harbour, iv) finally, check that the corresponding doublet cluster isn't a proliferating cluster, and if it's a proliferating one, only exclude cells if they really have features of B and non B cell types.

Results

Independent component analysis informs on main sources of transcriptomic heterogeneity in FL samples

An independent component analysis was performed on gene-expression data generated in bulk samples. After discarding those potentially associated with experimental batches, we identified 19 signatures (“components”). A functional enrichment analysis revealed putative biological processes or cellular subsets associated with each component (Figure 1, Supplemental Tables S1 and S2): six components reflected the contribution of different cellular microenvironment subsets, whereas thirteen components mainly reflected lymphoma B-cell features. Among microenvironment-related signatures, ICA8, ICA9 and ICA16 were significantly enriched for genes expressed by stromal cells, whereas ICA5, ICA7 and ICA18 were related to the immune cell subsets, identified as monocytes/macrophages, T follicular helper (TFH) cells and other T-cells, respectively. Some of these signatures were associated with a longer progression-free survival (Supplemental Figure 1).

The component ICA4 highlighted proliferative cell state, as it was strongly enriched in genes implicated in cell cycle control and DNA repair, and encompassed several genes with *E2F* binding motifs. On the contrary, genes negatively contributing to the signature were mostly implicated in apoptosis and DNA damage response. One of the leading genes of this component was *EZH2* that has a major role in the maintenance of chromatin repressive marks in GC proliferating cells^{26,27}. ICA10 signature was enriched for genes being differentially expressed between GCB- and ABC-DLBCL subtypes, a high score being associated to the GCB subtype and to a good outcome ($p=.024$). On the contrary, the component ICA13 was highly associated with a bad outcome, since PFS was significantly shorter in patients with a high ICA13 score ($p<0.001$). The ICA23 signature highlighted the activation of the NF-KB pathway via TNF stimulation and enrichment for CREB-target genes.

Only few gene enrichments were found for signatures ICA12, ICA24 ICA20 and ICA17, except positional enrichments in the C1 MSigDB database, suggesting that specific chromosomal imbalances drove these components (namey del6q, del10q, 12q gain and X gain, for ICA12, ICA24 ICA20 and ICA17, respectively). We sought to confirm that these signatures actually reflected true chromosomal imbalances by directly assessing CNA. SNP-arrays were performed for 144/148 samples of the cohort. A significant correlation was found between chromosome status and ICA score in each case (the ICA score being higher in cases with gain and lower in cases with deletion) (Supplemental Figure 2).

The 10q deletion was identified in 20% of patients in our cohort, encompassing region 10q23.1 to 10q25.1 (Supplemental Figure 3). Low ICA24 scores reflected 10q loss (ie, higher ICA24 scores were found in non-deleted patients) and its leading genes included *LCOR*, but neither *PTEN* nor *PIK3API*, which also represent interesting targets of 10q loss²⁸ and are located in the deleted region. The 6q deletion, the 12 gain and the X gain were present in 12.3% (7.7-27.6% depending of the regions), 14.3% (8.3-19.9%) and 12.1% (6.9-23.7%) of the patients, respectively. Contrary to del10q that was localized to a particular region, the 6q deletion encompassed the whole 6q arm, and the 12 gain and the X gain encompassed the totality of these chromosomes. Leading genes of the chromosomal imbalance-related ICA include genes located on the chromosome actually targeted by gain or deletion (eg, *BTK* on chromosome X and *LCOR* on chromosome 10 were among leading genes of ICA17 and ICA24, respectively), but also on other chromosomes. ICA24 had 45/80 (56%) genes that were located outside chromosome 10, 46/72 (64%) genes of ICA12 were outside chromosome 6q, 31/102 (30%) outside chromosome 12 for ICA20 and 32/235 (14%) outside chromosome X for ICA17. A possible explanation is that the over- or under-expression of a group of genes (linked to their CNA) affects a complex interactome, both at the intra- and inter-cell level. As an example, ICA17 contained *CD96*, a gene located on chromosome 3 and encoding a surface protein involved in adhesive interactions of activated T and NK cells²⁹. Unsupervised analysis identified no signature specific of the other chromosomal abnormalities commonly found in FL and detected at high frequencies within our cohort (such as +1q, +6p, +7, +17q, +18, or -1p). One can hypothesize that their global effect on transcriptomic profile is either subtle or too complex to be captured by this sort of unsupervised analysis on bulk samples.

A few patients with distinct expression profiles were responsible for the remaining components, which they drove through strong “outlier” signature scores: for example, one patient, with aberrant copy-number profile and subsequent high copy-numbers of some chromosomal

segments (until 8 copies for chromosome 8q), almost solely explained ICA22, which was enriched with specific chromosomal abnormalities gene expression patterns.

Collectively, these data reflect major biological processes acting in FL cells and in the tumour microenvironment and highlighted their respective impact on patient outcome. Thus, an unsupervised analysis on bulk samples is able to identify biologically relevant expression signatures and captures sources of intra- and/or inter-sample heterogeneity.

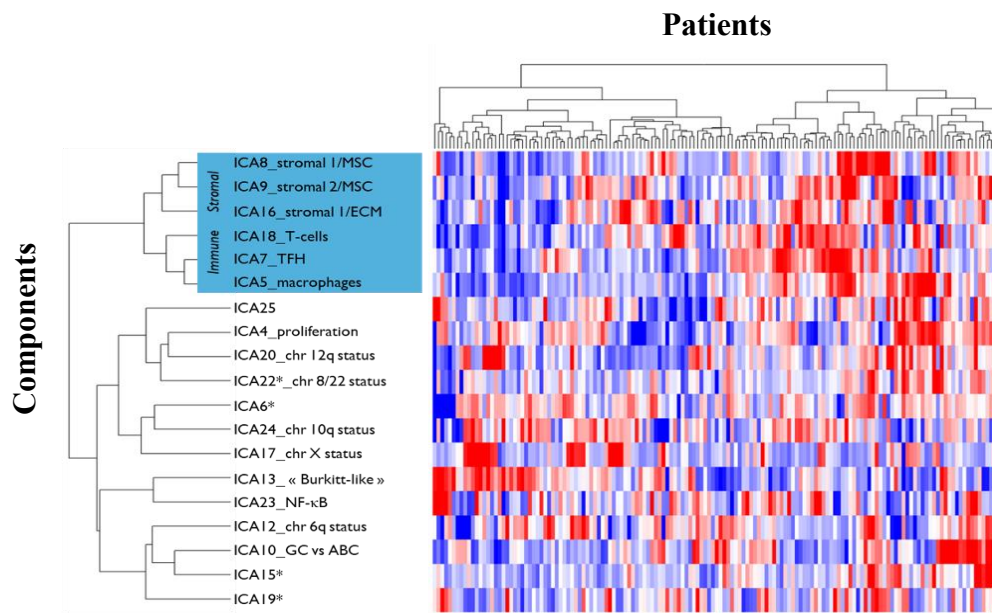


Figure 1: Independent component analysis reveals the main sources of transcriptomic heterogeneity in FL samples. Gene expression data from bulk FL samples allowed the identification of 19 signatures associated with different microenvironment components. In a sample (column), each component (row) is represented by the weighted expression of its leading genes. Gene enrichment analysis highlighted the putative biological processes or cellular subsets associated with each component. They reflect microenvironment features (components highlighted in blue) and characteristics of the tumor cells. *ICA mainly driven by outlier samples (not further investigated). *ECM: extra-cellular matrix, MSC: mesenchymal stromal cells, TFH: T follicular-helper cells, GC: Germinal Center, ABC: Activated B Cells.*

Global single-cell analysis readily segregates normal and malignant B-cell populations

Analysis of bulk samples does not inform on potential intra-tumor heterogeneity. As FL is known to evolve as multiple independent subclones, we next ask whether the transcriptomic signatures that we identified on bulk samples reflect a common feature of all FL cells within a same biopsy. We then performed high-throughput droplet-based 10x 5' scRNA-seq on all live cells from cell suspensions in six patients (including three patients from the cohort of bulk samples), allowing parallel analysis of transcriptome and BCR repertoire. We analysed a median number of 8,144 cells per sample (range 2,759-14,908) after exclusion of cells that did not pass quality control.

Global mapping of all samples in uniform manifold approximation and projection (UMAP) space³⁰ revealed that immune cells (T cells, NK cells, non-malignant B cells) and malignant FL B cells occupied distinct regions of phenotypic space ([Figure 2](#) and [supplemental Figure 4](#)). Immune cells did not cluster based on sample origin, but according to their immune lineage. Proliferating cells (tumor and immune cells) clustered together, reflecting the dominance of the proliferation-associated transcripts over lineage- or tumor-specific ones. On the contrary, malignant FL B cells displayed a strong inter-patient heterogeneity.

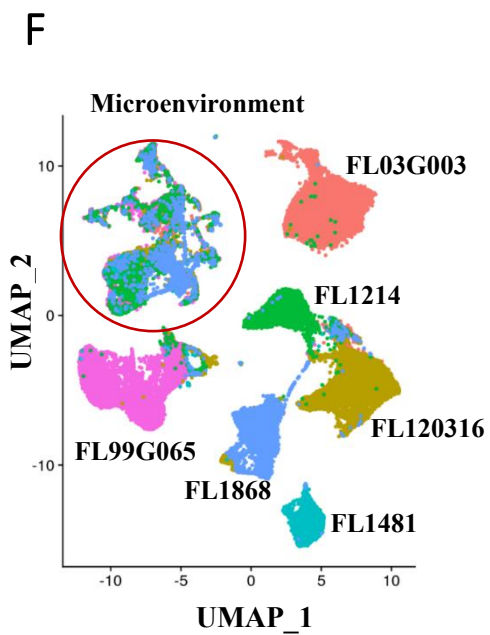
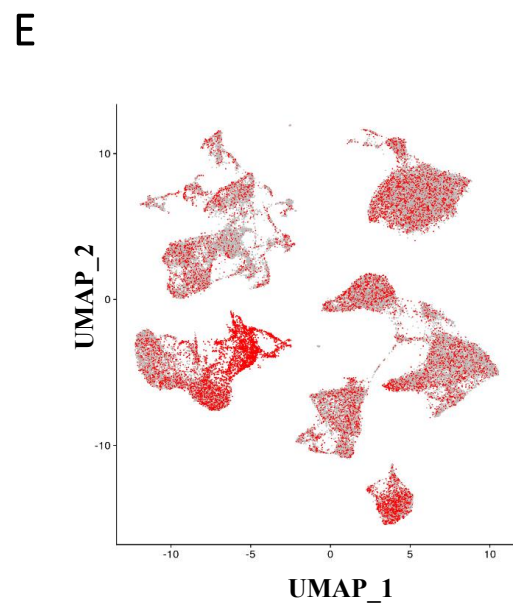
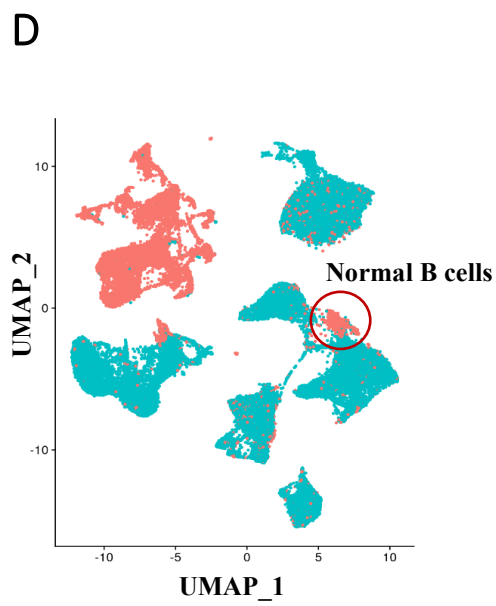
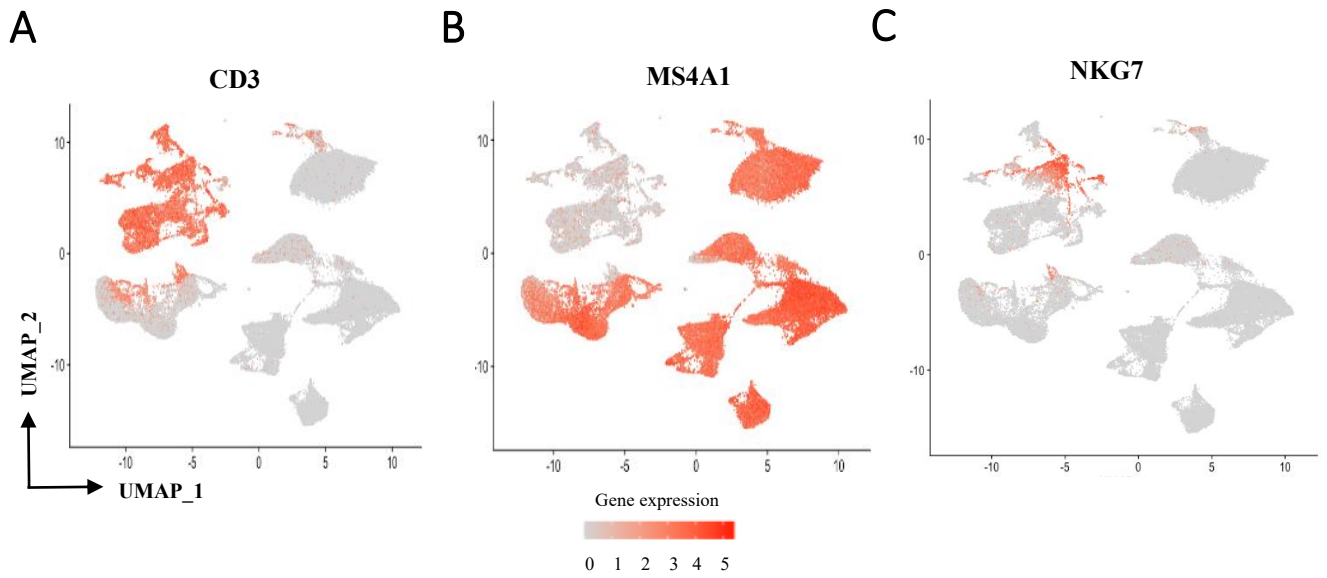
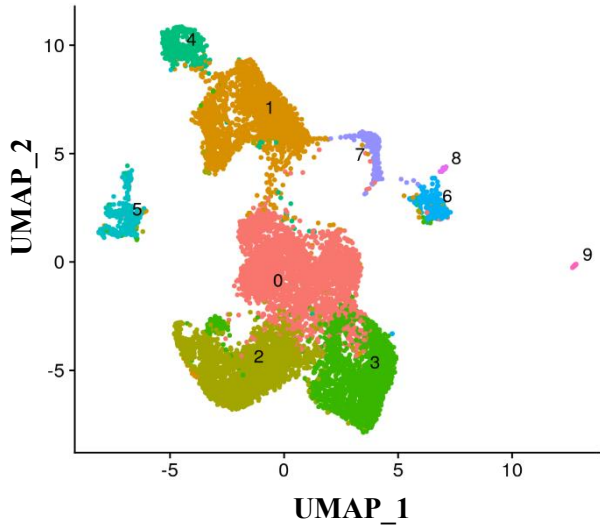
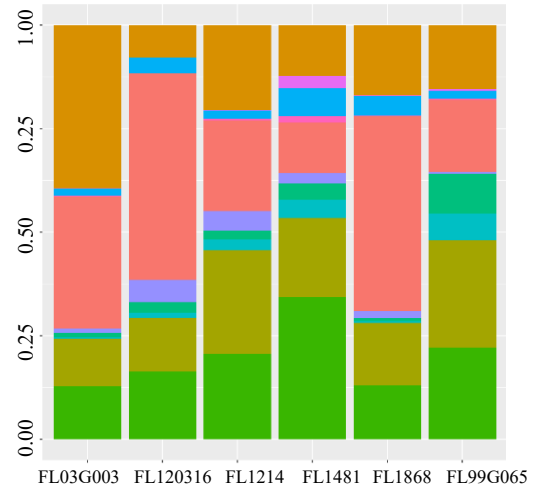
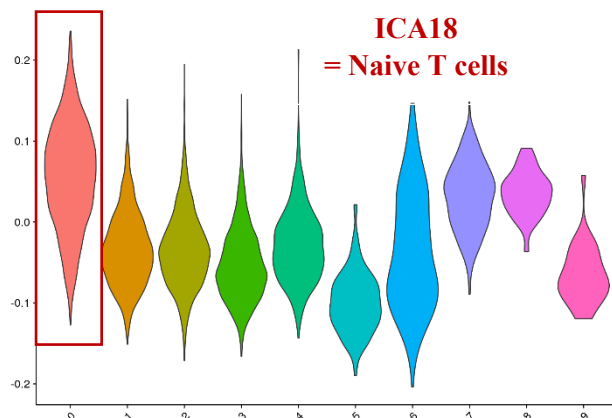
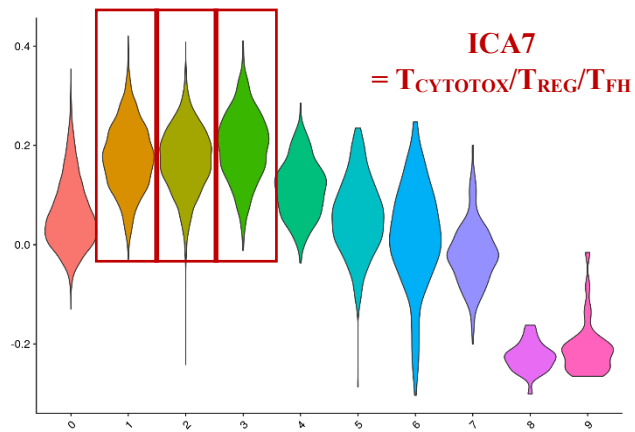
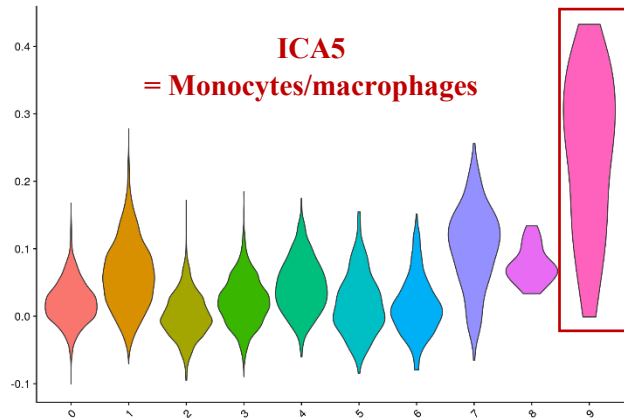


Figure 2: Single-cell analysis permits the segregation of immune and malignant B-cell populations. UMAP embedding of all cells from the 6 patients without integration. Cells are colored by expression of various marker genes: *CD3* reflecting T cells (A), *MS4A1* reflecting B cells (B), *NKG7* reflecting NK cells (C), by tumoral/non tumoral status (D), cycling cells (E) or based on donor origin (F). This projection shows a strong inter-patient heterogeneity of tumor B cells, unlike microenvironment cells that cluster together independently of donor origin.

Orthogonal validation of TME-related signatures by single-cell RNA sequencing

Non-supervised clustering of integrated immune non-B cells from the 6 patients defined 10 distinct clusters that were assigned to the different immune lineages (Figure 3A and supplemental Figure 5). The tumor microenvironment (TME) composition was dominated by clusters of naïve T cells, cytotoxic CD8⁺ T cells (T_{cytotox}), T follicular helper (T_{FH}) and T regulatory (T_{REG}). We first focused on signatures identified as “TME-related” in the bulk analysis. ICA5, ICA7 and ICA18 were expressed by specific clusters of non-tumor cells, identified respectively as monocytes/macrophages (ICA5), T_{cytotox}, T_{REG} and T_{FH} (ICA7) and naïve T cells (ICA18) (Figure 3B). As expected, immune subsets expressing these signatures were present in all patients, at varying frequencies (Figure 3C). The three stromal-related TME components (ICA8, ICA9 and ICA16) were not detected in single-cell populations. This finding is consistent with those signatures being expressed by stromal cells, as these rare subtypes are usually lost upon freezing and thawing of cell suspensions. Thus, signatures identified on bulk cell populations are relevant to highlight common features shared across tumor samples.

A**C****B**

- 0. Naïve T cells
- 1. CD8⁺ T cells
- 2. TFHs
- 3. Tregs
- 4. Other cytotoxic
- 5. Proliferating
- 6. Doublets with B cells
- 7. NK
- 8. DC
- 9. Macrophages

Figure 3: Single-cell RNA sequencing allowed the validation of independent component analysis signatures related to TME. A) Unsupervised clustering of microenvironment cells, by integrating all samples cells, revealed 10 distinct clusters in the UMAP projection. B) Violin-plots representation of the TME-related signatures identified in the bulk analysis. Some signatures were expressed by specific clusters in the single-cell analysis especially those related to monocytes/macrophages, T_{CYTOTOX}, T_{REG}, T_{FH}, but also naive T cells. C) A bar graph shows the composition of non-malignant immune cell populations within FL, with the majority of cells belonging to the T-cell lineages.

Chromosomal imbalances-related signatures highlight inter-patient transcriptomic heterogeneity

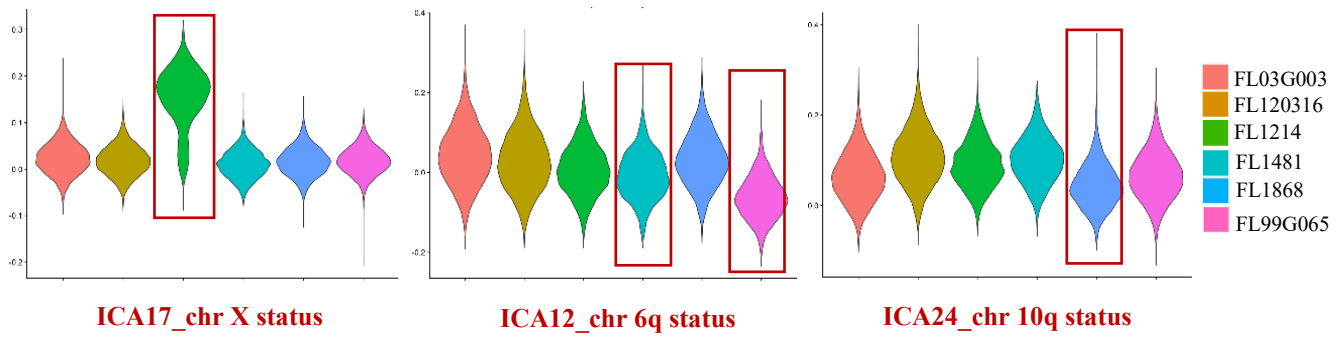
The signatures related to +X (ICA17), del6q (ICA12) or del10q (ICA24) chromosomal imbalances were upregulated (ICA17) or downregulated (ICA12, ICA24) in the total B cell population of patients showing the corresponding chromosomal alteration compared to the other patients (Figure 4A-B, Supplemental Table 3). We next analysed separately the tumor cells from patients with a given CNA and compared their signature scores to normal B cells and tumor cells from patients with no CNA. Tumor B cells from the patient with X gain (FL1214) expressed ICA17 at higher levels than FL cells from other patients with no CNA on X chromosome, but also at higher level than normal B cells. Conversely, tumor B cells from patients with a deleted chromosome arm (del6q for FL1481 and FL99G065, del10q for FL1868) expressed ICA12 and ICA24 at lower levels than tumor B cells from patients with no CNA on 6 and 10 chromosomes, respectively (Figure 4C). This confirms that these signatures reflect a deviation in the transcriptomic pattern of FL cells that acquired a specific chromosomal imbalance. Of note, FL cells with no del6q expressed the corresponding ICA12 at a higher level than normal B cells, which suggests that a specific pathway, highlighted by this geneset, is activated in tumor cells compared to normal B cells. Tumor cells with 6q deletion downregulated this pathway compared to non-del6q FL cells, thus going back to the “basal” state of GC B cells. We could not assess the same pattern for the signature related to +12 (ICA20), as none of the patients investigated by single-cell analysis had this abnormality. However, the ICA20 score level was higher in clusters of proliferating cells (Supplemental Figure 6).

We next investigated whether these signatures reflect a common feature shared by all FL cells within a same biopsy, or they are differentially expressed between tumor subclones. In patient FL1214 harbouring a +X imbalance, ICA17 was homogeneously expressed by all FL cells

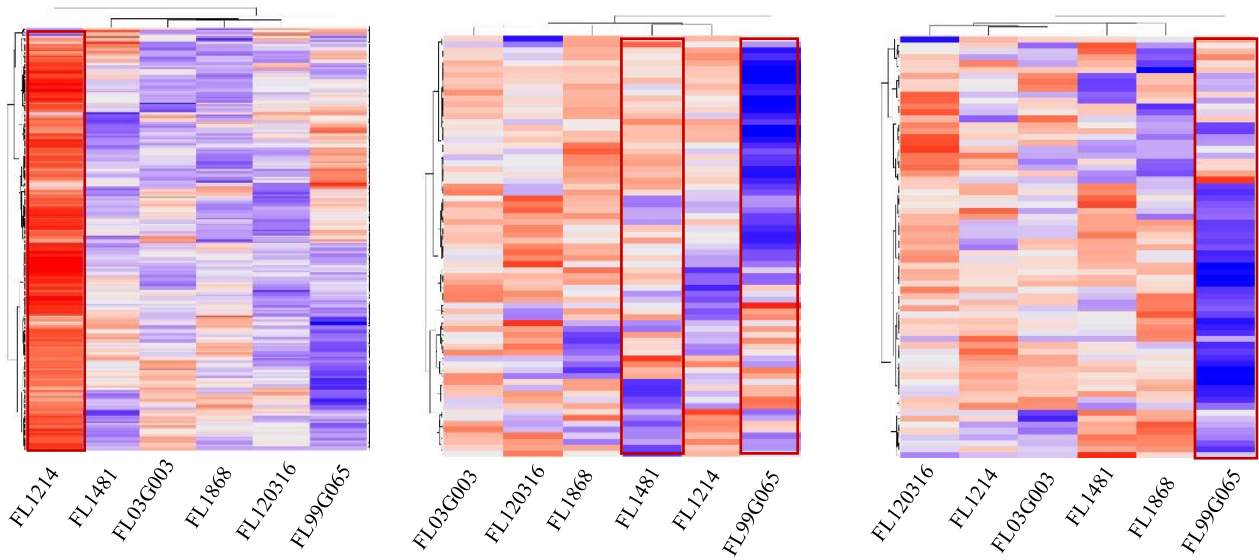
except one cluster representing 3.8% of all FL cells (cluster 6) (Figure 5A-B). One interpretation of this cluster is that it represents a precursor of the dominant malignant clone before the X chromosome was gained. On the contrary, ICA24 was homogeneously detected as under-expressed (compared to normal B cells) in all tumor cells of the patient FL1868 harbouring the del10q (Figure 5C-D). In this patient, one can hypothesize that del10q was an early clonal event, shared by all tumor cells. Therefore, signatures related to +X, del10q chromosomal imbalances were dominant in FL cells of specific patients, showing a relative intra-tumor homogeneity but a high inter-patient heterogeneity.

In case of ICA12, this signature was detected at a lower level in normal B cells compared to FL cells in all patients with no del6q, whereas it was expressed at similar levels between tumor and normal B cell clusters in the patient with del6q (Supplemental Figure 7). This confirms our hypothesis of a “normalized” ICA12 transcriptomic pattern in del6q-bearing FL cells.

A



B



C

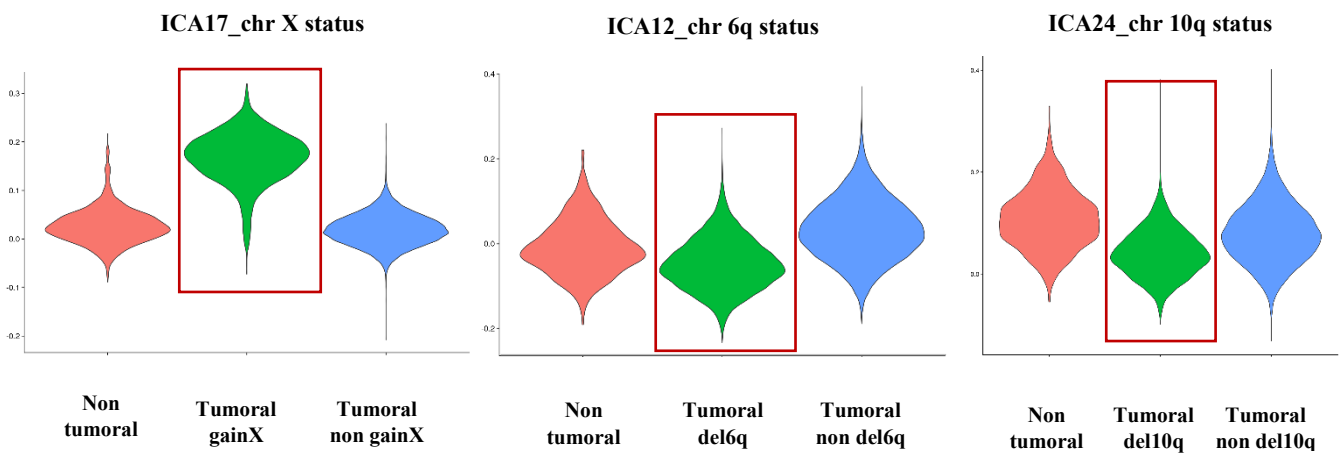


Figure 4: Signatures related to chromosomal imbalances revealed transcriptomic heterogeneity between patients. Violin plot (A) and heatmap (B) representation of patients-dependent chromosomal alterations identified in the integrated B cell population. Specific signatures were highlighted: a gain in the chromosome X for patient FL1214, 6q deletion for patient FL1481 and patient FL99G065, and 10q deletion for patient FL1868. C) Violin plot of CNA-driven signatures showing a differential expression between tumor B-cells from CNA-bearing patients, tumor B cells from patients with no CAN and non-malignant B cells.

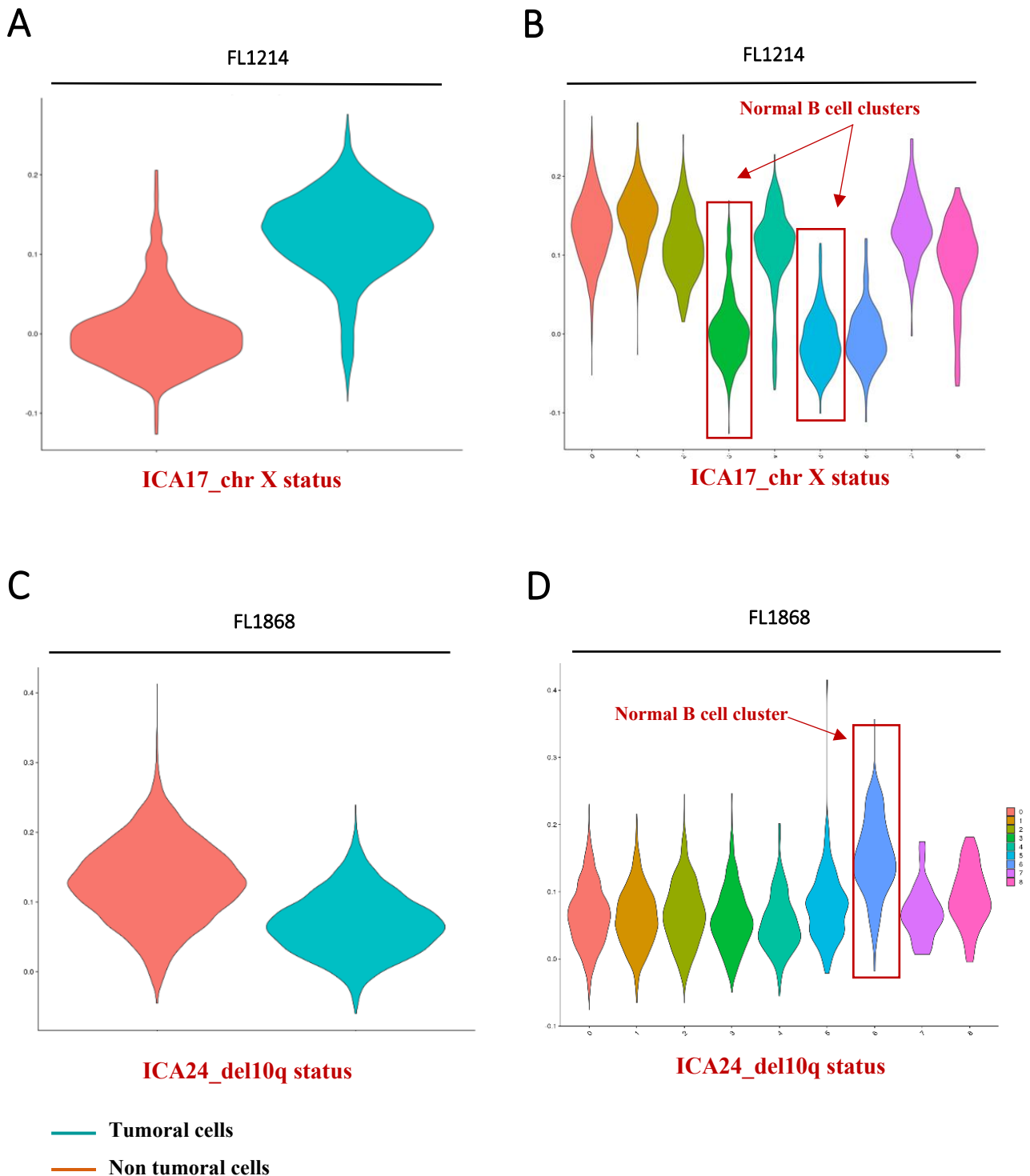


Figure 5: Signatures related to +X and del10q chromosomal imbalances revealed an intra and inter-patient heterogeneity. Violin-plots representing **A-B**) the expression of ICA17 signature, related to +X imbalance, in normal B cells and tumor cells (**A**) and in the different B-cell clusters (**B**) of the FL1214 patient and **C-D**) the expression of ICA24 signature, related to del6q status, in normal B cells and tumor cells (**C**) and in the different B-cell clusters (**D**) of FL1868 patient.

Specific B-cell-related signatures reveal a transcriptomic heterogeneity at multiple levels

We investigated whether other signatures showed a similar profile of intra-sample homogeneity and inter-patient heterogeneity. ICA10, representing a “GCB vs ABC” profile, was slightly detected in all B cells of all patients, as expected since this signature is composed of GCB genes. However, it was clearly enriched in two patients FL1481 and FL1868, showing an inter-patient heterogeneity profile (Figure 6). Of the three patients with both bulk and single-cell gene expression data, the ICA10 score assessed on the single cell population ranged the samples in the expected order according to the bulk analysis, thus validating the relevance of using single-cell data to analyze signatures assessed on bulk samples. No clear difference was observed between clusters of FL cells from a same biopsy, suggesting that all tumor cells express this signature (data not shown).

Unsupervised analysis also identified a proliferation-related signature (ICA4). At the single-cell level, a cluster of highly proliferating cells, overexpressing ICA4 signature, was observed both within B cells and non-B cells (Figure 7). These proliferating, ICA4-expressing clusters were present in all patients at varying frequencies (range 0.3%-13.9%) (Supplemental Figure 8). This highlights an intra-patient transcriptomic heterogeneity at the cellular level. Although these clusters contained a small proportion of cells (2.8% of all TME non-B cells, 3.4% of all B-cells), proliferation imprints a specific expression program that can be detected even in bulk analysis. Therefore, subclones with a strong cellular identity might be detected even if they represent a very minor proportion of cells.

We then asked whether the ICA13 signature, that was associated with a shorter PFS on bulk analysis, would reveal an intra-tumor and/or inter-patient heterogeneity pattern. Clusters of tumor cells specifically expressed ICA13 but neither non-B cells (Supplemental Figure 9) nor non-malignant B cell clusters did (Figure 8). These ICA13-positive FL clusters were dominant in some samples (eg FL99G065) or very minor in others (eg FL1868). Thus, ICA13 signature revealed mainly an intra-tumor heterogeneity pattern, highlighting a recurrent cell state shared

between FL tumors at variable levels by specific clusters of cells. The previously published 23-gene score significantly correlated with the ICA13 on bulk analysis (Pearson correlation, $p=0.00015$); it was upregulated in the same clusters of single cells as ICA13 ([Supplemental Figure 10](#)). Together, adverse prognostic signatures likely result from a tumor subclone that represent a variable proportion of all FL cells at the tumor level.

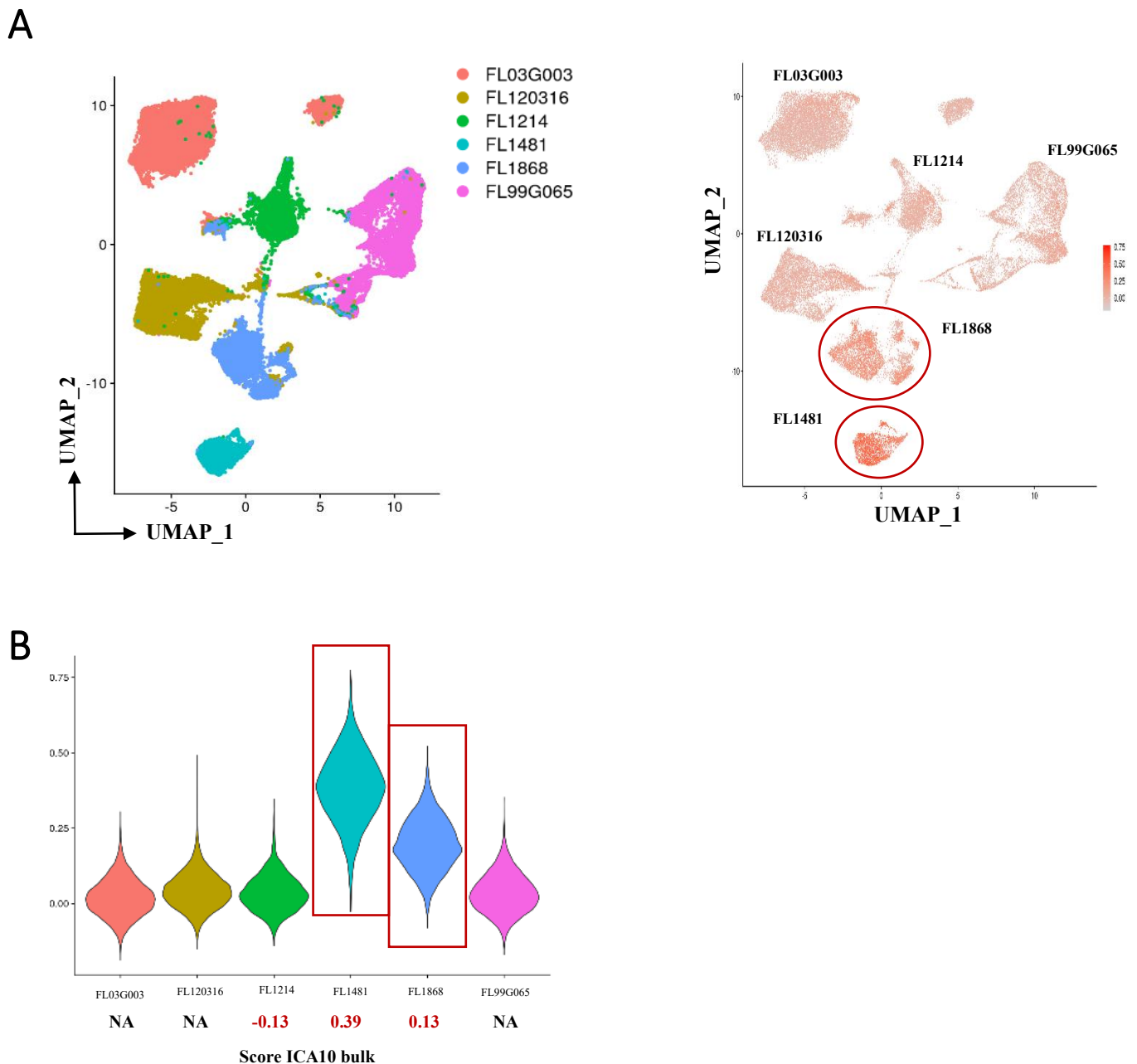


Figure 6: Specific B-cell-related signatures revealed a transcriptomic heterogeneity at multiple levels. A) Expression of the ICA10 signature, representative of the GCB vs ABC profile, in all B cells of all patients (without data integration) with a gene expression threshold overlaid on the UMAP projection. The ICA10 signature is

slightly detected in all samples but enriched in FL1868 and FL1481. **B)** Violin-plots illustrating the ICA10 signature score, with single-cell RNA seq ICA10 score correlating with the bulk analysis.

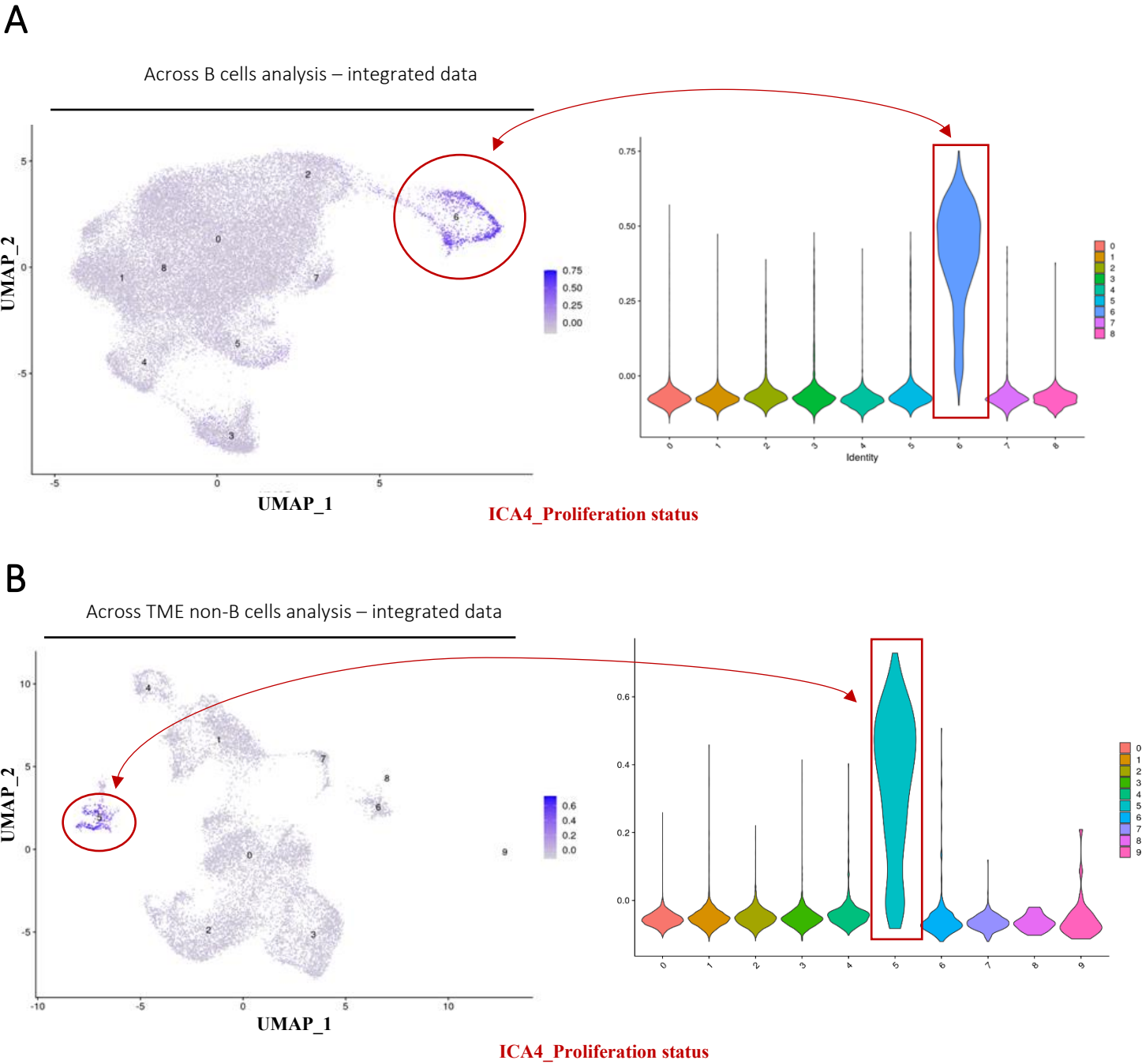


Figure 7: A proliferation-related signature reveal specific clusters in both FL cells and TME. UMAP projection of ICA4 expression, the proliferation related signature, assessed **A)** in analysis of all B cells integrated and **B)** in analysis of all TME non-B cells integrated.

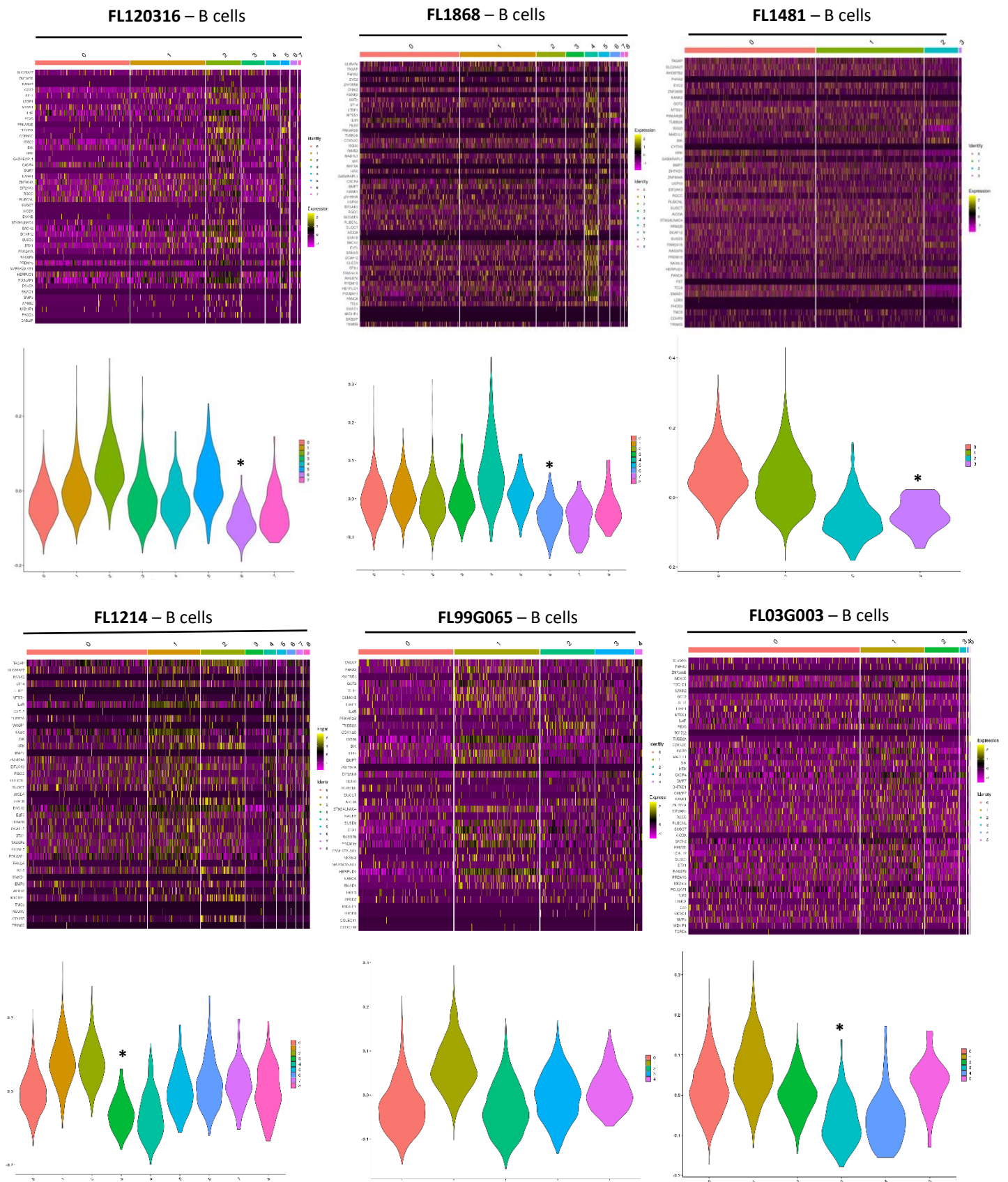


Figure 8: Progression-free survival signature ICA13 revealed an intra-tumor heterogeneity pattern. Heatmaps of the ICA13 signature, in B-cell analysis revealed specific clusters with high expression of ICA13 in specific clusters for each patient. *Asterisk: clusters of normal B cells.*

Discussion

We investigated the biological processes acting in FL tumours at diagnosis using an independent component analysis that captures genes with biologically meaningful co-variation to distinguish features exerting independent influences on expression. The identification of signature components successfully recapitulated known aspects of FL biology, such as infiltration by T cells, macrophages and stromal cells, proliferation or NF-KB activation. This unsupervised analysis was also able to recover specific gene patterns related to chromosomal imbalances in FL patients. Several chromosomal abnormalities are commonly found in FL and detected at high frequencies within our cohort (such as +1q, +6p, +7, +17q, +18, or -1p). However, only a few of them (del6q, del10q, +X) triggered a specific transcriptomic profile that could be detected as a major source of variation at the bulk level. In the case of del10q and +X, this might reflect their clonal nature, as we showed that signatures related to these CNA (ICA24 and ICA17) were homogeneously expressed by tumor cells within a biopsy.

Most transcriptomic studies that were conducted on FL biopsies at the bulk population level emphasised on non-malignant tumour-infiltrating cells. By dissecting the concomitant sources of variations using an independent component analysis, we reveal a previously under-estimated intra-tumor homogeneity but inter-patient heterogeneity of the FL cells. A high inter-patient heterogeneity was highlighted for the CNA-related components, as well as for ICA10, another signature reminiscent of the “GCB vs ABC” dichotomy by analogy with DLBCL subtypes. This is in line with a recent proteomic study from Wang et al., describing two recurrent patterns in FL single cell populations, resembling GC B-cells and memory B-cells. In their study, GC and memory B-cells co-occurred rarely, supporting the hypothesis that it represents a bi-modal, static state with a high inter-patient heterogeneity rather than an equilibrium between the two states that could dynamically interconvert at the intra-tumor level. Although these signatures did not correlate with clinical outcome, identifying features shared by all tumor cells within a single patient, could help in decision-making for precision therapy. However, further studies using distinct spatial biopsies would be necessary to confirm whether these features are truly shared by all FL cells, or are anatomical site-dependant.

On the other hand, we also identified one signature, ICA13, that displayed a completely different pattern, being clearly expressed by intra-tumor subclones but not shared by all tumor cells. Moreover, ICA13 strongly associated with the risk of progression. It was not independent

from the 23-gene predictor that we published previously³, reinforcing its relevance as a tumor cell feature of biological and clinical interest. It was demonstrated in B-cell lymphomas, that the different subclones exhibit divergent drug sensitivities³¹. This could lead to resistance and emergence of relapse within a varying time. Deciphering whether the ICA13-positive subclones are responsible for relapse in immunochemotherapy treated patients will need further functional studies and analyses of paired diagnosis/relapse samples.

References

- 1 Casulo C, Byrtek M, Dawson KL, Zhou X, Farber CM, Flowers CR *et al.* Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. *J Clin Oncol* 2015; **33**: 2516–2522.
- 2 Verdière L, Mourcin F, Tarte K. Microenvironment signaling driving lymphomagenesis: *Current Opinion in Hematology* 2018; **25**: 335–345.
- 3 Huet S, Tesson B, Jais J-P, Feldman AL, Magnano L, Thomas E *et al.* A gene-expression profiling score for prediction of outcome in patients with follicular lymphoma: a retrospective training and validation analysis in three international cohorts. *Lancet Oncol* 2018; **19**: 549–561.
- 4 Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, Hoster E, Staiger AM, Szczepanowski M *et al.* Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol* 2015; **16**: 1111–1122.
- 5 Okosun J, Bödör C, Wang J, Araf S, Yang C-Y, Pan C *et al.* Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat Genet* 2014; **46**: 176–181.
- 6 Araf S, Wang J, Korfi K, Pangault C, Kotsiou E, Rio-Machin A *et al.* Genomic profiling reveals spatial intra-tumor heterogeneity in follicular lymphoma. *Leukemia* 2018; **32**: 1261–1265.
- 7 Haebe S, Shree T, Sathe A, Day G, Czerwinski DK, Grimes SM *et al.* Single-cell analysis can define distinct evolution of tumor sites in follicular lymphoma. *Blood* 2021; **137**: 2869–2880.
- 8 Kridel R, Chan FC, Mottok A, Boyle M, Farinha P, Tan K *et al.* Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study. *PLoS Med* 2016; **13**: e1002197.
- 9 Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V *et al.* Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 2011; **471**: 189–

195.

10 Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R *et al.* Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 2010; **42**: 181–185.

11 Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD *et al.* Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 2011; **476**: 298–303.

12 Green MR, Kihira S, Liu CL, Nair RV, Salari R, Gentles AJ *et al.* Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; **112**: E1116-1125.

13 Béguelin W, Teater M, Meydan C, Hoehn KB, Phillip JM, Soshnev AA *et al.* Mutant EZH2 Induces a Pre-malignant Lymphoma Niche by Reprogramming the Immune Response. *Cancer Cell* 2020; **37**: 655-673.e11.

14 Boice M, Salloum D, Mourcin F, Sanghvi V, Amin R, Oricchio E *et al.* Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell* 2016; **167**: 405-418.e13.

15 Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC *et al.* Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 2004; **351**: 2159–2169.

16 Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y *et al.* Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Meth* 2015; **12**: 453–457.

17 Zaitsev A, Chelushkin M, Dyikanov D, Cheremushkin I, Shpak B, Nomie K *et al.* Precise reconstruction of the TME using bulk RNA-seq and a machine learning algorithm trained on artificial transcriptomes. *Cancer Cell* 2022; **40**: 879-894.e16.

18 Salles G, Seymour JF, Offner F, López-Guillermo A, Belada D, Xerri L *et al.* Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet* 2011; **377**: 42–51.

19 Popova T, Manié E, Stoppa-Lyonnet D, Rigai G, Barillot E, Stern MH. Genome Alteration Print (GAP): a tool to visualize and mine complex cancer genomic profiles obtained

by SNP arrays. *Genome Biol* 2009; **10**: R128.

20 Rotival M, Zeller T, Wild PS, Maouche S, Szymczak S, Schillert A *et al.* Integrating genome-wide genetic variations and monocyte expression data reveals trans-regulated gene modules in humans. *PLoS Genet* 2011; **7**: e1002367.

21 Hyvärinen A, Oja E. Independent component analysis: algorithms and applications. *Neural Netw* 2000; **13**: 411–430.

22 Liebermeister W. Linear modes of gene expression determined by independent component analysis. *Bioinformatics* 2002; **18**: 51–60.

23 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 15545–15550.

24 Shaffer AL, Wright G, Yang L, Powell J, Ngo V, Lamy L *et al.* A library of gene expression signatures to illuminate normal and pathological lymphoid biology. *Immunol Rev* 2006; **210**: 67–85.

25 Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Stat Soc Ser B.* 1995; : 289–300.

26 Caganova M, Carrisi C, Varano G, Mainoldi F, Zanardi F, Germain P-L *et al.* Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J Clin Invest* 2013; **123**: 5009–5022.

27 Béguelin W, Teater M, Gearhart MD, Calvo Fernández MT, Goldstein RL, Cárdenas MG *et al.* EZH2 and BCL6 Cooperate to Assemble CBX8-BCOR Complex to Repress Bivalent Promoters, Mediate Germinal Center Formation and Lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2016; **30**: 197–213.

28 Bouska A, McKeithan TW, Deffenbacher KE, Lachel C, Wright GW, Iqbal J *et al.* Genome-wide copy-number analyses reveal genomic abnormalities involved in transformation of follicular lymphoma. *Blood* 2014; **123**: 1681–1690.

29 Georgiev H, Ravens I, Papadogianni G, Bernhardt G. Coming of Age: CD96 Emerges as Modulator of Immune Responses. *Front Immunol* 2018; **9**: 1072.

30 Becht E, McInnes L, Healy J, Dutertre C-A, Kwok IWH, Ng LG *et al.* Dimensionality

reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol* 2019; **37**: 38–44.

31 Roider T, Seufert J, Uvarovskii A, Frauhammer F, Bordas M, Abedpour N *et al.* Dissecting intratumour heterogeneity of nodal B-cell lymphomas at the transcriptional, genetic and drug-response levels. *Nat Cell Biol* 2020; **22**: 896–906.

Supplemental Tables

Supplemental Table 1: Leading genes of each component of the Independent Component Analysis. Genes are ordered by positive (1st part of the table) and negative (2nd part of the table) weight and by alphabetical order.

Supplemental Table 2: Significant associations between each component from the Independent Component Analysis and gene sets from LLMPP and GSEA databases. Enrichments for outlier-driven signatures are not shown. Abbreviations: FDR, false discovery rate; LLMPP, Leukemia Lymphoma Molecular Profiling Project; GSEA, Gene Set Enrichment Analysis.

Supplemental Table 3: Karyotypes and/or copy-number profiles obtained by SNP-arrays analysis, for the 6 samples investigated by single-cell RNA-sequencing.

Supplemental methods

Computational methods for bulk gene-expression data

Unsupervised clustering. Gene clustering was performed on gene-expression data using the fastICA algorithm^{1–3}. ICA identifies expression signatures (“components”) capturing major underlying sources of variation in the data and attributes a weight for each gene in each component which can be positive or negative. The activity of each component in each sample can be computed as the weighted sum of the expression of its component genes (“metagene”) while the genes most influential in each component can be retrieved by selecting those with the largest weights. Permutations were applied to determine the maximal number of non-random components.

fastICA parameters. The fastICA algorithm requires a number of components to be specified as a parameter. In order to determine the optimal number of components that could be extracted from our datasets, we used an approach similar to Rotival et al¹. Since the first step of fastICA is to transform the data using singular value decomposition (SVD) into the specified number of components, we calculated the variance explained by each SVD component in our data and compared that to the variance explained by SVD components in random (permuted) data. According to this analysis (data not shown), the variance explained by each of the 25 first components in the original data was superior to the variance explained by the corresponding components in permuted data. We therefore determined that the 25th first components did correspond to real signal in the data and we used 25 as the number of ICA components in the fastICA algorithm. The R package fastICA was used to perform the analysis, using the “parallel” version of the algorithm, the “logcosh” function, with n.comp=25, alpha=1 and

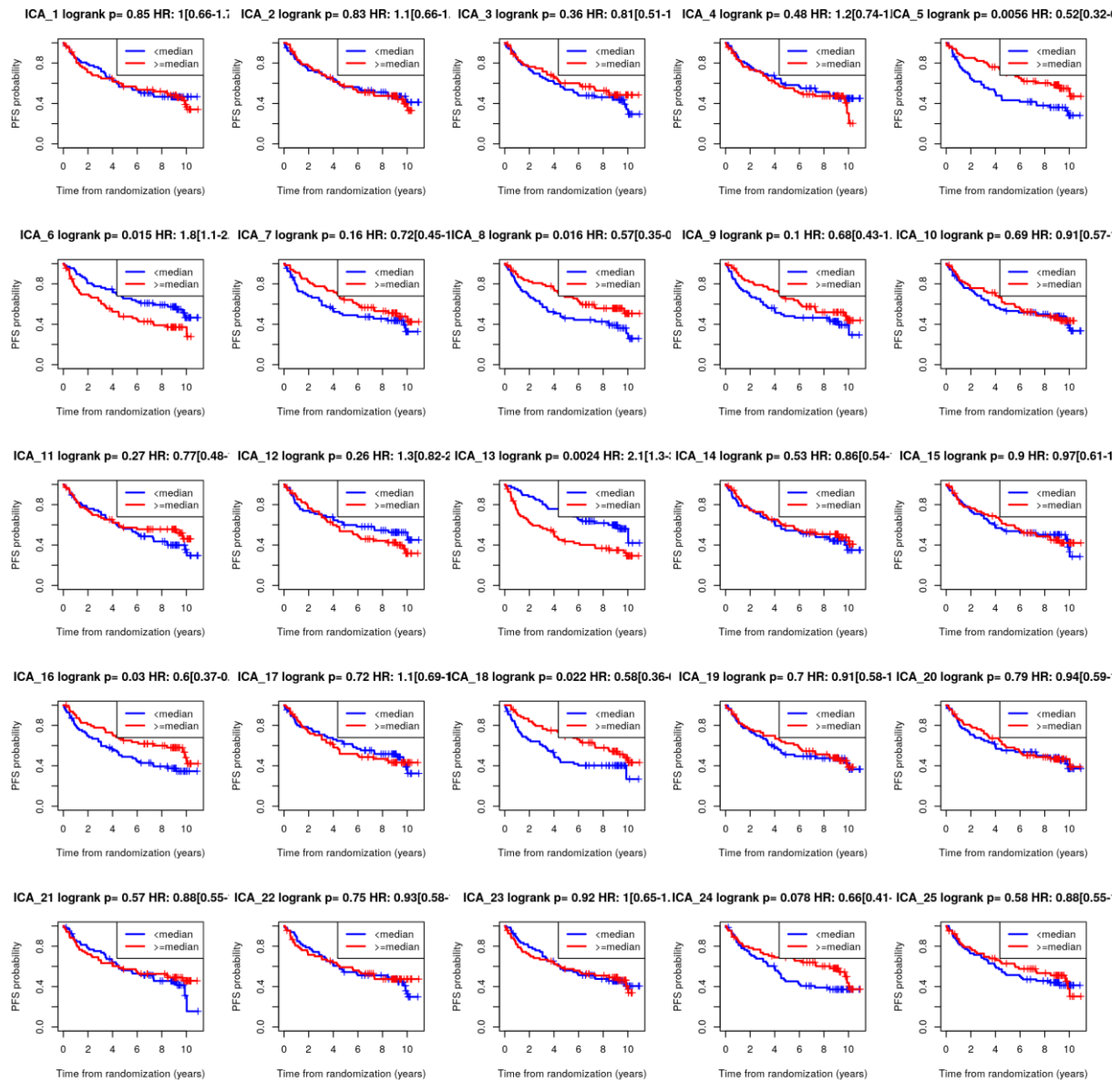
tol=1e-04. The data was standardized per gene to mean 0 and variance 1 prior to applying the algorithm.

Stability of the fastICA analysis. Since fastICA is an iterative algorithm that starts with a random initialization state, it is necessary to ensure that the solution of the algorithm for which convergence was reached is stable across multiple runs. We therefore ran fastICA ten times and compared the components output at each run both in terms of their leading genes (S matrix) and in terms of the correlation of their activity across samples (A matrix). We observed that for all runs, very similar components were found and we selected for our analyses one of the ten runs for which all 25 components were repeatedly identified in multiple runs (data not shown).

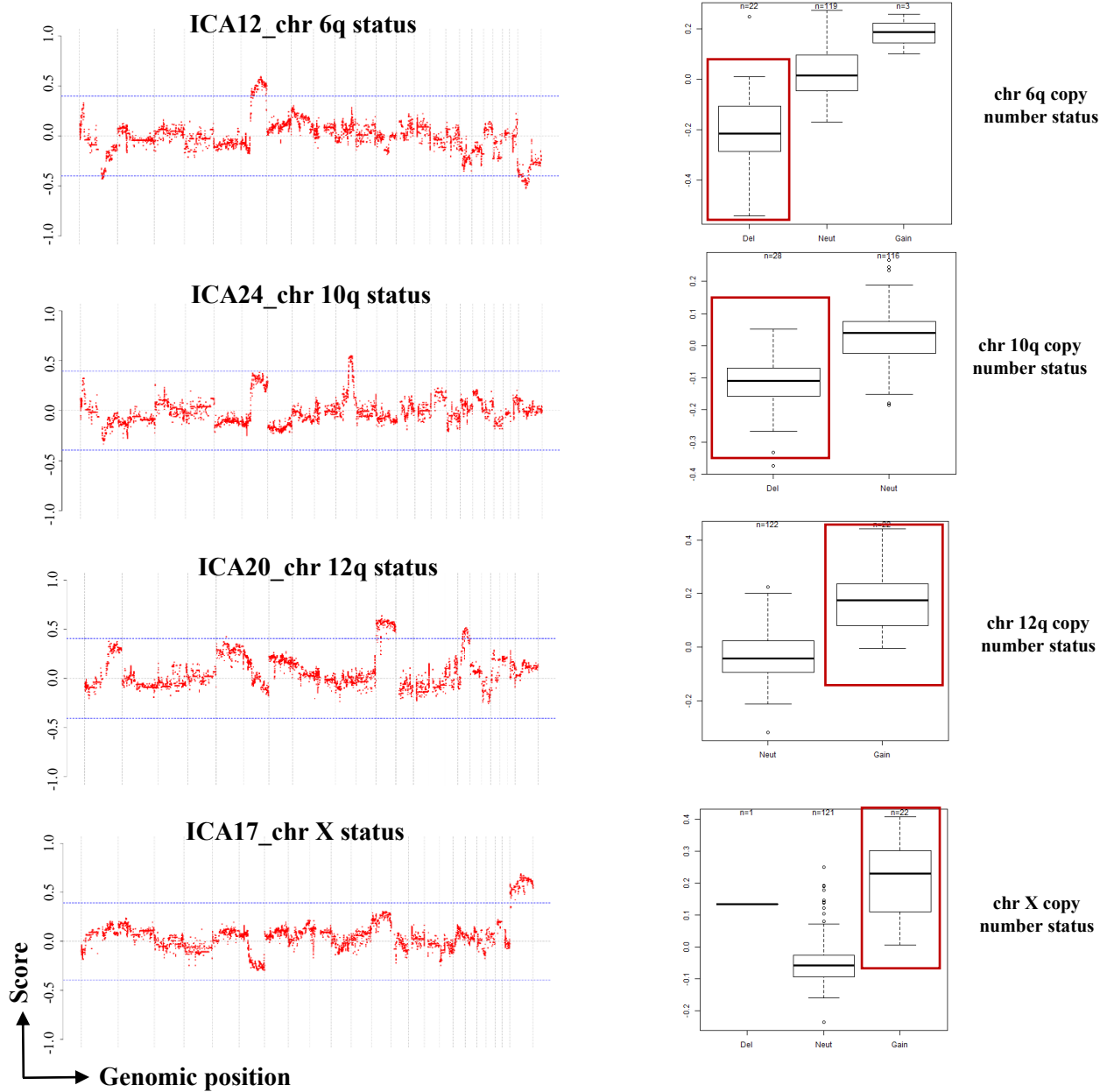
Leading genes of components and orientation of the components. We defined for each component the set of “leading genes”, those most influential in the component, as those with weights over 3 standard deviation in absolute value. In order to facilitate their interpretation, some components were flipped (the sign was changed) so that for every components there were more leading genes with positive weights than leading genes with negative weights. This was made so that the positive score of a component would always be associated with positive expression of most of its leading genes, thereby facilitating the interpretation.

Experimental - batch associated components. Each ICA component score (A matrix) was tested for association with experimental factors: data of RNA extraction and date of hybridation of the arrays using ANOVA. For 6 of the components, R2 quantifying the variance explained by one of these two factors was over 25% and those were therefore discarded for being associated with batch effects and reflecting experimental rather than biological variations (ICA1, ICA2, ICA3, ICA11, ICA14, ICA21).

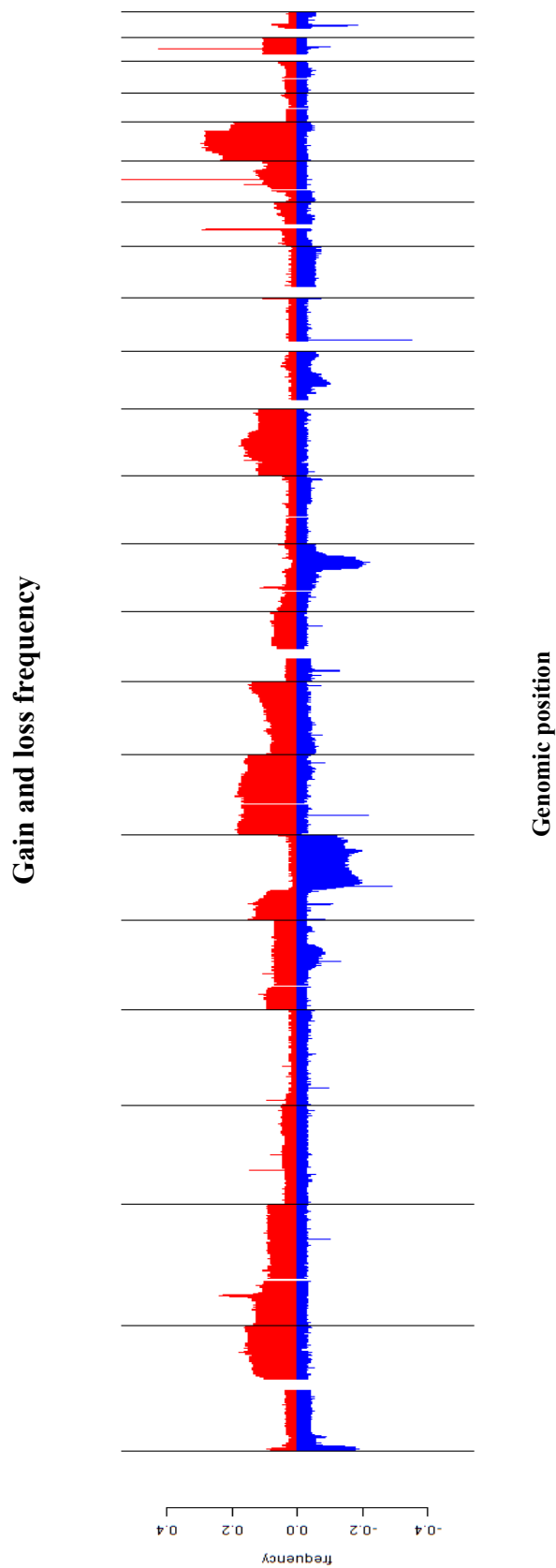
Supplemental Figures



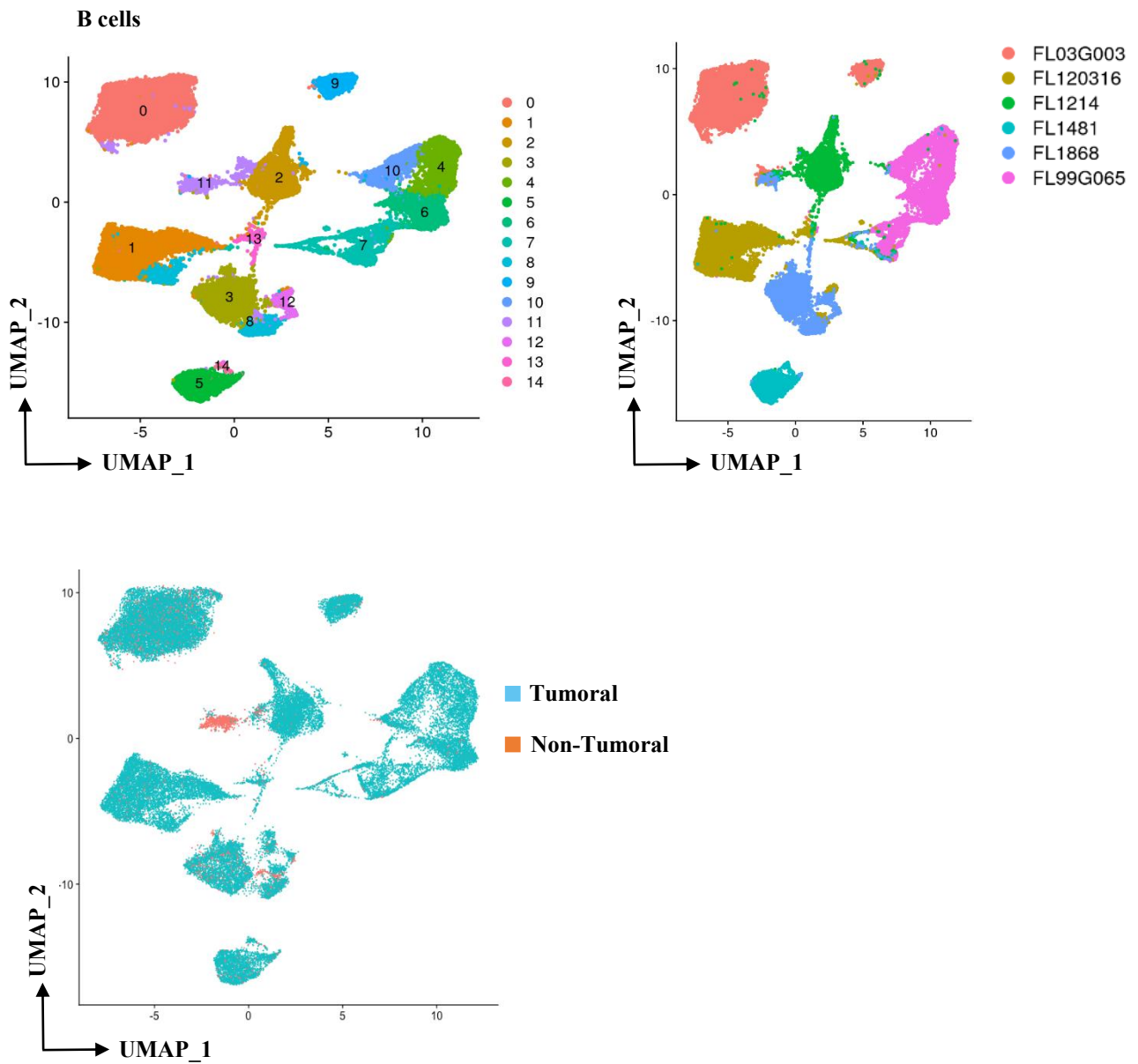
Supplemental Figure 1: Progression-free survival of FL patients according to their score for each ICA signature.



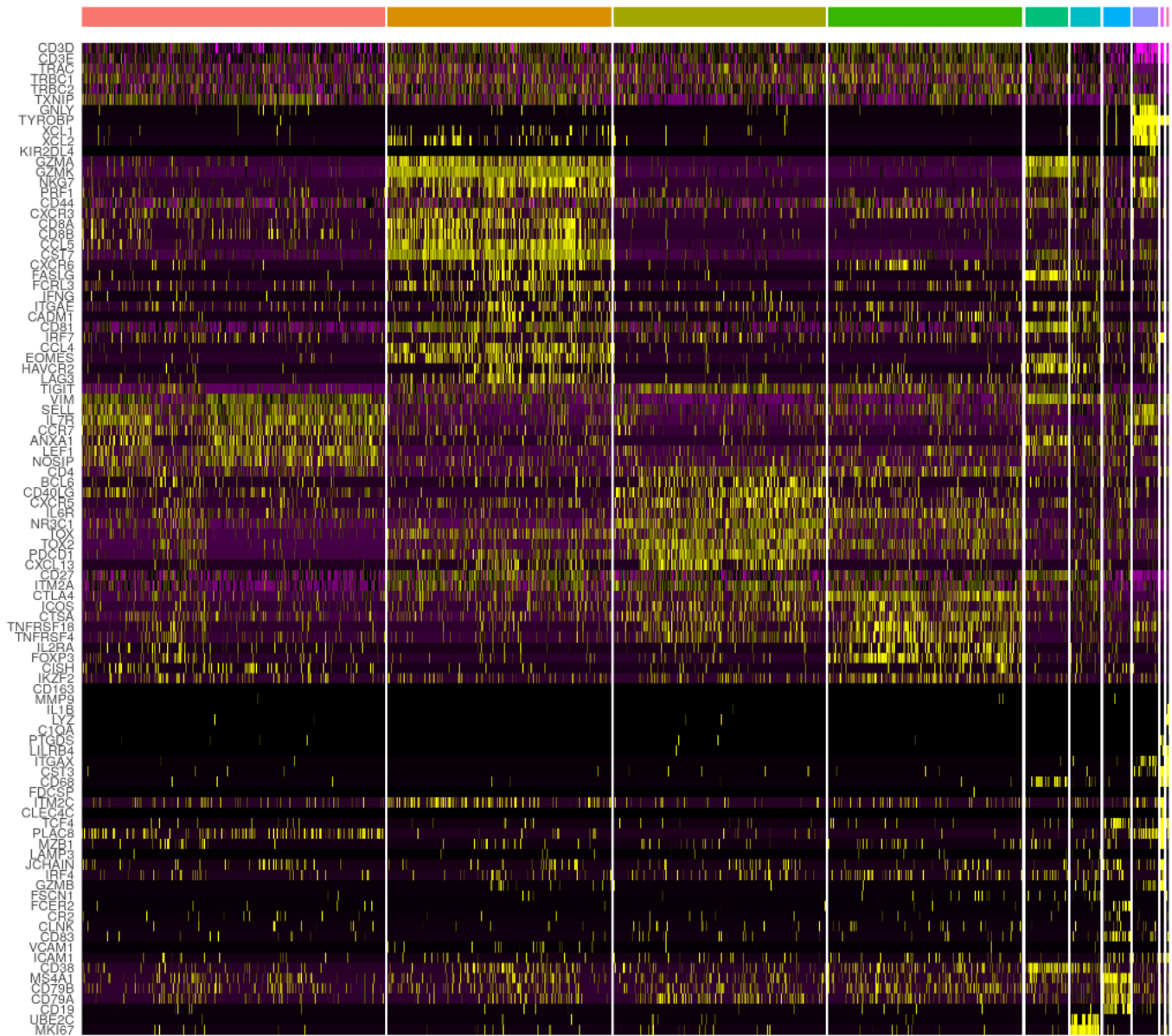
Supplemental Figure 2: Correlation between the scores of components ICA10, ICA17, ICA20, ICA24 and copy-number, according to genomic position. Some components are driven by specific chromosomal imbalances: low ICA12 and ICA24 scores are characteristic of loss of the 6q and 10q regions respectively whereas high ICA20 and ICA17 scores reflect a gain the 12q region or in the X chromosome.



Supplemental Figure 3: Relative frequency of chromosome gain or loss in FL patients. Red: gains; blue: deletions.



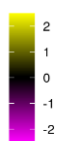
Supplemental Figure 4: Malignant FL B cells display a strong inter-patient heterogeneity, whereas non-malignant B cells cluster together. UMAP projection of all patient cells illustrating the fact that non-malignant B cells cluster together, independently of donor origin.



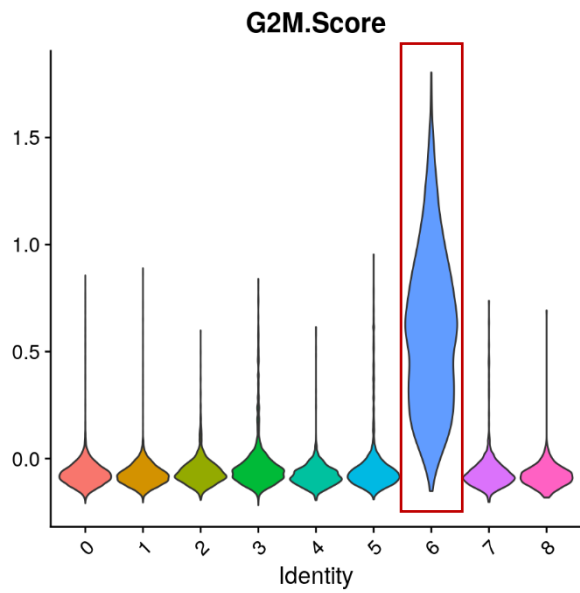
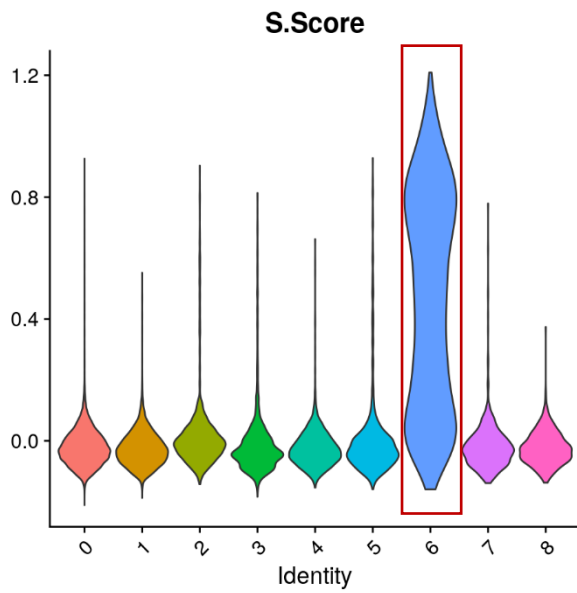
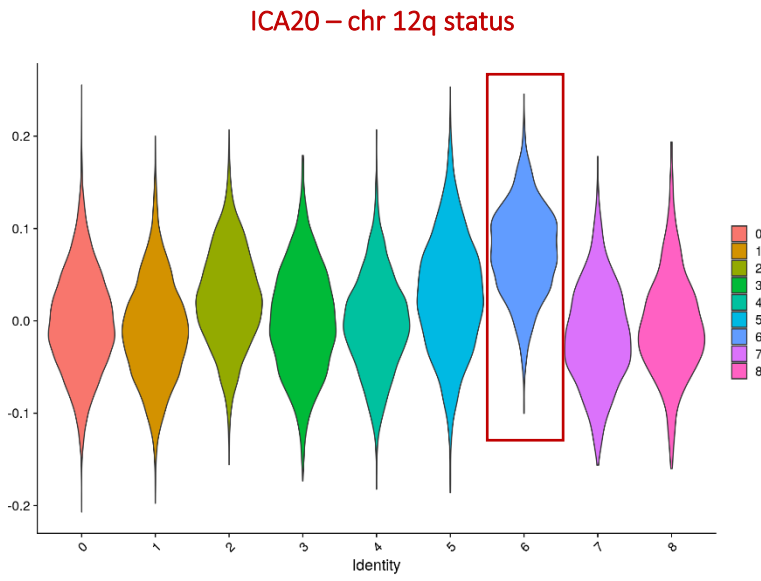
Clusters

- 0. Naïve T cells
- 1. CD8⁺ T cells
- 2. TFHs
- 3. Tregs
- 4. Other cytotoxic
- 5. Proliferating
- 6. Doublets with B cells
- 7. NK
- 8. DC
- 9. Macrophages

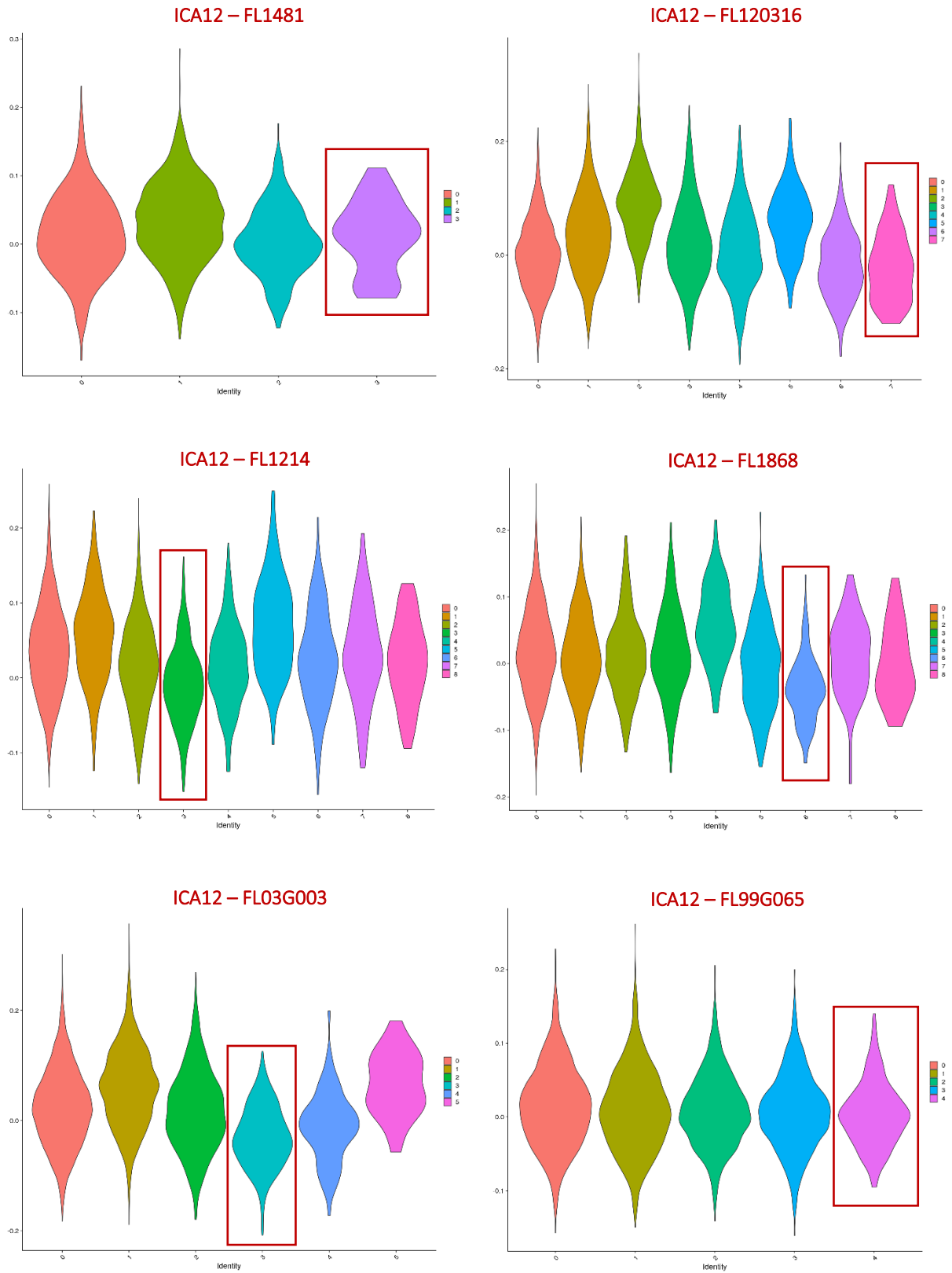
Expression



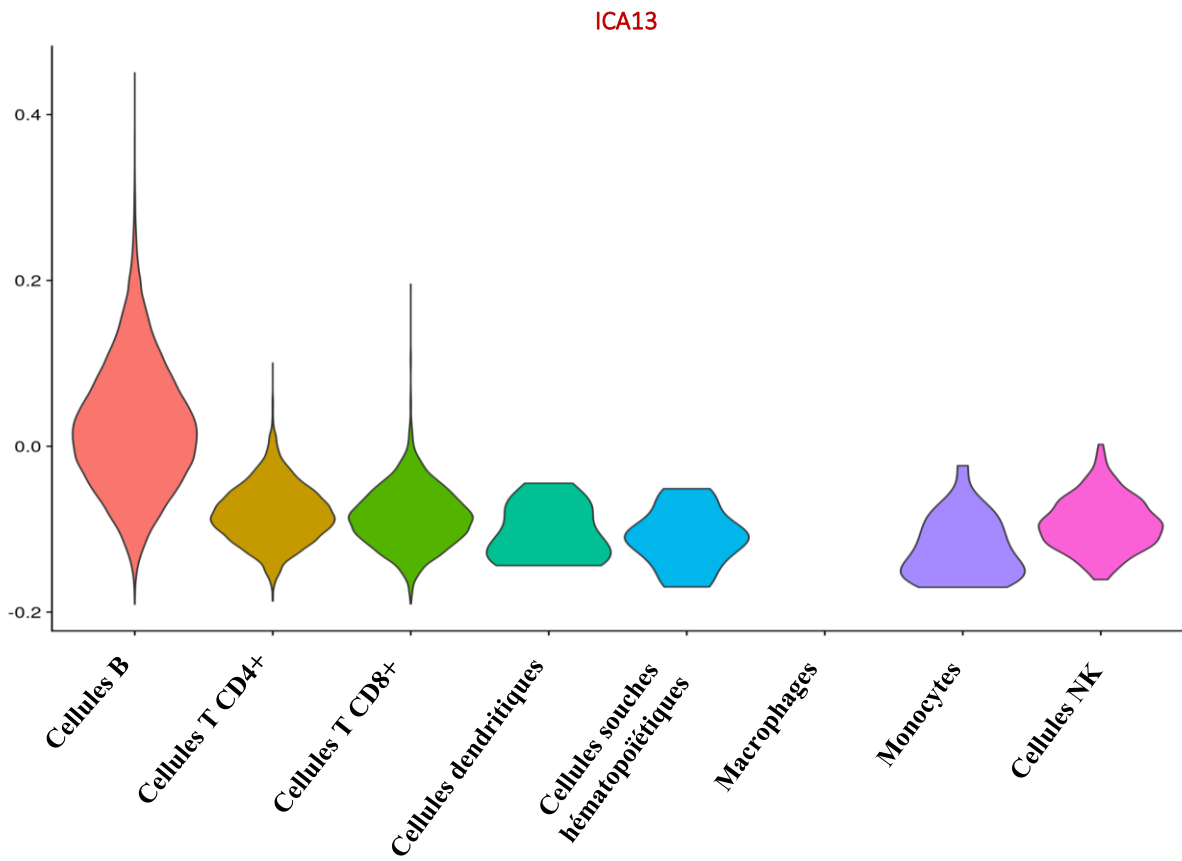
Supplemental Figure 5: Identification of TME cellular subsets. Gene expression heatmap of single TME non-B cells for the expression of indicated marker genes used to annotate unsupervised clusters. Cells (columns) are grouped by cell type clusters as indicated by the bar above plot. Genes (rows) are grouped, from top to bottom, according to their expression in the different cell types.



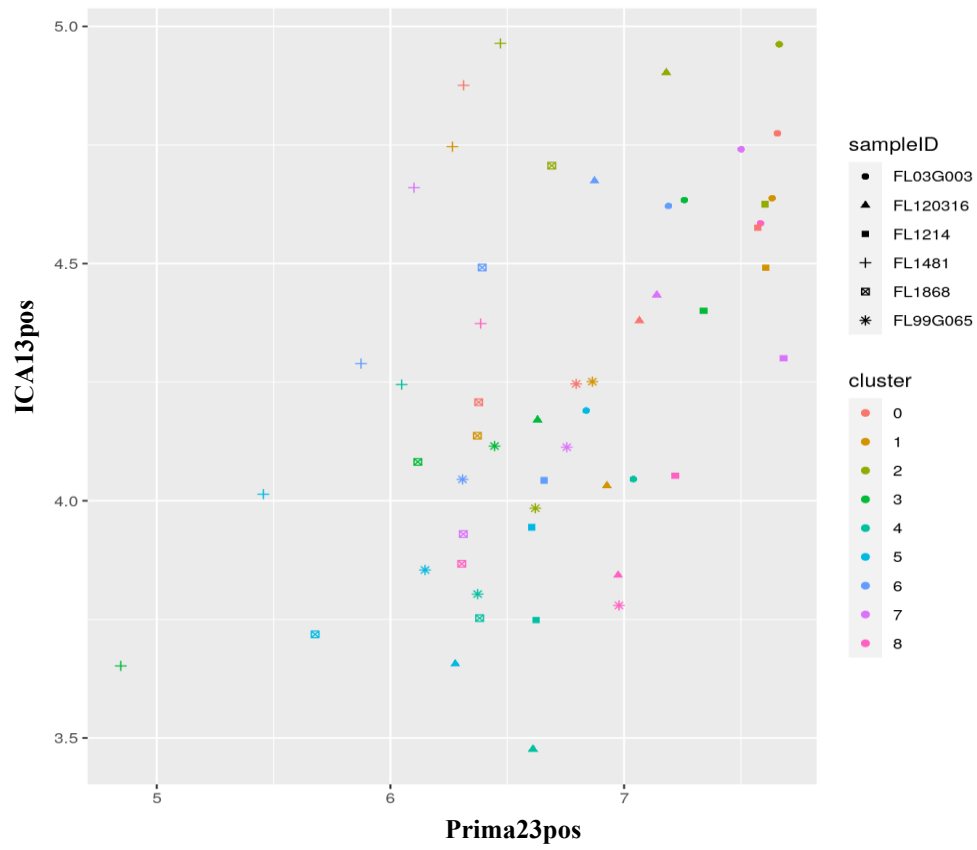
Supplemental Figure 6: Violin plots illustrating the ICA12 signature. Analysis of integrated B cells from all samples shows that ICA12, linked to a gain in chromosome 12, is strongly represented in cycling cells.



Supplemental Figure 7: Violin-plots illustrating the ICA12 signature in all samples. Inset: cluster of normal B cells.



Supplemental Figure 9: Violin-plots illustrating ICA13 expression in TME in all single cells (cell types assigned according to BlueprintSC_Type function).



Supplemental Figure 10: Correlation between ICA13 score and the 23-gene scores calculated in each cluster of B cells for each patient (Pearson correlation: $\rho = 0.49$ - $p = 0.00015$).

DISCUSSION & CONCLUSION

Les organoïdes, un modèle pertinent pour l'étude du lymphome folliculaire ?

Au stade pré-clinique, les thérapies anticancéreuses candidates pour les lymphomes sont principalement évaluées grâce à des modèles de culture 2D *in vitro* afin de ne sélectionner que les thérapies dont le rapport bénéfice/risque est positif, en vue d'essais cliniques chez l'Homme. Cependant, seules 5% des nouvelles molécules évaluées obtiennent une approbation clinique tandis que les 95% restants échouent en raison d'une forte toxicité et/ou d'une faible efficacité³⁸⁶⁻³⁸⁸. Ceci s'expliquerait par une faible corrélation entre les données pré-cliniques obtenues *in vitro* et les résultats des essais cliniques, et par conséquent par un manque de modèles pré-cliniques pertinents pour la pathologie étudiée. En effet, les modèles de culture 2D, n'utilisant que rarement des cellules primaires de lymphomes et principalement des lignées cellulaires, ne sont pas en mesure de récapituler la complexité de la tumeur ainsi que les interactions entre les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement¹⁹¹. Ainsi, le développement de modèles de culture *in vitro* capables de récapituler i) la niche tumorale environnante et son organisation spatiale ainsi que ii) l'hétérogénéité génétique des cellules tumorales est essentiel à la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques qui bénéficieraient davantage aux patients. Des études ont en effet rapporté l'existence d'une forte hétérogénéité intra-tumorale chez les patients atteints de LF, lorsque l'on compare deux sites ganglionnaires différents ou les altérations génétiques acquises lors de la transformation lymphomateuse^{389,390}. Les caractéristiques moléculaires des cellules tumorales de LF, mais aussi l'évolution divergente de sous-clones tumoraux majoritaires entraînant potentiellement l'apparition de nouveaux sous-clones dans d'autres sites ganglionnaires, favorisent cette hétérogénéité intra-tumorale et rendent difficile la compréhension des mécanismes de résistance tumorale ainsi que l'identification de biomarqueurs spécifiques de la tumeur pour les thérapies ciblées^{25,26,28,138,389,390}. Par ailleurs, chez un même patient, l'hétérogénéité intra-tumorale pourrait s'expliquer d'une part par des taux moyens d'hypermutation somatique aberrante plus élevés, liés à la surexpression du transcrit d'AID, et d'autre part par des profils d'expression génique différents entre les clusters de cellules B tumorales, avec par exemple une forte activité de la voie NF- κ B et de la présentation antigénique dans un site et une forte activation de la voie MAPK ou de gènes en rapport avec l'adhésion cellulaire et la migration dans l'autre site³⁸⁹. Ce travail de thèse a également permis d'identifier des signatures spécifiques permettant de récapituler certains aspects de l'hétérogénéité inter-tumorale du LF,

avec notamment des profils génétiques spécifiques associées à des altérations du nombre de copies (del6q, del10q, +X) retrouvés spécifiquement chez certains patients atteints de LF, mais aussi de l'hétérogénéité intra-tumorale avec la signature transcriptomique ICA13, associée à une survie sans progression plus courte, exprimée par des clusters cellulaires spécifiques et retrouvée de façon différente entre les patients. Le modèle 3D organoïde dérivé de patients atteints de LF que nous rapportons ici, précédemment développé et appliqué à des cellules murines, à des lignées cellulaires et plus récemment à des xénogreffes établies à partir de patients atteints de LBDGC, compte parmi les rares modèles permettant de cultiver des cellules primaires de LF^{193,308,381}. La conception initiale du modèle à laquelle s'ajoute l'utilisation de biopsies de patients atteints de LF contribuent à l'originalité du modèle que nous proposons ici. L'une des premières raisons quant à notre choix d'adapter ce modèle à la culture de cellules primaires de LF est que les études précédentes relataient sa capacité à reproduire la réaction qui se produit au sein du CG, site d'initiation du LF^{199,308,379}. Deuxièmement, bien que nous nous soyons aperçus que la plupart des cellules stromales, et en particulier les FDCs, soient complètement perdues au cours du processus de digestion ou de décongélation des échantillons primaires de LF, la fonctionnalisation de l'organoïde avec le peptide ligand d'intégrine REDV, qui mime VCAM-1 et qui interagit avec l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (ou VLA-4), imite l'interaction entre les FDCs et les cellules tumorales de LF. Par ailleurs, l'ajout de BAFF soluble dans le milieu de culture permet de compléter ces interactions, et de délivrer les principaux signaux de survie fournis par les FDCs. Troisièmement, la culture de l'ensemble des cellules issues des biopsies de LF au sein du modèle organoïde a permis de mettre en évidence la présence de cellules NK et le maintien de leur survie après 3 jours de culture. Ce point est particulièrement intéressant car les études rapportent plutôt un apport exogène de cellules NK dans les cultures 3D, ne reflétant donc pas l'état immunologique du patient^{261,370}. Par ailleurs, chez les patients atteints de LF, les NK jouent un rôle crucial dans le déclenchement de l'ADCC probablement induit par l'utilisation d'anticorps anti-CD20 comme le rituximab, et leur absence dans le sang périphérique est associée à un mauvais pronostic^{150,391}. Enfin, l'analyse non supervisée de nos données de cytométrie en flux a révélé que les divers clusters de cellules B se regroupent en fonction de leur échantillon d'origine, reflétant une forte hétérogénéité inter-patient des cellules tumorales de LF, tandis que les cellules du microenvironnement se regroupent plutôt selon leur lignage immunitaire. Ceci corrèle avec nos données de scRNA-seq et ce qui est rapporté dans la littérature³⁸⁹.

La survie des cellules primaires de LF cultivées au sein d'un modèle 3D, n'a pas fait l'objet d'études approfondies, à l'exception de celles menées par Lamaison et al.³⁷⁵ et plus récemment par Faria et al.³⁷². La première étude rapporte l'établissement d'un modèle basé sur l'encapsulation de cellules primaires de LF dans des microsphères d'alginate perméables permettant de générer des sphéroïdes au sein desquels les cellules primaires de deux patients atteints de LF, co-cultivées avec des TSC, ont pu être maintenues en culture pendant 11 jours³⁷⁵. Néanmoins, la très faible quantité de cellulesensemencées dans les microsphères, le fait que les données de viabilité cellulaire ne soient pas décrites (avant et après ensemencement), et le fait de rapporter les pourcentages de survie de j7 et j11 au jour 3 biaise potentiellement l'interprétation quant à la survie des cellules primaires dans ce modèle. La seconde étude rapporte la culture de cellules primaires de LF au sein d'un modèle sphéroïde et le maintien de leur survie pendant 6 jours³⁷². Toutefois, les données de viabilité ne sont pas clairement explicitées dans l'article. Dans notre modèle organoïde, la survie des cellules primaires de LF était assez variable entre les échantillons de patients mais ne dépassait pas 50% après 3 jours de culture pour la plupart d'entre eux, exception faite de 2 patients pour lesquels la survie des cellules tumorales a été maintenue jusqu'à 5 jours de culture (données non montrées). Les études d'Epron et Goval ont démontré que l'IL-15 et le CD40L favorisaient la croissance et la prolifération des cellules primaires de LF lorsqu'elles sont cultivées en 2D^{143,169}. Nous avons donc été surpris de constater que non seulement l'ajout de ces deux éléments dans la culture organoïde n'améliorait pas la survie des cellules primaires de LF (données non montrées en ce qui concerne l'ajout d'IL-15), et que le CD40L induisait même leur apoptose. Cette dernière observation contraste avec plusieurs études démontrant un enrichissement des tumeurs de LF en Tfh, qui favoriseraient la survie des cellules tumorales *via* l'IL-4 et la signalisation CD40L^{14,165,392,393}. Il a par ailleurs été rapporté que les Tfh issus de LF présentent un profil transcriptomique différent de celui des Tfh issus de tissus sains, avec une surexpression d'IL-4, d'IL-2, d'IFN- γ et de TNF, ce qui expliquerait pourquoi dans le LF, les Tfh contribuent à améliorer la survie des cellules tumorales^{165,393}. Haebe et al. rapportent que l'interaction CD40/CD40L à l'échelle transcriptomique figure parmi les interactions les plus significatives entre les cellules tumorales de LF et les Tfh, avec une forte corrélation entre l'expression du CD40 dans la tumeur et la prolifération des Tfh, suggérant que cette signalisation contribue à la création d'un microenvironnement tumoral favorable à la survie des cellules tumorales³⁸⁹.

Parallèlement au développement d'un nouveau modèle 3D organoïde dérivé de cellules primaires de LF, l'un des objectifs principaux de ce projet de thèse était de savoir si le modèle pouvait prédire la réponse thérapeutique, notamment à l'immunochimiothérapie en utilisant le R-CHOP comme preuve de concept. Plusieurs études, qui rapportent l'utilisation isolée des différents composés du R-CHOP, exposent les cellules d'intérêt entre 24 et 48h et observent des effets sur la viabilité cellulaire dès 24h^{193,375,271,394,395}. Lorsque les cellules primaires de LF, cultivées à la fois en culture 2D et dans le modèle organoïde, ont été exposées au R-CHOP pendant 16h, nous avons observé, à l'inverse de la culture 2D, une corrélation étroite entre la réponse au R-CHOP dans le modèle organoïde 3D et les résultats cliniques. Ceci concorde avec les données de la littérature qui i) rapportent un écart important dans la réponse aux traitements anticancéreux lorsque les cellules tumorales sont cultivées en 2D, altérant l'évaluation du bénéfice clinique réel de ces traitements pour les patients et ii) suggèrent que les tests fonctionnels réalisés dans ce modèle peuvent fournir des informations cliniquement pertinentes pour orienter par exemple le choix du traitement¹⁸²⁻¹⁸⁴. Toutefois, chez 4 des 17 patients, les réponses au RCHOP dans les organoïdes 3D n'ont pas été strictement corrélés à la réponse clinique *in vivo*. Dans la littérature, la plupart des études rapportent l'utilisation de modèles 3D afin de prédire la réponse des patients aux traitements anticancéreux dans les tumeurs solides, et seul un modèle 3D sphéroïde de cellules primaires du lymphome du manteau a été rapporté comme récapitulant la réponse des patients à l'ibrutinib^{340,342,373}. Par la suite, au moyen d'un panel de cytométrie en flux composé de 18 anticorps permettant d'identifier différentes populations cellulaires (les cellules B, les NK, les cellules TCD3 – dont les TCD4, les TCD8 et les Tfh, les monocytes, les macrophages et les FDCs) et d'une analyse non supervisée, il nous a été possible d'identifier les Tfh comme l'une des populations cellulaires pouvant être à l'origine de la résistance au R-CHOP. En effet, nous avons observé qu'à l'inverse des patients bons répondeurs, les patients qui ne répondent pas au R-CHOP, ainsi que les 4 patients dont la réponse ne corrèle pas à la réponse clinique dans le modèle organoïde 3D, ont un taux de Tfh beaucoup plus important. De la même façon, Faria et al. rapportent que dans leur étude, le microenvironnement tumoral, issu de la biopsie des patients, est préservé au cours de la culture, avec peu de pertes cellulaires de j0 à j6³⁷². Ils identifient par ailleurs une population de lymphocytes T CD8 exhausted dont l'expression est associée à la réponse au traitement. Dans la littérature, plusieurs études font état du rôle des Tfh et de l'interaction CD40/CD40L dans la résistance au traitement. En effet, il a été rapporté que la stimulation *in*

in vitro du CD40 dans les cellules de LLC dérivées du sang périphérique induit une augmentation de la résistance aux traitements cytotoxiques comme la fludarabine, soulignant l'impact de l'interaction CD40/CD40L^{396,397}. Une étude prospective a également exploré la signification clinique du changement dynamique des Tfh, avant et après chimiothérapie chez des patients atteints d'hémopathies lymphoïdes dont 52 LNH³⁹⁸. Les auteurs rapportent une augmentation du nombre de Tfh chez les patients atteints de LNH par rapport aux individus sains, mais surtout un nombre de Tfh plus important chez les patients qui ne répondent pas au traitement ou dont la maladie progresse par rapport aux patients en rémission complète après la sixième cure de traitement. Plus récemment, une étude portant sur le purpura thrombopénique immunologique (PTI), une maladie auto-immune caractérisée par une thrombocytopénie, a rapporté des faits similaires aux données que nous avons obtenues³⁹⁹. L'analyse des gènes différenciellement exprimés entre les individus sains et les patients atteints de PTI a révélé un nombre de Tfh plus importants chez ces derniers, suggérant que les Tfh stimuleraient le clone lymphoïde auto-réactif. Il y a toutefois un changement dans cette dynamique chez les patients qui répondent à la dexaméthasone, avec une diminution du nombre de Tfh. Ainsi, l'ensemble de ces éléments suggère un rôle des Tfh dans le développement ou la progression d'un clone lymphoïde pathologique (tumoral ou auto-réactif) et la résistance au traitement.

L'impact de la signalisation CD40L, avec et sans traitement

L'apport du CD40L dans le modèle 3D organoïde a mis en évidence deux cas de figures :
i) sans traitement, alors qu'on s'attendait à ce que la stimulation du CD40 par le CD40L favorise la survie des cellules tumorales de LF, c'est l'effet inverse qui s'est produit avec l'induction de l'apoptose dans ces cellules. On pourrait alors supposer que l'ajout de CD40L exogène conjointement à la présence de Tfh endogènes au sein de la biopsie, qui fournissent déjà du signal CD40L aux cellules B tumorales, a contribué à un excédent de signal induisant la mort cellulaire ;
ii) sous R-CHOP, le CD40L protège les cellules de l'apoptose induite par le traitement et provoque une résistance accrue, suggérant qu'elle est en partie induite par l'interaction CD40/CD40L. Certaines données de la littérature à ce propos sont en contradiction avec nos résultats. En effet, deux études rapportent que la stimulation du CD40 dans les cellules de la LLC, suivie de leur exposition à des anticorps anti-CD20, comme l'obinutuzumab ou le rituximab, augmente leur sensibilité au traitement, et ce d'autant plus lorsque l'obinutuzumab

est combiné à d'autres drogues cytotoxiques comme le bortezomib, la bendamustine ou encore le chlorambucil^{400,401}. L'augmentation de la sensibilité au traitement des cellules de la LLC lorsque leur CD40 est stimulé pourrait s'expliquer par le fait que l'activation de la voie du CD40, exprimé par les cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques, les cellules B et les monocytes, induit un effet co-stimulant sur ces cellules favorisant l'augmentation de l'expression du CMH de même que la production accrue de cytokines pro-inflammatoires et l'amorçage de cellules T, favorisant ainsi la réponse immunitaire antitumorale⁴⁰². Ainsi, il a été montré que la stimulation des cellules de la LLC par des anticorps monoclonaux agonistes du CD40, comme le sélicrelumab, active les cellules présentatrices d'antigène, favorise la réponse antitumorale induite par les lymphocytes T et sensibilise les cellules à la mort cellulaire induite par les anti-CD20^{402,403}. C'est dans ce contexte qu'un essai clinique (NCT03892525) évalue l'effet combiné du sélicrelumab et de l'atezolizumab chez les patients atteints de lymphomes B en rechute ou réfractaires aux traitements. En réponse à l'activation des cellules T par le sélicrelumab, les cellules tumorales expriment PD-L1 entraînant l'épuisement des cellules T effectrices. C'est là qu'intervient l'atezolizumab, un anticorps monoclonal anti-PD-L1 qui assure le blocage du récepteur PD-1 empêchant de ce fait l'inhibition de la réponse immunitaire induite par les interactions PD-L1/PD-1 et réactivant la réponse immunitaire antitumorale. Dans notre étude, l'identification d'une population de Tfh potentielle à l'origine de la résistance au traitement est néanmoins relevant avec les précédentes observations de la littérature, à savoir que les Tfh favorisent l'établissement d'un environnement pro-tumoral en favorisant la survie des cellules tumorales de LF *via* notamment la signalisation CD40L. Par ailleurs, l'étude de phase IA/II multicentrique portant sur le lincatumumab, un anticorps monoclonal antagoniste du CD40, a démontré une modeste activité de cet anticorps chez les patients atteints d'un LNH ou Hodgkinien avancé, confirmant nos données *in vitro*⁴⁰⁴. Toutefois il semblerait que ce signal ne soit pas suffisant à lui seul à l'induction de la chimiorésistance. En effet, le blocage seul de l'interaction CD40/CD40L, grâce à un anticorps bloquant dans les échantillons de patients « mauvais répondeurs », n'a pas suffi à contourner la résistance au traitement. Les études de Zhou et al. et de Sun et al. ont en effet rapporté que, par rapport aux individus sains, l'IL-21, une cytokine produite par les Tfh, était plus exprimée chez les patients atteints de PTI et semble contribuer à la résistance au traitement dans les LNH^{398,399}. Par ailleurs, Haebe et al. ont également rapporté que chez les patients atteints de LF, mis à part l'interaction CD40/CD40L, d'autres paires récepteur/ligand

étaient enrichies dont BTLA/TNFRSF14, IL-21/IL-21R et CXCL13/CXCR5, certaines de ces interactions étant particulièrement importantes dans les mécanismes d'échappement immunitaire¹⁶³.

Le transcriptome sur cellule unique, un outil pertinent pour comprendre les mécanismes de chimiorésistance ?

L'analyse transcriptomique à l'échelle « single-cell » d'échantillons de patients atteints de LF a permis de révéler l'hétérogénéité biologique inter-patients du LF mais également au sein d'une même biopsie^{32,30,33,31}. Cette hétérogénéité proviendrait d'une part de la diversité génomique sous-clonale mais également de facteurs extrinsèques issus de son microenvironnement tumoral, propre à chaque tumeur^{30,34}. Le travail précédemment mené par notre équipe²⁶, sur des données d'expression génique en bulk et issues d'échantillons de patients atteints de LF, a permis l'identification de 19 signatures associées à différents composants du microenvironnement tumoral (données non publiées). En effet, l'analyse de l'enrichissement des gènes avait permis d'associer chaque composante à des processus biologiques ou à des sous-ensembles cellulaires. Parmi elles, 6 composantes reflétaient la contribution de types cellulaires du microenvironnement tumoral (dont les cellules stromales, les Tfh, les macrophages et les cellules T naïves) et 13 composantes reflétaient principalement les caractéristiques des cellules tumorales. L'objectif principal de cette partie de mes travaux de thèse consistait à vérifier si ces signatures transcriptomiques identifiées en bulk RNA-seq ressortaient à l'échelle single-cell, mais surtout à essayer d'identifier les populations cellulaires qui expriment ces signatures. Dans notre étude, nous rapportons dans un premier temps, que les données obtenues en bulk RNA-seq conservent une réelle pertinence à l'échelle single-cell, notamment avec la signature ICA4 associée à la prolifération cellulaire et qui fait office de preuve de concept. En effet, nous avons observé l'existence d'un cluster de cellules hautement prolifératives qui surexpriment la signature ICA4, à la fois dans les cellules B mais également dans cellules non-B de tous les patients. Par ailleurs, des variations d'expression ont été observé alors même qu'il s'agissait de faibles proportions (de 0.3 à 13.9%). Trois des 6 signatures transcriptomiques associées au microenvironnement tumoral ont également été retrouvées à l'échelle single-cell – l'ICA5, l'ICA7 et l'ICA18, et sont spécifiquement exprimées par des clusters cellulaires identifiés respectivement comme des monocytes/macrophages, des cellules T

cytotoxiques/T régulatrices/Tfhs, et des cellules T naïves. De plus, nous rapportons ici une hétérogénéité transcriptomique à plusieurs niveaux, à la fois inter-patients, avec des variations dans l'expression des signatures transcriptomiques associées à des déséquilibres chromosomiques (del6q, del10q, +X), mais également intra-tumorale avec une expression variable de la signature transcriptomique ICA13 entre les différents clusters de cellules B tumorales chez un même patient. Les résultats que nous avons obtenu ne reposent toutefois que sur des données obtenues à partir de 6 patients. Par conséquent, nous avons l'intention d'élargir la cohorte à une vingtaine de patients, en tirant notamment parti de données de single-cell RNA-seq déjà disponibles dans notre laboratoire et provenant d'une cohorte de 14 patients atteints de LF⁴⁰⁵. L'objectif étant de déterminer la reproductibilité ainsi que la cohérence des résultats que nous avons obtenu sur un plus grand nombre de patients. Il serait également intéressant d'approfondir la découverte à l'échelle single-cell des signatures transcriptomiques associées aux déséquilibres chromosomiques. L'outil InferCNV, initialement conçu pour l'inférence des altérations du nombre de copies à partir de données d'expression génique en bulk RNA-seq, pourrait apporter une contribution considérable à notre étude en confirmant ou non à l'échelle single-cell la présence des CNV identifiés en bulk (Tickle et al., Visualizing Large-scale Copy Number Variation in Single-Cell RNA-Seq Expression Data (bioconductor.org), 2023). Son utilisation pourrait permettre une meilleure compréhension des variations du nombre de copies au niveau de chaque cellule unique, contribuant ainsi à une caractérisation plus fine des altérations génomiques dans le LF. Dans cette pathologie, les patients qui connaissent une progression de la maladie présentent dès le diagnostic des clones ayant des propriétés de résistance au traitement²⁸. En revanche, ceux qui subissent une transformation histologique acquièrent des clones responsables de la transformation après le diagnostic, et ces clones sont rarement retrouvés à ce stade (dans moins d'1% des cellules)²⁸. Dans notre cohorte de 6 patients atteints de LF, nous possédons deux échantillons pairés (diagnostic/rechute). En complétant ces données avec des données publiques, il serait intéressant d'explorer l'évolution des signatures transcriptomiques identifiées par bulk RNA-seq entre ces deux points temporels. Cette démarche pourrait ainsi apporter des informations cruciales sur la dynamique transcriptionnelle associée à la progression du LF. Enfin, et compte-tenu de la complexité tumorale du LF, il serait intéressant d'utiliser les récentes avancées de la transcriptomique spatiale associée au single-cell RNA-seq afin d'étudier les communications cellule-cellule ainsi que l'architecture spatiale de la tumeur et de son microenvironnement

tumoral. Cet outil a d'abord trouvé une application plus répandue dans l'étude des tumeurs solides avant d'être récemment adopté pour les tumeurs hématologiques, en particulier pour les lymphomes à cellules B comme le LBDGC⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁸. Cette étude rapporte en effet l'utilisation d'un profilage spatiale dans les tumeurs de LBDGC ayant permis de caractériser au niveau biomoléculaire un sous-type de LBDGC non-classifié, avec un enrichissement de programmes moléculaires, régis par la signalisation du TNFR, ainsi que la surexpression de points de contrôle immunitaire inhibiteurs⁴⁰⁸. Ces résultats prometteurs pourraient ouvrir la voie à l'identification de déterminants biologiques et pronostiques dans tous les lymphomes à cellules B. Compte-tenu des résultats obtenus avec le modèle 3D organoïde, il serait particulièrement pertinent d'observer, chez des patients répondant ou ne répondant pas à l'immunochimiothérapie R-CHOP *in vivo*, des différences spatiales au niveau de l'interaction entre les cellules B tumorales de LF et les Tfh, mais également avec d'autres types cellulaires ou déterminants moléculaires potentiellement impliqués dans la résistance au traitement. Cette perspective nécessite cependant une maturation scientifique plus approfondie, des ressources biologiques supplémentaires, notamment en termes d'échantillons de patients, ainsi que davantage de ressources techniques.

Avec les moyens dont nous disposons actuellement, et au vu des résultats que nous avons obtenus grâce du modèle 3D organoïde, il serait intéressant d'interroger, à l'échelle transcriptomique, l'hétérogénéité que nous avons observé dans les réponses au R-CHOP en comparant les patients bons et mauvais répondeurs. De nombreuses études rapportent l'utilisation de cet outil dans les tumeurs solides afin d'identifier, par un profilage en série de tumeurs de patients, les mécanismes de résistance impliqués⁴⁰⁹⁻⁴¹¹. Une étude récente rapporte même l'établissement de PDO dérivés de cancer colorectal afin d'évaluer à l'échelle « single-cell » les mécanismes de résistance à l'oxaliplatine, un anticancéreux utilisé pour traiter le cancer du gros intestin⁴¹². Ils rapportent alors l'identification de plusieurs gènes susceptibles d'être liés à la résistance aux médicaments. Dans le domaine de l'hématologie, très peu d'études mentionnent l'utilisation du single-cell RNA-seq dans le but de comprendre les mécanismes de résistance associés aux médicaments anticancéreux. Néanmoins, il a récemment été rapporté l'identification d'une signature de 25 gènes dérivée des lymphocytes T CD8 en corrélation avec la résistance au traitement, en comparant l'ARN de patients atteints de LAM nouvellement diagnostiqués et de patients en rechute ou réfractaires au nivolumab et

à l'azacitidine (NCT02397720)⁴¹³. Ces derniers présentaient par ailleurs un degré d'expansion clonale plus important, associé à une différenciation terminale et à une expression plus élevée de la signature 25 gènes. Toujours dans la LAM, une autre étude rapporte l'identification d'une sous-population de cellules souches quiescentes impliquée dans la chimiorésistance ainsi que le mauvais pronostic chez les patients en rechute ou réfractaires au traitement⁴¹⁴. Il s'agirait en réalité d'une reprogrammation génétique des cellules souches progénitrices qui acquièrent un profil quiescent, caractérisé par la surexpression de CD52 et de la galectin-1, une molécule pro-survie dans la LAM. Dans le LF, rares sont les études qui rapportent des investigations similaires. Toutefois, notre équipe a très récemment mis en évidence, à l'échelle « single-cell » et grâce à un modèle de xéno greffe de cellules primaires de LF dans des embryons aviaires, une signature de 21 gènes surexprimée par les cellules tumorales après exposition au R-CHOP⁴⁰⁵. Parmi ces gènes, BAX, une protéine pro-apoptotique associée à BCL-2, agirait comme un effecteur de l'apoptose induite par l'immunochimiothérapie à la fois dans les embryons aviaires et *in vitro*. Dans notre étude, les données de ces patients bons répondeurs et mauvais répondeurs au R-CHOP ainsi que des données générées à partir de patients issus de notre propre cohorte, ont été exploré à l'échelle single-cell afin d'approfondir notre hypothèse selon laquelle les Tfh_s, et plus spécifiquement le signal CD40L, jouent un rôle dans la chimiorésistance des patients. Aucune corrélation n'a cependant été mise en évidence à l'aide de ces données. Il serait intéressant d'élucider cette question en utilisant notre modèle 3D d'organoïde dérivé de cellules de patients atteints de LF. En effet, après avoir cultivé les cellules primaires de patients dans le modèle organoïde, à la fois ceux qui répondent et ceux qui ne répondent pas au R-CHOP, et les avoir exposées au traitement pendant 16h, ces cellules pourraient être analysées à l'échelle « single-cell » afin de pouvoir comparer les gènes différentiellement exprimés entre la condition traitée et non traitée dans chaque groupe, mais également d'identifier à la fois une signature transcriptomique reflétant la résistance au traitement ainsi que des cibles potentielles pour l'établissement de nouvelles thérapies ciblées. Néanmoins, bien que cela aurait été particulièrement intéressant pour la communauté scientifique du LF, nous n'avons pas pu aller au bout de ces explorations en raison de la limite de temps imposée par la thèse.

Avantages et limites du modèle 3D organoïde

Les études ayant utilisé le modèle 3D organoïde ont obtenu des résultats avec un ensemencement cellulaire allant de 12×10^3 à 2×10^5 cellules par hydrogel^{193,199,308,379–381}. Ce point a représenté un avantage particulier pour notre étude sur le LF dans la mesure où après décongélation des biopsies, le nombre de cellules vivantes variait entre 5×10^5 et 10×10^6 , restreignant le nombre de conditions tests. Le modèle 3D organoïde se situe dans la limite par rapport au modèle de Wagar et al. qui requiert entre 2 à 6×10^6 cellules pour la formation de sphéroïdes³⁸⁰, au modèle de Faria et al. qui requiert 25×10^3 cellules primaires de LF pour former des sphéroïdes³⁷², et au modèle de Lamaison et al. qui n'a utilisé que 18 cellules primaires de LF pour former des sphéroïdes dans les microsphères d'alginate³⁷⁵, bien que cela ne suffise pas à représenter la complexité tumorale. Certains résultats que nous avons obtenus, notamment ceux en relation avec l'effet de l'anti-CD40L bloquant chez les patients qui ne répondent pas au R-CHOP, mériteraient d'être davantage approfondis en multipliant par exemple le nombre de patients. Par ailleurs, au vu des données de la littérature, il aurait été intéressant de tester l'antagoniste du CD40, le lucatumumab, afin d'éventuellement observer dans le modèle 3D organoïde une augmentation de la sensibilité au R-CHOP chez les patients mauvais répondeurs. Il serait également intéressant de faire du criblage simultané d'autres cytokines du microenvironnement tumoral, comme l'IL-21, VCAM-1, CXCL12 ou encore CCL2, afin d'une part i) ne plus fournir de signaux de survie aux cellules tumorales de LF et d'autre part ii) empêcher le recrutement de cellules pro-tumorales au sein de la niche. Dans notre étude, l'hydrogel a été fonctionnalisé avec le peptide ligand d'intégrine mimant VCAM-1. Or, il serait possible d'utiliser d'autres peptides ligands d'intégrines, comme par exemple le peptide RGD mimant la vitronectine et qui interagit avec les cellules B tumorales de LF en se liant à l'intégrine $\alpha 4 \beta 3$, ou encore le peptide GFOGER qui mime le collagène de type 1 et qui se lie à plusieurs dimères d'intégrine $\beta 1$ dont l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$, une intégrine identifiée comme un récepteur de la MEC pour les collagènes^{308,381,415}. Les résultats quant à la prédiction de la réponse thérapeutique à l'immunochimiothérapie auraient potentiellement été différents, notamment pour les 4 patients dont la réponse *in vivo* ne corrèle pas à ce que nous avons obtenus dans le modèle 3D organoïde. Par ailleurs, bien que la conception du modèle organoïde soit pertinente, la représentation de l'interaction FDCs/cellules B tumorales par le peptide REDV mimant VCAM-1 et par l'addition de BAFF soluble dans le milieu de culture ne reflète pas suffisamment la

complexité de la niche stromale *in vivo*. L'absence de FDCs, de FRCs, de cellules marginales réticulaires (probablement perdues au cours de la décongélation ou de la digestion des biopsies) mais également la perte très rapide des macrophages endogènes au cours de la culture dans le modèle 3D organoïde pourraient biaiser les résultats que nous avons obtenu et sous- ou surestimer la réponse des patients à la thérapie. Au vu des résultats que nous avons obtenus avec le R-CHOP, il serait intéressant d'étudier l'effet d'autres traitements anticancéreux, comme les anticorps bispécifiques CD3/CD20 comme le glofitamab, pour lesquels les essais cliniques dans les lymphomes B se multiplient⁴¹⁶. Il est cependant important de prendre en considération le fait que le modèle que nous rapportons ici est limité quant à l'évaluation d'inhibiteurs épigénétiques utilisés dans le LF. En effet, pour avoir un impact au niveau épigénétique, il semblerait que les temps d'expositions des cellules aux inhibiteurs épigénétiques soient plus longs. C'est en effet ce que montrent les études qui traitent les cellules avec l'inhibiteur d'*EZH2*, le tazemetostat, et qui observent des résultats après une incubation au contact des cellules pouvant aller jusqu'à 4 jours⁴¹⁷⁻⁴¹⁹. Or, avec notre modèle, les pourcentages de viabilité que nous obtenons après 3 jours de culture des cellules primaires de LF ne permettent pas de tester des inhibiteurs épigénétiques. Dans notre étude, le modèle 3D organoïde, tel qu'il a été conçu, est particulièrement adapté aux lymphomes dérivés du CG ou de pathologies en lien avec le CG. Ceci pourrait constituer une limite quant à son utilisation pour d'autres hémopathies, et nécessiter une optimisation et une adaptation du modèle. Enfin, l'une des principales limites de ce modèle réside dans son manque de spécificité quant à la prédiction de la réponse au traitement, notamment chez 4 patients sur 18. Bien qu'un éclaircissement approfondi de ce point soit nécessaire, nous pourrions supposer que des facteurs extrinsèques spécifiques à la tumeur, provenant de son microenvironnement tumoral et que nous n'avons pas pu restituer dans le modèle 3D organoïde, soient impliqués dans ce que nous avons observé. D'autres études, portant sur l'apport de facteurs supplémentaires au sein de la culture notamment issus de la composante stromale, sont nécessaires afin de confirmer ces hypothèses et d'évaluer leur rôle dans la résistance au traitement.

REFERENCES

1. Lymphome et facteurs de risque • Cancer Environnement. *Cancer Environnement*
<https://www.cancer-environnement.fr/fiches/cancers/lymphome/>.
2. Alaggio, R. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* **36**, 1720–1748 (2022).
3. Thandra, K. C. *et al.* Epidemiology of Non-Hodgkin’s Lymphoma. *Med Sci (Basel)* **9**, 5 (2021).
4. Laurent, C. *et al.* Impact of Expert Pathologic Review of Lymphoma Diagnosis: Study of Patients From the French Lymphopath Network. *J Clin Oncol* **35**, 2008–2017 (2017).
5. Linet, M. S. *et al.* Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for follicular lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr* **2014**, 26–40 (2014).
6. Swenson, W. T. *et al.* Improved survival of follicular lymphoma patients in the United States. *J. Clin. Oncol.* **23**, 5019–5026 (2005).
7. Fisher, R. I. *et al.* New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 8447–8452 (2005).
8. Jacobsen, E. Follicular lymphoma: 2023 update on diagnosis and management. *Am J Hematol* **97**, 1638–1651 (2022).
9. Gordon, M. J., Smith, M. R. & Nastoupil, L. J. Follicular lymphoma: The long and winding road leading to your cure? *Blood Rev* **57**, 100992 (2023).
10. Cahill, K. E. & Smith, S. M. Follicular Lymphoma: a Focus on Current and Emerging Therapies. *Oncology (Williston Park)* **36**, 97–106 (2022).
11. Huh, J. Epidemiologic overview of malignant lymphoma. *Korean J Hematol* **47**, 92–104 (2012).
12. SPF. Estimations nationales de l’incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 : étude à partir des registres des cancers du réseau

<https://www.santepubliquefrance.fr/notices/estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-metropolitaine-entre-1990-et-2018-etude-a-partir-des-registres-des>.

13. Clarke, C. A. *et al.* Lymphoid malignancies in U.S. Asians: incidence rate differences by birthplace and acculturation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20**, 1064–1077 (2011).
14. Carbone, A. *et al.* Follicular lymphoma. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 83 (2019).
15. Morton, L. M. *et al.* Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (interlymph). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 925–933 (2005).
16. Goldin, L. R., Björkholm, M., Kristinsson, S. Y., Turesson, I. & Landgren, O. Highly increased familial risks for specific lymphoma subtypes. *Br J Haematol* **146**, 91–94 (2009).
17. Skibola, C. F. *et al.* Genetic variants at 6p21.33 are associated with susceptibility to follicular lymphoma. *Nat Genet* **41**, 873–875 (2009).
18. Allen, C. D. C. *et al.* Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* **5**, 943–952 (2004).
19. Bonetti, P. *et al.* Deregulation of ETS1 and FLI1 contributes to the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **122**, 2233–2241 (2013).
20. Barsotti, A. M. *et al.* p53-Dependent induction of PVT1 and miR-1204. *J Biol Chem* **287**, 2509–2519 (2012).
21. Sarkozy, C. *et al.* Peripheral blood involvement in patients with follicular lymphoma: a rare disease manifestation associated with poor prognosis. *Br J Haematol* **164**, 659–667 (2014).

22. Federico, M. *et al.* Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J Clin Oncol* **27**, 4555–4562 (2009).
23. Solal-Celigny, P. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Curr Treat Options Oncol* **7**, 270–275 (2006).
24. Bachy, E. *et al.* A simplified scoring system in de novo follicular lymphoma treated initially with immunochemotherapy. *Blood* **132**, 49–58 (2018).
25. Pastore, A. *et al.* Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol* **16**, 1111–1122 (2015).
26. Huet, S. *et al.* A gene-expression profiling score for prediction of outcome in patients with follicular lymphoma: a retrospective training and validation analysis in three international cohorts. *Lancet Oncol.* **19**, 549–561 (2018).
27. Casulo, C. *et al.* Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2516–2522 (2015).
28. Kridel, R. *et al.* Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study. *PLoS Med* **13**, e1002197 (2016).
29. Casulo, C., Burack, W. R. & Friedberg, J. W. Transformed follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **125**, 40–47 (2015).
30. Andor, N. *et al.* Single-cell RNA-Seq of follicular lymphoma reveals malignant B-cell types and coexpression of T-cell immune checkpoints. *Blood* **133**, 1119–1129 (2019).

31. Zhang, A. W. *et al.* Probabilistic cell-type assignment of single-cell RNA-seq for tumor microenvironment profiling. *Nat Methods* **16**, 1007–1015 (2019).
32. Milpied, P. *et al.* Human germinal center transcriptional programs are de-synchronized in B cell lymphoma. *Nat. Immunol.* **19**, 1013–1024 (2018).
33. Roider, T. *et al.* Dissecting intratumour heterogeneity of nodal B-cell lymphomas at the transcriptional, genetic and drug-response levels. *Nat Cell Biol* **22**, 896–906 (2020).
34. Attaf, N. *et al.* Single-Cell RNA Sequencing Identifies a Pseudo-Immune Differentiation Axis As the Main Source of Functional Heterogeneity in Follicular Lymphoma B-Cells. *Blood* **134**, 548 (2019).
35. Lossos, I. S. & Gascoyne, R. D. Transformation of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* **24**, 147–163 (2011).
36. O’Shea, D. *et al.* The presence of TP53 mutation at diagnosis of follicular lymphoma identifies a high-risk group of patients with shortened time to disease progression and poorer overall survival. *Blood* **112**, 3126–3129 (2008).
37. Aukema, S. M. *et al.* MYC expression and translocation analyses in low-grade and transformed follicular lymphoma. *Histopathology* **71**, 960–971 (2017).
38. Scherer, F. *et al.* Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* **8**, 364ra155 (2016).
39. Zhang, S. *et al.* Tracking the evolution of untreated high-intermediate/high-risk diffuse large B-cell lymphoma by circulating tumour DNA. *Br J Haematol* **196**, 617–628 (2022).
40. Dreyling, M. *et al.* Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **32**, 298–308 (2021).
41. Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375–2390 (2016).

42. Sujobert, P. & Salles, G. [Follicular lymphoma: An update]. *Presse Med* **48**, 850–858 (2019).
43. Khanlari, M. & Chapman, J. R. Follicular lymphoma: updates for pathologists. *J Pathol Transl Med* **56**, 1–15 (2022).
44. Alizadeh, A. A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503–511 (2000).
45. Victora, G. D. *et al.* Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood* **120**, 2240–2248 (2012).
46. Watanabe, T. The Tumor Microenvironment in Follicular Lymphoma: Its Pro-Malignancy Role with Therapeutic Potential. *Int J Mol Sci* **22**, 5352 (2021).
47. Choi, S. M., Betz, B. L. & Perry, A. M. Follicular Lymphoma Diagnostic Caveats and Updates. *Arch Pathol Lab Med* **142**, 1330–1340 (2018).
48. Schmidt, J. *et al.* CREBBP gene mutations are frequently detected in in situ follicular neoplasia. *Blood* **132**, 2687–2690 (2018).
49. Jegalian, A. G. *et al.* Follicular lymphoma in situ: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma. *Blood* **118**, 2976–2984 (2011).
50. Marks, E. & Shi, Y. Duodenal-Type Follicular Lymphoma: A Clinicopathologic Review. *Arch Pathol Lab Med* **142**, 542–547 (2018).
51. Agrawal, R. & Wang, J. Pediatric follicular lymphoma: a rare clinicopathologic entity. *Arch Pathol Lab Med* **133**, 142–146 (2009).
52. Schmidt, J. *et al.* Mutations of MAP2K1 are frequent in pediatric-type follicular lymphoma and result in ERK pathway activation. *Blood* **130**, 323–327 (2017).
53. Sarkozy, C. & Salles, G. Treatment approaches to asymptomatic follicular lymphoma. *Expert Rev Hematol* **6**, 747–758 (2013).

54. Guadagnolo, B. A. *et al.* Long-term outcome and mortality trends in early-stage, Grade 1-2 follicular lymphoma treated with radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **64**, 928–934 (2006).
55. Friedberg, J. W. *et al.* Effectiveness of first-line management strategies for stage I follicular lymphoma: analysis of the National LymphoCare Study. *J Clin Oncol* **30**, 3368–3375 (2012).
56. Brice, P. *et al.* Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: a randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* **15**, 1110–1117 (1997).
57. Ardeschna, K. M. *et al.* Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial. *Lancet* **362**, 516–522 (2003).
58. Ardeschna, K. M. *et al.* Rituximab versus a watch-and-wait approach in patients with advanced-stage, asymptomatic, non-bulky follicular lymphoma: an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* **15**, 424–435 (2014).
59. Hiddemann, W. *et al.* Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* **106**, 3725–3732 (2005).
60. Herold, M. *et al.* Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in

- patients with advanced follicular lymphoma: an East German Study Group Hematology and Oncology Study. *J Clin Oncol* **25**, 1986–1992 (2007).
61. Marcus, R. *et al.* Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol* **26**, 4579–4586 (2008).
 62. Fowler, N. H. *et al.* Safety and activity of lenalidomide and rituximab in untreated indolent lymphoma: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **15**, 1311–1318 (2014).
 63. Martin, P. *et al.* A phase II trial of lenalidomide plus rituximab in previously untreated follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL): CALGB 50803 (Alliance). *Ann Oncol* **28**, 2806–2812 (2017).
 64. Morschhauser, F. *et al.* Rituximab plus Lenalidomide in Advanced Untreated Follicular Lymphoma. *N Engl J Med* **379**, 934–947 (2018).
 65. Gopal, A. K. *et al.* PI3K δ inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *N Engl J Med* **370**, 1008–1018 (2014).
 66. Dreyling, M. *et al.* Phase II study of copanlisib, a PI3K inhibitor, in relapsed or refractory, indolent or aggressive lymphoma. *Ann Oncol* **28**, 2169–2178 (2017).
 67. Flinn, I. W. *et al.* DYNAMO: A Phase II Study of Duvelisib (IPI-145) in Patients With Refractory Indolent Non-Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol* **37**, 912–922 (2019).
 68. Villa, D. *et al.* Favorable outcomes from allogeneic and autologous stem cell transplantation for patients with transformed nonfollicular indolent lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* **20**, 1813–1818 (2014).
 69. Julia, E. & Salles, G. EZH2 inhibition by tazemetostat: mechanisms of action, safety and efficacy in relapsed/refractory follicular lymphoma. *Future Oncol* **17**, 2127–2140 (2021).

70. Béguelin, W. *et al.* EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell* **23**, 677–692 (2013).
71. Budde, L. E. *et al.* Single-Agent Mosunetuzumab Shows Durable Complete Responses in Patients With Relapsed or Refractory B-Cell Lymphomas: Phase I Dose-Escalation Study. *J Clin Oncol* **40**, 481–491 (2022).
72. Jacobson, C. A. *et al.* Axicabtagene ciloleucel in relapsed or refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (ZUMA-5): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **23**, 91–103 (2022).
73. Fowler, N. H. *et al.* Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory follicular lymphoma: the phase 2 ELARA trial. *Nat Med* **28**, 325–332 (2022).
74. Kenneth, M. & Casey, W. *Janeway's Immunobiology*. (2017).
75. Sambandam, A. *et al.* Progenitor migration to the thymus and T cell lineage commitment. *Immunol Res* **42**, 65–74 (2008).
76. Zehentmeier, S. & Pereira, J. P. Cell circuits and niches controlling B cell development. *Immunol Rev* **289**, 142–157 (2019).
77. Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* **131**, 959–971 (2013).
78. Cooper, M. D. The early history of B cells. *Nat Rev Immunol* **15**, 191–197 (2015).
79. Lee, S., Ko, Y. & Kim, T. J. Homeostasis and regulation of autoreactive B cells. *Cell Mol Immunol* **17**, 561–569 (2020).
80. Pillai, S. & Cariappa, A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* **9**, 767–777 (2009).
81. Batista, F. D. & Harwood, N. E. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* **9**, 15–27 (2009).

82. Ward, J. M., Cherian, S. & Linden, M. A. 19 - Hematopoietic and Lymphoid Tissues. in *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)* (eds. Treuting, P. M., Dintzis, S. M. & Montine, K. S.) 365–401 (Academic Press, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-802900-8.00019-1.
83. Yu, K. AID function in somatic hypermutation and class switch recombination. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **54**, 759–766 (2022).
84. Del Pozo-Yauner, L. *et al.* Role of the mechanisms for antibody repertoire diversification in monoclonal light chain deposition disorders: when a friend becomes foe. *Front Immunol* **14**, 1203425 (2023).
85. Fuleihan, R. L. The hyper IgM syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep* **1**, 445–450 (2001).
86. Roco, J. A. *et al.* Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity* **51**, 337-350.e7 (2019).
87. King, H. W. *et al.* Single-cell analysis of human B cell maturation predicts how antibody class switching shapes selection dynamics. *Sci Immunol* **6**, (2021).
88. Holmes, A. B. *et al.* Single-cell analysis of germinal-center B cells informs on lymphoma cell of origin and outcome. *J Exp Med* **217**, e20200483 (2020).
89. Calado, D. P. *et al.* The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nat Immunol* **13**, 1092–1100 (2012).
90. Dominguez-Sola, D. *et al.* The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat Immunol* **13**, 1083–1091 (2012).
91. Soucek, L. *et al.* Omomyc, a potential Myc dominant negative, enhances Myc-induced apoptosis. *Cancer Res* **62**, 3507–3510 (2002).
92. Fukuda, T. *et al.* Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med* **186**, 439–448 (1997).

93. Shaffer, A. L. *et al.* BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* **13**, 199–212 (2000).
94. Klein, U. & Dalla-Favera, R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 22–33 (2008).
95. Phan, R. T., Saito, M., Kitagawa, Y., Means, A. R. & Dalla-Favera, R. Genotoxic stress regulates expression of the proto-oncogene Bcl6 in germinal center B cells. *Nat Immunol* **8**, 1132–1139 (2007).
96. Peperzak, V., Vikstrom, I. B. & Tarlinton, D. M. Through a glass less darkly: apoptosis and the germinal center response to antigen. *Immunol Rev* **247**, 93–106 (2012).
97. Peña-Blanco, A. & García-Sáez, A. J. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J* **285**, 416–431 (2018).
98. Kometani, K. *et al.* Repression of the transcription factor Bach2 contributes to predisposition of IgG1 memory B cells toward plasma cell differentiation. *Immunity* **39**, 136–147 (2013).
99. Tamahara, T. *et al.* The mTOR-Bach2 Cascade Controls Cell Cycle and Class Switch Recombination during B Cell Differentiation. *Mol Cell Biol* **37**, e00418-17 (2017).
100. Basso, K. & Dalla-Favera, R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 172–184 (2015).
101. Laidlaw, B. J. & Cyster, J. G. Transcriptional regulation of memory B cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **21**, 209–220 (2021).
102. Cui, X. *et al.* Both CpG methylation and activation-induced deaminase are required for the fragility of the human bcl-2 major breakpoint region: implications for the timing of the breaks in the t(14;18) translocation. *Mol Cell Biol* **33**, 947–957 (2013).

103. Warren, C. F. A., Wong-Brown, M. W. & Bowden, N. A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis* **10**, 177 (2019).
104. Roulland, S. *et al.* BCL-2/JH translocation in peripheral blood lymphocytes of unexposed individuals: lack of seasonal variations in frequency and molecular features. *Int J Cancer* **104**, 695–698 (2003).
105. Schüler, F. *et al.* Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. *Int J Cancer* **124**, 958–963 (2009).
106. Roulland, S. *et al.* Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. *Adv Immunol* **111**, 1–46 (2011).
107. Roulland, S. *et al.* Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med* **203**, 2425–2431 (2006).
108. Sungalee, S. *et al.* Germinal center reentries of BCL2-overexpressing B cells drive follicular lymphoma progression. *J. Clin. Invest.* **124**, 5337–5351 (2014).
109. Tellier, J. *et al.* Human t(14;18)positive germinal center B cells: a new step in follicular lymphoma pathogenesis? *Blood* **123**, 3462–3465 (2014).
110. Amin, R. *et al.* DC-SIGN-expressing macrophages trigger activation of mannosylated IgM B-cell receptor in follicular lymphoma. *Blood* **126**, 1911–1920 (2015).
111. Linley, A. *et al.* Lectin binding to surface Ig variable regions provides a universal persistent activating signal for follicular lymphoma cells. *Blood* **126**, 1902–1910 (2015).
112. Loeffler, M. *et al.* Genomic and epigenomic co-evolution in follicular lymphomas. *Leukemia* **29**, 456–463 (2015).
113. Lackraj, T., Goswami, R. & Kridel, R. Pathogenesis of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* **31**, 2–14 (2018).

114. Jardin, F. *et al.* Follicular lymphoma without t(14;18) and with BCL-6 rearrangement: a lymphoma subtype with distinct pathological, molecular and clinical characteristics. *Leukemia* **16**, 2309–2317 (2002).
115. Díaz-Alderete, A. *et al.* Frequency of BCL2 and BCL6 translocations in follicular lymphoma: relation with histological and clinical features. *Leuk Lymphoma* **49**, 95–101 (2008).
116. Bosga-Bouwer, A. G. *et al.* Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive. *Blood* **101**, 1149–1154 (2003).
117. Akasaka, T., Lossos, I. S. & Levy, R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood* **102**, 1443–1448 (2003).
118. Kridel, R. *et al.* Cell of origin of transformed follicular lymphoma. *Blood* **126**, 2118–2127 (2015).
119. Pasqualucci, L. *et al.* Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* **471**, 189–195 (2011).
120. Araf, S., Okosun, J., Koniali, L., Fitzgibbon, J. & Heward, J. Epigenetic dysregulation in follicular lymphoma. *Epigenomics* **8**, 77–84 (2016).
121. Green, M. R. Chromatin modifying gene mutations in follicular lymphoma. *Blood* **131**, 595–604 (2018).
122. Meyer, S. N. *et al.* Unique and Shared Epigenetic Programs of the CREBBP and EP300 Acetyltransferases in Germinal Center B Cells Reveal Targetable Dependencies in Lymphoma. *Immunity* **51**, 535-547.e9 (2019).

123. Green, M. R. *et al.* Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E1116–E1125 (2015).
124. Mondello, P. *et al.* Selective Inhibition of HDAC3 Targets Synthetic Vulnerabilities and Activates Immune Surveillance in Lymphoma. *Cancer Discov* **10**, 440–459 (2020).
125. Froimchuk, E., Jang, Y. & Ge, K. Histone H3 lysine 4 methyltransferase KMT2D. *Gene* **627**, 337–342 (2017).
126. Ford, D. J. & Dingwall, A. K. The cancer COMPASS: navigating the functions of MLL complexes in cancer. *Cancer Genet* **208**, 178–191 (2015).
127. Zhang, J. *et al.* Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat Med* **21**, 1190–1198 (2015).
128. Ortega-Molina, A. *et al.* The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nat Med* **21**, 1199–1208 (2015).
129. Velichutina, I. *et al.* EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood* **116**, 5247–5255 (2010).
130. Raaphorst, F. M. *et al.* Cutting edge: polycomb gene expression patterns reflect distinct B cell differentiation stages in human germinal centers. *J Immunol* **164**, 1–4 (2000).
131. Souroullas, G. P. *et al.* An oncogenic Ezh2 mutation induces tumors through global redistribution of histone 3 lysine 27 trimethylation. *Nat Med* **22**, 632–640 (2016).
132. Béguelin, W. *et al.* EZH2 enables germinal centre formation through epigenetic silencing of CDKN1A and an Rb-E2F1 feedback loop. *Nat Commun* **8**, 877 (2017).
133. Yap, D. B. *et al.* Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood* **117**, 2451–2459 (2011).

134. Donaldson-Collier, M. C. *et al.* EZH2 oncogenic mutations drive epigenetic, transcriptional, and structural changes within chromatin domains. *Nat Genet* **51**, 517–528 (2019).
135. Oricchio, E. *et al.* Genetic and epigenetic inactivation of SESTRIN1 controls mTORC1 and response to EZH2 inhibition in follicular lymphoma. *Sci Transl Med* **9**, eaak9969 (2017).
136. Dansen, T. B. & Burgering, B. M. T. Unravelling the tumor-suppressive functions of FOXO proteins. *Trends Cell Biol* **18**, 421–429 (2008).
137. Ennishi, D. *et al.* Molecular and Genetic Characterization of MHC Deficiency Identifies EZH2 as Therapeutic Target for Enhancing Immune Recognition. *Cancer Discov* **9**, 546–563 (2019).
138. Okosun, J. *et al.* Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat. Genet.* **46**, 176–181 (2014).
139. Pasqualucci, L. *et al.* Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep* **6**, 130–140 (2014).
140. Weigert, O. & Weinstock, D. M. The evolving contribution of hematopoietic progenitor cells to lymphomagenesis. *Blood* **120**, 2553–2561 (2012).
141. Horton, S. J. *et al.* Early loss of Crebbp confers malignant stem cell properties on lymphoid progenitors. *Nat Cell Biol* **19**, 1093–1104 (2017).
142. Haebe, S. *et al.* The molecular ontogeny of follicular lymphoma: gene mutations succeeding the BCL2 translocation define common precursor cells. *Br J Haematol* **196**, 1381–1387 (2022).

143. Goval, J.-J. *et al.* The prevention of spontaneous apoptosis of follicular lymphoma B cells by a follicular dendritic cell line: involvement of caspase-3, caspase-8 and c-FLIP. *Haematologica* **93**, 1169–1177 (2008).
144. Sangaletti, S. *et al.* Stromal niche communalities underscore the contribution of the matricellular protein SPARC to B-cell development and lymphoid malignancies. *Oncoimmunology* **3**, e28989 (2014).
145. Vega, F. *et al.* The stromal composition of malignant lymphoid aggregates in bone marrow: variations in architecture and phenotype in different B-cell tumours. *Br J Haematol* **117**, 569–576 (2002).
146. Wahlin, B. E. *et al.* Entourage: the immune microenvironment following follicular lymphoma. *Blood Cancer J* **2**, e52 (2012).
147. Kastenmüller, W., Torabi-Parizi, P., Subramanian, N., Lämmermann, T. & Germain, R. N. A spatially-organized multicellular innate immune response in lymph nodes limits systemic pathogen spread. *Cell* **150**, 1235–1248 (2012).
148. Laurent, C. *et al.* Distribution, function, and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue-imaging study. *Blood* **118**, 5371–5379 (2011).
149. Battella, S., Cox, M. C., Santoni, A. & Palmieri, G. Natural killer (NK) cells and anti-tumor therapeutic mAb: unexplored interactions. *J Leukoc Biol* **99**, 87–96 (2016).
150. He, L. *et al.* Low natural killer (NK) cell counts in peripheral blood adversely affect clinical outcome of patients with follicular lymphoma. *Blood Cancer J* **6**, e457 (2016).
151. Braza, M. S. *et al.* gammadelta T lymphocytes count is normal and expandable in peripheral blood of patients with follicular lymphoma, whereas it is decreased in tumor lymph nodes compared with inflammatory lymph nodes. *J Immunol* **184**, 134–140 (2010).

152. Tosolini, M. *et al.* Assessment of tumor-infiltrating TCRV γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *Oncoimmunology* **6**, e1284723 (2017).
153. Rossi, C. *et al.* Boosting $\gamma\delta$ T cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by PD-1 blockade in follicular lymphoma. *Oncoimmunology* **8**, 1554175 (2019).
154. Braza, M. S., Klein, B., Fiol, G. & Rossi, J.-F. $\gamma\delta$ T-cell killing of primary follicular lymphoma cells is dramatically potentiated by GA101, a type II glycoengineered anti-CD20 monoclonal antibody. *Haematologica* **96**, 400–407 (2011).
155. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**, 549–555 (2002).
156. Xue, J. *et al.* Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* **40**, 274–288 (2014).
157. Molawi, K. & Sieweke, M. H. Transcriptional control of macrophage identity, self-renewal, and function. *Adv Immunol* **120**, 269–300 (2013).
158. Gong, D. *et al.* TGF β signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunol* **13**, 31 (2012).
159. Sangaletti, S. *et al.* Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis. *Cancer Res* **68**, 9050–9059 (2008).
160. Ramsay, A. G. *et al.* Follicular lymphoma cells induce T-cell immunologic synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. *Blood* **114**, 4713–4720 (2009).
161. Yang, Z.-Z. *et al.* IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest* **122**, 1271–1282 (2012).

162. Germain, C. *et al.* Lectin-like transcript 1 is a marker of germinal center-derived B-cell non-Hodgkin's lymphomas dampening natural killer cell functions. *Oncoimmunology* **4**, e1026503 (2015).
163. Gertner-Dardenne, J. *et al.* The co-receptor BTLA negatively regulates human V γ 9V δ 2 T-cell proliferation: a potential way of immune escape for lymphoma cells. *Blood* **122**, 922–931 (2013).
164. Boice, M. *et al.* Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell* **167**, 405-418.e13 (2016).
165. Pangault, C. *et al.* Follicular lymphoma cell niche: identification of a preeminent IL-4-dependent T(FH)-B cell axis. *Leukemia* **24**, 2080–2089 (2010).
166. Rawal, S. *et al.* Cross talk between follicular Th cells and tumor cells in human follicular lymphoma promotes immune evasion in the tumor microenvironment. *J Immunol* **190**, 6681–6693 (2013).
167. Yang, Z.-Z., Novak, A. J., Ziesmer, S. C., Witzig, T. E. & Ansell, S. M. Attenuation of CD8(+) T-cell function by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* **66**, 10145–10152 (2006).
168. Yildiz, M. *et al.* Activating STAT6 mutations in follicular lymphoma. *Blood* **125**, 668–679 (2015).
169. Epron, G. *et al.* Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. *Leukemia* **26**, 139–148 (2012).
170. Pandey, S. *et al.* IL-4/CXCL12 loop is a key regulator of lymphoid stroma function in follicular lymphoma. *Blood* **129**, 2507–2518 (2017).
171. Sacedón, R. *et al.* Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis. *J Immunol* **174**, 1456–1461 (2005).

172. Munoz, O. *et al.* TGFbeta-mediated activation of Smad1 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma and effect on cell proliferation. *Leukemia* **18**, 2015–2025 (2004).
173. Schiemann, B. *et al.* An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* **293**, 2111–2114 (2001).
174. Mraz, M. *et al.* Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin α -4- β -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol* **155**, 53–64 (2011).
175. Grégoire, M. *et al.* Neutrophils trigger a NF- κ B dependent polarization of tumor-supportive stromal cells in germinal center B-cell lymphomas. *Oncotarget* **6**, 16471–16487 (2015).
176. Guilloton, F. *et al.* Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood* **119**, 2556–2567 (2012).
177. Aung, T. *et al.* Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 15336–15341 (2011).
178. Weissmann, M. *et al.* Heparanase-neutralizing antibodies attenuate lymphoma tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 704–709 (2016).
179. Sangaletti, S. *et al.* Stromal niche communalities underscore the contribution of the matricellular protein SPARC to B-cell development and lymphoid malignancies. *Oncoimmunology* **3**, e28989 (2014).
180. Astarita, J. L. *et al.* The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol* **16**, 75–84 (2015).

181. Ferlay, J. *et al.* Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* (2021) doi:10.1002/ijc.33588.
182. Pickl, M. & Ries, C. H. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene* **28**, 461–468 (2009).
183. Riedl, A. *et al.* Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. *J Cell Sci* **130**, 203–218 (2017).
184. Ekert, J. E. *et al.* Three-dimensional lung tumor microenvironment modulates therapeutic compound responsiveness in vitro—implication for drug development. *PLoS One* **9**, e92248 (2014).
185. Barbosa, M. A. G., Xavier, C. P. R., Pereira, R. F., Petrikaitė, V. & Vasconcelos, M. H. 3D Cell Culture Models as Recapitulators of the Tumor Microenvironment for the Screening of Anti-Cancer Drugs. *Cancers (Basel)* **14**, 190 (2021).
186. Hynds, R. E., Vladimirou, E. & Janes, S. M. The secret lives of cancer cell lines. *Dis Model Mech* **11**, dmm037366 (2018).
187. Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H. & Gelber, C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques* **43**, 575, 577–578, 581–582 passim (2007).
188. Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H. & Xu, X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncol Lett* **14**, 6999–7010 (2017).
189. Langhans, S. A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol* **9**, 6 (2018).

190. Kaur, G., Evans, D. M., Teicher, B. A. & Coussens, N. P. Complex Tumor Spheroids, a Tissue-Mimicking Tumor Model, for Drug Discovery and Precision Medicine. *SLAS Discov* **26**, 1298–1314 (2021).
191. Rodrigues, J., Heinrich, M. A., Teixeira, L. M. & Prakash, J. 3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor-Stroma Interactions. *Trends Cancer* **7**, 249–264 (2021).
192. Mo, X. *et al.* HTiP: High-Throughput Immunomodulator Phenotypic Screening Platform to Reveal IAP Antagonists as Anti-cancer Immune Enhancers. *Cell Chem Biol* **26**, 331-339.e3 (2019).
193. Tian, Y. F. *et al.* Integrin-specific hydrogels as adaptable tumor organoids for malignant B and T cells. *Biomaterials* **73**, 110–119 (2015).
194. Sapudom, J. *et al.* Dendritic cell immune potency on 2D and in 3D collagen matrices. *Biomater Sci* **8**, 5106–5120 (2020).
195. Westerhuis, B. *et al.* Specific memory B cell response in humans upon infection with highly pathogenic H7N7 avian influenza virus. *Sci Rep* **10**, 3152 (2020).
196. Marsman, C. *et al.* Optimized Protocols for In-Vitro T-Cell-Dependent and T-Cell-Independent Activation for B-Cell Differentiation Studies Using Limited Cells. *Front Immunol* **13**, 815449 (2022).
197. Jourdan, M. *et al.* An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood* **114**, 5173–5181 (2009).
198. Jourdan, M. *et al.* IL-6 supports the generation of human long-lived plasma cells in combination with either APRIL or stromal cell-soluble factors. *Leukemia* **28**, 1647–1656 (2014).

199. Braham, M. V. J. *et al.* A synthetic human 3D in vitro lymphoid model enhancing B-cell survival and functional differentiation. *iScience* **26**, 105741 (2023).
200. Sung, P.-J. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Produce Netrin-1 to Control Cancer Cell Plasticity. *Cancer Res* **79**, 3651–3661 (2019).
201. Deaglio, S. & Malavasi, F. Chronic lymphocytic leukemia microenvironment: shifting the balance from apoptosis to proliferation. *Haematologica* **94**, 752–756 (2009).
202. Burger, J. A., Ghia, P., Rosenwald, A. & Caligaris-Cappio, F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* **114**, 3367–3375 (2009).
203. Foxall, R. *et al.* Developing a 3D B Cell Lymphoma Culture System to Model Antibody Therapy. *Front Immunol* **11**, 605231 (2020).
204. Eray, M. *et al.* Follicular lymphoma cell lines, an in vitro model for antigenic selection and cytokine-mediated growth regulation of germinal centre B cells. *Scand J Immunol* **57**, 545–555 (2003).
205. de Toter, D. *et al.* Heterogeneous expression and function of IL-21R and susceptibility to IL-21-mediated apoptosis in follicular lymphoma cells. *Exp Hematol* **38**, 373–383 (2010).
206. Park, C.-S., Yoon, S.-O., Armitage, R. J. & Choi, Y. S. Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *J Immunol* **173**, 6676–6683 (2004).
207. Stonier, S. W. & Schluns, K. S. Trans-presentation: a novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunol Lett* **127**, 85–92 (2010).
208. Tamzalit, F. *et al.* IL-15/IL-15R α complex shedding following trans-presentation is essential for the survival of IL-15 responding NK and T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 8565–8570 (2014).

209. Namdari, R. *et al.* Species selection for nonclinical safety assessment of drug candidates: Examples of current industry practice. *Regul Toxicol Pharmacol* **126**, 105029 (2021).
210. EMA. ICH S9 Non-clinical evaluation for anticancer pharmaceuticals - Scientific guideline. *European Medicines Agency* <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s9-non-clinical-evaluation-anticancer-pharmaceuticals-scientific-guideline> (2018).
211. Mouse Genome Sequencing Consortium *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520–562 (2002).
212. Olson, B., Li, Y., Lin, Y., Liu, E. T. & Patnaik, A. Mouse Models for Cancer Immunotherapy Research. *Cancer Discov* **8**, 1358–1365 (2018).
213. Uno, T. *et al.* Eradication of established tumors in mice by a combination antibody-based therapy. *Nat Med* **12**, 693–698 (2006).
214. Zeng, Z. *et al.* TISMO: syngeneic mouse tumor database to model tumor immunity and immunotherapy response. *Nucleic Acids Res* **50**, D1391–D1397 (2022).
215. Sharpless, N. E. & Depinho, R. A. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 741–754 (2006).
216. Harris, A. W. *et al.* The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. *J Exp Med* **167**, 353–371 (1988).
217. Pechloff, K. *et al.* The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *J Exp Med* **207**, 1031–1044 (2010).
218. Aubrey, B. J. *et al.* An inducible lentiviral guide RNA platform enables the identification of tumor-essential genes and tumor-promoting mutations in vivo. *Cell Rep* **10**, 1422–1432 (2015).

219. Yen, J. *et al.* The genetic heterogeneity and mutational burden of engineered melanomas in zebrafish models. *Genome Biol* **14**, R113 (2013).
220. McFadden, D. G. *et al.* Mutational landscape of EGFR-, MYC-, and Kras-driven genetically engineered mouse models of lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E6409–E6417 (2016).
221. Sharpless, N. E., Kannan, K., Xu, J., Bosenberg, M. W. & Chin, L. Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene* **22**, 5055–5059 (2003).
222. Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/9353252/>.
223. Bardeesy, N. *et al.* Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. *Mol Cell Biol* **21**, 2144–2153 (2001).
224. Pajot, A. *et al.* A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice. *Eur J Immunol* **34**, 3060–3069 (2004).
225. Collins, A. T. & Lang, S. H. A systematic review of the validity of patient derived xenograft (PDX) models: the implications for translational research and personalised medicine. *PeerJ* **6**, e5981 (2018).
226. Abdolahi, S. *et al.* Patient-derived xenograft (PDX) models, applications and challenges in cancer research. *J Transl Med* **20**, 206 (2022).
227. Thompson, S. B. *et al.* The Formin mDia1 Regulates Acute Lymphoblastic Leukemia Engraftment, Migration, and Progression in vivo. *Front Oncol* **8**, 389 (2018).
228. Noble, J. N. & Mishra, A. Development and Significance of Mouse Models in Lymphoma Research. *Curr Hematol Malig Rep* **14**, 119–126 (2019).

229. Townsend, E. C. *et al.* The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice. *Cancer Cell* **29**, 574–586 (2016).
230. Jin, K. *et al.* Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review. *Clin Transl Oncol* **12**, 473–480 (2010).
231. Fujiwara, S. Humanized mice: A brief overview on their diverse applications in biomedical research. *J Cell Physiol* **233**, 2889–2901 (2018).
232. Romero-Masters, J. C. *et al.* An EBNA3C-deleted Epstein-Barr virus (EBV) mutant causes B-cell lymphomas with delayed onset in a cord blood-humanized mouse model. *PLoS Pathog* **14**, e1007221 (2018).
233. Ma, S.-D. *et al.* Latent Membrane Protein 1 (LMP1) and LMP2A Collaborate To Promote Epstein-Barr Virus-Induced B Cell Lymphomas in a Cord Blood-Humanized Mouse Model but Are Not Essential. *J Virol* **91**, e01928-16 (2017).
234. Liu, W. N. *et al.* Establishment and Characterization of Humanized Mouse NPC-PDX Model for Testing Immunotherapy. *Cancers (Basel)* **12**, 1025 (2020).
235. Egle, A., Harris, A. W., Bath, M. L., O'Reilly, L. & Cory, S. VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood* **103**, 2276–2283 (2004).
236. Van Norman, G. A. Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Is it Time to Rethink Our Current Approach? *JACC Basic Transl Sci* **4**, 845–854 (2019).
237. Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F. & Delort, L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci* **22**, 12200 (2021).
238. Mabry, K. M., Payne, S. Z. & Anseth, K. S. Microarray analyses to quantify advantages of 2D and 3D hydrogel culture systems in maintaining the native valvular interstitial cell phenotype. *Biomaterials* **74**, 31–41 (2016).

239. Kapałczyńska, M. *et al.* 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* **14**, 910–919 (2018).
240. Melissaridou, S. *et al.* The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell Int* **19**, 16 (2019).
241. Zhou, J., Su, J., Fu, X., Zheng, L. & Yin, Z. Microfluidic device for primary tumor spheroid isolation. *Exp Hematol Oncol* **6**, 22 (2017).
242. Wilson, H. V. A NEW METHOD BY WHICH SPONGES MAY BE ARTIFICIALLY REARED. *Science* **25**, 912–915 (1907).
243. Weiss, P. & Taylor, A. C. RECONSTITUTION OF COMPLETE ORGANS FROM SINGLE-CELL SUSPENSIONS OF CHICK EMBRYOS IN ADVANCED STAGES OF DIFFERENTIATION. *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**, 1177–1185 (1960).
244. Evans, M. Origin of mouse embryonal carcinoma cells and the possibility of their direct isolation into tissue culture. *J Reprod Fertil* **62**, 625–631 (1981).
245. Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7634–7638 (1981).
246. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).
247. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
248. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–1920 (2007).
249. Mebarki, M., Bennaceur, A. & Bonhomme-Faivre, L. Human-cell-derived organoids as a new ex vivo model for drug assays in oncology. *Drug Discov Today* **23**, 857–863 (2018).

250. Lancaster, M. A. & Knoblich, J. A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* **345**, 1247125 (2014).
251. Saxén, L. & Lehtonen, E. Embryonic kidney in organ culture. *Differentiation* **36**, 2–11 (1987).
252. van den Berg, C. W. *et al.* Renal Subcapsular Transplantation of PSC-Derived Kidney Organoids Induces Neo-vasculogenesis and Significant Glomerular and Tubular Maturation In Vivo. *Stem Cell Reports* **10**, 751–765 (2018).
253. Li, M. L. *et al.* Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 136–140 (1987).
254. Shannon, J. M., Mason, R. J. & Jennings, S. D. Functional differentiation of alveolar type II epithelial cells in vitro: effects of cell shape, cell-matrix interactions and cell-cell interactions. *Biochim Biophys Acta* **931**, 143–156 (1987).
255. Eiraku, M. *et al.* Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* **3**, 519–532 (2008).
256. Sato, T. *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262–265 (2009).
257. Lancaster, M. A. *et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501**, 373–379 (2013).
258. Karthaus, W. R. *et al.* Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell* **159**, 163–175 (2014).
259. Lee, J.-H. *et al.* Lung stem cell differentiation in mice directed by endothelial cells via a BMP4-NFATc1-thrombospondin-1 axis. *Cell* **156**, 440–455 (2014).

260. Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S. & Searson, P. C. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front Bioeng Biotechnol* **4**, 12 (2016).
261. Decaup, E. *et al.* A Tridimensional Model for NK Cell-Mediated ADCC of Follicular Lymphoma. *Front Immunol* **10**, 1943 (2019).
262. Groebe, K. & Mueller-Klieser, W. Distributions of oxygen, nutrient, and metabolic waste concentrations in multicellular spheroids and their dependence on spheroid parameters. *Eur Biophys J* **19**, 169–181 (1991).
263. Hirschhaeuser, F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* **148**, 3–15 (2010).
264. Dini, S. *et al.* Identifying the necrotic zone boundary in tumour spheroids with pair-correlation functions. *J R Soc Interface* **13**, 20160649 (2016).
265. Sutherland, R. M., Inch, W. R., McCredie, J. A. & Kruuv, J. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **18**, 491–495 (1970).
266. Nunes, A. S., Barros, A. S., Costa, E. C., Moreira, A. F. & Correia, I. J. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnol Bioeng* **116**, 206–226 (2019).
267. Yuhas, J. M., Li, A. P., Martinez, A. O. & Ladman, A. J. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* **37**, 3639–3643 (1977).
268. Dangles-Marie, V. *et al.* Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: comparison of success rate and cell line features. *Cancer Res* **67**, 398–407 (2007).

269. Vinci, M. *et al.* Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol* **10**, 29 (2012).
270. Kelm, J. M., Timmins, N. E., Brown, C. J., Fussenegger, M. & Nielsen, L. K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* **83**, 173–180 (2003).
271. Decaup, E. *et al.* Anti-tumor activity of obinutuzumab and rituximab in a follicular lymphoma 3D model. *Blood Cancer J* **3**, e131 (2013).
272. Gava, F. *et al.* 3D Model Characterization by 2D and 3D Imaging in t(14;18)-Positive B-NHL: Perspectives for In Vitro Drug Screens in Follicular Lymphoma. *Cancers (Basel)* **13**, (2021).
273. Duś-Szachniewicz, K., Gdesz-Birula, K. & Rymkiewicz, G. Development and Characterization of 3D Hybrid Spheroids for the Investigation of the Crosstalk Between B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas and Mesenchymal Stromal Cells. *Onco Targets Ther* **15**, 683–697 (2022).
274. Sakai, S., Ito, S. & Kawakami, K. Calcium alginate microcapsules with spherical liquid cores templated by gelatin microparticles for mass production of multicellular spheroids. *Acta Biomater* **6**, 3132–3137 (2010).
275. Sakai, S. *et al.* Multicellular tumor spheroid formation in duplex microcapsules for analysis of chemosensitivity. *Cancer Sci* **103**, 549–554 (2012).
276. Zhang, X. *et al.* Development of an in vitro multicellular tumor spheroid model using microencapsulation and its application in anticancer drug screening and testing. *Biotechnol Prog* **21**, 1289–1296 (2005).

277. Alessandri, K. *et al.* Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 14843–14848 (2013).
278. Singh, S. K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821–5828 (2003).
279. Ponti, D. *et al.* Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* **65**, 5506–5511 (2005).
280. Eramo, A. *et al.* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* **15**, 504–514 (2008).
281. Visvader, J. E. & Lindeman, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* **8**, 755–768 (2008).
282. Venkataraman, G. *et al.* Preferential self-association of basic fibroblast growth factor is stabilized by heparin during receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 845–850 (1996).
283. Smith, A. G. *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688–690 (1988).
284. Wright, L. S. *et al.* Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor. *J Neurochem* **86**, 179–195 (2003).
285. Rappa, G. *et al.* Growth of cancer cell lines under stem cell-like conditions has the potential to unveil therapeutic targets. *Exp Cell Res* **314**, 2110–2122 (2008).
286. Valent, P. *et al.* Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer* **12**, 767–775 (2012).
287. Singec, I. *et al.* Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat Methods* **3**, 801–806 (2006).

288. Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008).
289. Weiswald, L.-B. *et al.* Newly characterised ex vivo colospheres as a three-dimensional colon cancer cell model of tumour aggressiveness. *Br J Cancer* **101**, 473–482 (2009).
290. Alpaugh, M. L., Tomlinson, J. S., Shao, Z. M. & Barsky, S. H. A novel human xenograft model of inflammatory breast cancer. *Cancer Res* **59**, 5079–5084 (1999).
291. Theodoraki, M. A. *et al.* Spontaneously-forming spheroids as an in vitro cancer cell model for anticancer drug screening. *Oncotarget* **6**, 21255–21267 (2015).
292. Morales, J. & Alpaugh, M. L. Gain in cellular organization of inflammatory breast cancer: A 3D in vitro model that mimics the in vivo metastasis. *BMC Cancer* **9**, 462 (2009).
293. Weiswald, L.-B. *et al.* A short-term colorectal cancer sphere culture as a relevant tool for human cancer biology investigation. *Br J Cancer* **108**, 1720–1731 (2013).
294. Kenerson, H. L. *et al.* Tumor slice culture as a biologic surrogate of human cancer. *Ann Transl Med* **8**, 114 (2020).
295. Bjerkvig, R., Tønnesen, A., Laerum, O. D. & Backlund, E. O. Multicellular tumor spheroids from human gliomas maintained in organ culture. *J Neurosurg* **72**, 463–475 (1990).
296. Muthuswamy, R. *et al.* NF- κ B hyperactivation in tumor tissues allows tumor-selective reprogramming of the chemokine microenvironment to enhance the recruitment of cytolytic T effector cells. *Cancer Res* **72**, 3735–3743 (2012).
297. Rajcevic, U. *et al.* Colorectal cancer derived organotypic spheroids maintain essential tissue characteristics but adapt their metabolism in culture. *Proteome Sci* **12**, 39 (2014).
298. Sundlisaeter, E. *et al.* Primary glioma spheroids maintain tumorigenicity and essential phenotypic traits after cryopreservation. *Neuropathol Appl Neurobiol* **32**, 419–427 (2006).

299. Shin, H. S., An, H. Y., Choi, J. S., Kim, H. J. & Lim, J. Y. Organotypic Spheroid Culture to Mimic Radiation-Induced Salivary Hypofunction. *J Dent Res* **96**, 396–405 (2017).
300. Jenkins, R. W. *et al.* Ex Vivo Profiling of PD-1 Blockade Using Organotypic Tumor Spheroids. *Cancer Discov* **8**, 196–215 (2018).
301. Hong, H. K. *et al.* Establishment of patient-derived organotypic tumor spheroid models for tumor microenvironment modeling. *Cancer Med* **10**, 5589–5598 (2021).
302. Drost, J. & Clevers, H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer* **18**, 407–418 (2018).
303. Sachs, N. *et al.* A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* **172**, 373–386.e10 (2018).
304. Marshall, J. Transwell(®) invasion assays. *Methods Mol Biol* **769**, 97–110 (2011).
305. Kim, W. *et al.* Simplified in vitro 3D co-culture-based blood-brain barrier model using transwell. *Biochem Biophys Res Commun* **620**, 63–68 (2022).
306. Wang, Y. *et al.* In vitro 3D cocultured tumor-vascular barrier model based on alginate hydrogel and Transwell system for anti-cancer drug evaluation. *Tissue Cell* **76**, 101796 (2022).
307. Taubenberger, A. V. *et al.* 3D extracellular matrix interactions modulate tumour cell growth, invasion and angiogenesis in engineered tumour microenvironments. *Acta Biomater* **36**, 73–85 (2016).
308. Purwada, A. *et al.* Ex vivo synthetic immune tissues with T cell signals for differentiating antigen-specific, high affinity germinal center B cells. *Biomaterials* **198**, 27–36 (2019).
309. Driehuis, E., Kretzschmar, K. & Clevers, H. Establishment of patient-derived cancer organoids for drug-screening applications. *Nat Protoc* **15**, 3380–3409 (2020).
310. Kopper, O. *et al.* An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nat Med* **25**, 838–849 (2019).

311. Clinton, J. & McWilliams-Koeppen, P. Initiation, Expansion, and Cryopreservation of Human Primary Tissue-Derived Normal and Diseased Organoids in Embedded Three-Dimensional Culture. *Curr Protoc Cell Biol* **82**, e66 (2019).
312. Lu, P., Weaver, V. M. & Werb, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* **196**, 395–406 (2012).
313. Loessner, D., Holzapfel, B. M. & Clements, J. A. Engineered microenvironments provide new insights into ovarian and prostate cancer progression and drug responses. *Adv Drug Deliv Rev* **79–80**, 193–213 (2014).
314. Ott, H. C. *et al.* Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med* **16**, 927–933 (2010).
315. Pinto, M. L. *et al.* Decellularized human colorectal cancer matrices polarize macrophages towards an anti-inflammatory phenotype promoting cancer cell invasion via CCL18. *Biomaterials* **124**, 211–224 (2017).
316. Jacob, F. *et al.* A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell* **180**, 188-204.e22 (2020).
317. Neal, J. T. *et al.* Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell* **175**, 1972-1988.e16 (2018).
318. Hospodiuk, M., Dey, M., Sosnoski, D. & Ozbolat, I. T. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnol Adv* **35**, 217–239 (2017).
319. Gungor-Ozkerim, P. S., Inci, I., Zhang, Y. S., Khademhosseini, A. & Dokmeci, M. R. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomater Sci* **6**, 915–946 (2018).
320. Staros, R. *et al.* Perspectives for 3D-Bioprinting in Modeling of Tumor Immune Evasion. *Cancers (Basel)* **14**, 3126 (2022).

321. Moroni, L. *et al.* Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. *Nat Rev Mater* **3**, 21–37 (2018).
322. Xu, X., Zhao, J., Wang, M., Wang, L. & Yang, J. 3D Printed Polyvinyl Alcohol Tablets with Multiple Release Profiles. *Sci Rep* **9**, 12487 (2019).
323. Lee, J.-H. *et al.* Development of a heat labile antibiotic eluting 3D printed scaffold for the treatment of osteomyelitis. *Sci Rep* **10**, 7554 (2020).
324. Moon, S. *et al.* Layer by layer three-dimensional tissue epitaxy by cell-laden hydrogel droplets. *Tissue Eng Part C Methods* **16**, 157–166 (2010).
325. Kingsley, D. M., Dias, A. D., Chrisey, D. B. & Corr, D. T. Single-step laser-based fabrication and patterning of cell-encapsulated alginate microbeads. *Biofabrication* **5**, 045006 (2013).
326. Almela, T., Tayebi, L. & Moharamzadeh, K. 3D Bioprinting for In Vitro Models of Oral Cancer: Toward Development and Validation. *Bioprinting* **22**, e00132 (2021).
327. Asghar, W. *et al.* Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models. *Mater Today (Kidlington)* **18**, 539–553 (2015).
328. Xu, H.-Q., Liu, J.-C., Zhang, Z.-Y. & Xu, C.-X. A review on cell damage, viability, and functionality during 3D bioprinting. *Mil Med Res* **9**, 70 (2022).
329. Hann, S. Y. *et al.* Dual 3D printing for vascularized bone tissue regeneration. *Acta Biomater* **123**, 263–274 (2021).
330. Fitzpatrick, V. *et al.* Functionalized 3D-printed silk-hydroxyapatite scaffolds for enhanced bone regeneration with innervation and vascularization. *Biomaterials* **276**, 120995 (2021).
331. Bhatia, S. N. & Ingber, D. E. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol* **32**, 760–772 (2014).

332. Aref, A. R. *et al.* 3D microfluidic ex vivo culture of organotypic tumor spheroids to model immune checkpoint blockade. *Lab Chip* **18**, 3129–3143 (2018).
333. Sontheimer-Phelps, A., Hassell, B. A. & Ingber, D. E. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer* **19**, 65–81 (2019).
334. Alessandri, K. *et al.* A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC). *Lab Chip* **16**, 1593–1604 (2016).
335. Zhang, Z. *et al.* Modified CAR T cells targeting membrane-proximal epitope of mesothelin enhances the antitumor function against large solid tumor. *Cell Death Dis* **10**, 476 (2019).
336. Jeong, S.-Y., Lee, J.-H., Shin, Y., Chung, S. & Kuh, H.-J. Co-Culture of Tumor Spheroids and Fibroblasts in a Collagen Matrix-Incorporated Microfluidic Chip Mimics Reciprocal Activation in Solid Tumor Microenvironment. *PLoS One* **11**, e0159013 (2016).
337. Courau, T. *et al.* Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment. *J Immunother Cancer* **7**, 74 (2019).
338. Raulet, D. H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* **3**, 781–790 (2003).
339. Zhang, Y.-F. *et al.* New high affinity monoclonal antibodies recognize non-overlapping epitopes on mesothelin for monitoring and treating mesothelioma. *Sci Rep* **5**, 9928 (2015).
340. Di Liello, R. *et al.* Ex vivo lung cancer spheroids resemble treatment response of a patient with NSCLC to chemotherapy and immunotherapy: case report and translational study. *ESMO Open* **4**, e000536 (2019).

341. Tsai, S. *et al.* Development of primary human pancreatic cancer organoids, matched stromal and immune cells and 3D tumor microenvironment models. *BMC Cancer* **18**, 335 (2018).
342. Dhandapani, M. & Goldman, A. Preclinical Cancer Models and Biomarkers for Drug Development: New Technologies and Emerging Tools. *J Mol Biomark Diagn* **8**, 356 (2017).
343. Jiang, X. *et al.* Long-lived pancreatic ductal adenocarcinoma slice cultures enable precise study of the immune microenvironment. *Oncoimmunology* **6**, e1333210 (2017).
344. Powley, I. R. *et al.* Patient-derived explants (PDEs) as a powerful preclinical platform for anti-cancer drug and biomarker discovery. *Br J Cancer* **122**, 735–744 (2020).
345. Nguyen, M. *et al.* Dissecting Effects of Anti-cancer Drugs and Cancer-Associated Fibroblasts by On-Chip Reconstitution of Immunocompetent Tumor Microenvironments. *Cell Rep* **25**, 3884-3893.e3 (2018).
346. Kambhampati, S. & Zain, J. Circulating Tumor DNA in Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep* **17**, 298–305 (2022).
347. Sun, Y. Tumor microenvironment and cancer therapy resistance. *Cancer Lett* **380**, 205–215 (2016).
348. Menter, T., Tzankov, A. & Dirnhofer, S. The tumor microenvironment of lymphomas: Insights into the potential role and modes of actions of checkpoint inhibitors. *Hematol Oncol* **39**, 3–10 (2021).
349. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7–25 (1978).
350. Di Maggio, N. *et al.* Toward modeling the bone marrow niche using scaffold-based 3D culture systems. *Biomaterials* **32**, 321–329 (2011).

351. Korn, C. & Méndez-Ferrer, S. Myeloid malignancies and the microenvironment. *Blood* **129**, 811–822 (2017).
352. Goyama, S., Wunderlich, M. & Mulloy, J. C. Xenograft models for normal and malignant stem cells. *Blood* **125**, 2630–2640 (2015).
353. Abarrategi, A. *et al.* Modeling the human bone marrow niche in mice: From host bone marrow engraftment to bioengineering approaches. *J Exp Med* **215**, 729–743 (2018).
354. Lee, J. *et al.* Implantable microenvironments to attract hematopoietic stem/cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 19638–19643 (2012).
355. Griessinger, E. *et al.* A niche-like culture system allowing the maintenance of primary human acute myeloid leukemia-initiating cells: a new tool to decipher their chemoresistance and self-renewal mechanisms. *Stem Cells Transl Med* **3**, 520–529 (2014).
356. Cardoso, B. A., Belo, H., Barata, J. T. & Almeida, A. M. The Bone Marrow-Mediated Protection of Myeloproliferative Neoplastic Cells to Vorinostat and Ruxolitinib Relies on the Activation of JNK and PI3K Signalling Pathways. *PLoS One* **10**, e0143897 (2015).
357. Ito, S. *et al.* Long term maintenance of myeloid leukemic stem cells cultured with unrelated human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res* **14**, 95–104 (2015).
358. Hou, L. *et al.* Long-term culture of leukemic bone marrow primary cells in biomimetic osteoblast niche. *Int J Hematol* **90**, 281–291 (2009).
359. Blanco, T. M., Mantalaris, A., Bismarck, A. & Panoskaltsis, N. The development of a three-dimensional scaffold for ex vivo biomimicry of human acute myeloid leukaemia. *Biomaterials* **31**, 2243–2251 (2010).
360. Braccini, A. *et al.* Three-dimensional perfusion culture of human bone marrow cells and generation of osteoinductive grafts. *Stem Cells* **23**, 1066–1072 (2005).

361. Scherberich, A., Galli, R., Jaquiery, C., Farhadi, J. & Martin, I. Three-dimensional perfusion culture of human adipose tissue-derived endothelial and osteoblastic progenitors generates osteogenic constructs with intrinsic vascularization capacity. *Stem Cells* **25**, 1823–1829 (2007).
362. García-García, A. *et al.* Culturing patient-derived malignant hematopoietic stem cells in engineered and fully humanized 3D niches. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**, e2114227118 (2021).
363. Rödling, L. *et al.* 3D models of the hematopoietic stem cell niche under steady-state and active conditions. *Sci Rep* **7**, 4625 (2017).
364. Dal Bello, R. *et al.* A multiparametric niche-like drug screening platform in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* **12**, 95 (2022).
365. Zippel, S. *et al.* A parallelized, perfused 3D triculture model of leukemia for in vitro drug testing of chemotherapeutics. *Biofabrication* **14**, (2022).
366. Barboglio, F. *et al.* Three-dimensional co-culture model of chronic lymphocytic leukemia bone marrow microenvironment predicts patient-specific response to mobilizing agents. *Haematologica* **106**, 2334–2344 (2021).
367. Belloni, D. *et al.* Modeling multiple myeloma-bone marrow interactions and response to drugs in a 3D surrogate microenvironment. *Haematologica* **103**, 707–716 (2018).
368. Scielzo, C. *et al.* HS1 has a central role in the trafficking and homing of leukemic B cells. *Blood* **116**, 3537–3546 (2010).
369. Scielzo, C. *et al.* HS1 protein is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia patient subsets with good or poor prognoses. *J Clin Invest* **115**, 1644–1650 (2005).

370. Gravelle, P. *et al.* Cell growth in aggregates determines gene expression, proliferation, survival, chemoresistance, and sensitivity to immune effectors in follicular lymphoma. *Am J Pathol* **184**, 282–295 (2014).
371. Evens, A. M. *et al.* Hypoxia inducible factor- α activation in lymphoma and relationship to the thioredoxin family. *Br J Haematol* **141**, 676–680 (2008).
372. Faria, C. *et al.* Patient-derived lymphoma spheroids integrating immune tumor microenvironment as preclinical follicular lymphoma models for personalized medicine. *J Immunother Cancer* **11**, e007156 (2023).
373. Araujo-Ayala, F. *et al.* A novel patient-derived 3D model recapitulates mantle cell lymphoma lymph node signaling, immune profile and in vivo ibrutinib responses. *Leukemia* **37**, 1311–1323 (2023).
374. Caicedo-Carvajal, C. E., Liu, Q., Remache, Y., Goy, A. & Suh, K. S. Cancer Tissue Engineering: A Novel 3D Polystyrene Scaffold for In Vitro Isolation and Amplification of Lymphoma Cancer Cells from Heterogeneous Cell Mixtures. *J Tissue Eng* **2011**, 362326 (2011).
375. Lamaison, C. *et al.* A novel 3D culture model recapitulates primary FL B cell features and promotes their survival. *Blood Adv* bloodadvances.2020003949 (2021) doi:10.1182/bloodadvances.2020003949.
376. Mannino, R. G. *et al.* 3D microvascular model recapitulates the diffuse large B-cell lymphoma tumor microenvironment in vitro. *Lab Chip* **17**, 407–414 (2017).
377. Pixley, F. J. & Stanley, E. R. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol* **14**, 628–638 (2004).
378. Aoki, Y. & Tosato, G. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in the pathogenesis of primary effusion lymphomas. *Leuk Lymphoma* **41**, 229–237 (2001).

379. Graney, P. L. *et al.* Organoid Polymer Functionality and Mode of Klebsiella Pneumoniae Membrane Antigen Presentation Regulates Ex Vivo Germinal Center Epigenetics in Young and Aged B Cells. *Adv Funct Mater* **30**, 2001232 (2020).
380. Wagar, L. E. *et al.* Modeling human adaptive immune responses with tonsil organoids. *Nat Med* **27**, 125–135 (2021).
381. Shah, S. B. *et al.* Combinatorial treatment rescues tumour-microenvironment-mediated attenuation of MALT1 inhibitors in B-cell lymphomas. *Nat Mater* **22**, 511–523 (2023).
382. Fontan, L. *et al.* MALT1 small molecule inhibitors specifically suppress ABC-DLBCL in vitro and in vivo. *Cancer Cell* **22**, 812–824 (2012).
383. Hood, J. D. & Chersesh, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* **2**, 91–100 (2002).
384. Cayrol, F. *et al.* Integrin $\alpha\beta 3$ acting as membrane receptor for thyroid hormones mediates angiogenesis in malignant T cells. *Blood* **125**, 841–851 (2015).
385. Bouska, A. *et al.* Genome-wide copy-number analyses reveal genomic abnormalities involved in transformation of follicular lymphoma. *Blood* **123**, 1681–1690 (2014).
386. Sharma, M. R., Stadler, W. M. & Ratain, M. J. Randomized phase II trials: a long-term investment with promising returns. *J Natl Cancer Inst* **103**, 1093–1100 (2011).
387. Jardim, D. L., Groves, E. S., Breitfeld, P. P. & Kurzrock, R. Factors associated with failure of oncology drugs in late-stage clinical development: A systematic review. *Cancer Treat Rev* **52**, 12–21 (2017).
388. Lin, A. *et al.* Off-target toxicity is a common mechanism of action of cancer drugs undergoing clinical trials. *Sci Transl Med* **11**, eaaw8412 (2019).
389. Haebe, S. *et al.* Single-cell analysis can define distinct evolution of tumor sites in follicular lymphoma. *Blood* **137**, 2869–2880 (2021).

390. Araf, S. *et al.* Genomic profiling reveals spatial intra-tumor heterogeneity in follicular lymphoma. *Leukemia* **32**, 1261–1265 (2018).
391. Klanova, M. *et al.* Prognostic Impact of Natural Killer Cell Count in Follicular Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma Patients Treated with Immunochemotherapy. *Clin Cancer Res* **25**, 4634–4643 (2019).
392. Travert, M. *et al.* CD40 ligand protects from TRAIL-induced apoptosis in follicular lymphomas through NF-kappaB activation and up-regulation of c-FLIP and Bcl-xL. *J Immunol* **181**, 1001–1011 (2008).
393. Amé-Thomas, P. *et al.* Characterization of intratumoral follicular helper T cells in follicular lymphoma: role in the survival of malignant B cells. *Leukemia* **26**, 1053–1063 (2012).
394. Majchrzak, A. *et al.* In vitro cytotoxicity of ranpirnase (onconase) in combination with components of R-CHOP regimen against diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) cell line. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **67**, 1166–1172 (2013).
395. Duś-Szachniewicz, K., Gdesz-Birula, K. & Rymkiewicz, G. Development and Characterization of 3D Hybrid Spheroids for the Investigation of the Crosstalk Between B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas and Mesenchymal Stromal Cells. *Onco Targets Ther* **15**, 683–697 (2022).
396. Romano, M. F. *et al.* Triggering of CD40 antigen inhibits fludarabine-induced apoptosis in B chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **92**, 990–995 (1998).
397. Hallaert, D. Y. H. *et al.* c-Abl kinase inhibitors overcome CD40-mediated drug resistance in CLL: implications for therapeutic targeting of chemoresistant niches. *Blood* **112**, 5141–5149 (2008).

398. Zhou, D.-M. *et al.* The role of follicular T helper cells in patients with malignant lymphoid disease. *Hematology* **22**, 412–418 (2017).
399. Sun, M. *et al.* The Role of Follicular Regulatory T Cells/Follicular Helper T Cells in Primary Immune Thrombocytopenia. *Acta Haematol* **146**, 267–276 (2023).
400. Jak, M. *et al.* CD40 stimulation sensitizes CLL cells to lysosomal cell death induction by type II anti-CD20 mAb GA101. *Blood* **118**, 5178–5188 (2011).
401. Jak, M., van Bochove, G. G. W., van Lier, R. a. W., Eldering, E. & van Oers, M. H. J. CD40 stimulation sensitizes CLL cells to rituximab-induced cell death. *Leukemia* **25**, 968–978 (2011).
402. Vonderheide, R. H. & Glennie, M. J. Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. *Clin Cancer Res* **19**, 1035–1043 (2013).
403. Delgado, R. *et al.* Co-Stimulatory versus Cell Death Aspects of Agonistic CD40 Monoclonal Antibody Selicrelumab in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers (Basel)* **13**, 3084 (2021).
404. Fanale, M. *et al.* Phase IA/II, multicentre, open-label study of the CD40 antagonistic monoclonal antibody lucatumumab in adult patients with advanced non-Hodgkin or Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* **164**, 258–265 (2014).
405. Zala, M. *et al.* Functional precision oncology for follicular lymphoma with patient-derived xenograft in avian embryos. 2023.06.22.546045 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2023.06.22.546045> (2023).
406. Brady, L. *et al.* Inter- and intra-tumor heterogeneity of metastatic prostate cancer determined by digital spatial gene expression profiling. *Nat Commun* **12**, 1426 (2021).

407. Yuan, X., Wang, J., Huang, Y., Shangguan, D. & Zhang, P. Single-Cell Profiling to Explore Immunological Heterogeneity of Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Front Immunol* **12**, 643692 (2021).
408. Tripodo, C., Bertolazzi, G., Cancila, V., Morello, G. & Iannitto, E. Pseudotemporal ordering of spatial lymphoid tissue microenvironment profiles trails Unclassified DLBCL at the periphery of the follicle. *Front Immunol* **14**, 1207959 (2023).
409. Stewart, C. A. *et al.* Single-cell analyses reveal increased intratumoral heterogeneity after the onset of therapy resistance in small-cell lung cancer. *Nat Cancer* **1**, 423–436 (2020).
410. Kim, C. *et al.* Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing. *Cell* **173**, 879-893.e13 (2018).
411. Ren, Y. *et al.* Single-cell sequencing reveals effects of chemotherapy on the immune landscape and TCR/BCR clonal expansion in a relapsed ovarian cancer patient. *Front Immunol* **13**, 985187 (2022).
412. Chen, G. *et al.* Colorectal cancer organoid models uncover oxaliplatin-resistant mechanisms at single cell resolution. *Cell Oncol (Dordr)* **45**, 1155–1167 (2022).
413. Desai, P. N. *et al.* Single-Cell Profiling of CD8+ T Cells in Acute Myeloid Leukemia Reveals a Continuous Spectrum of Differentiation and Clonal Hyperexpansion. *Cancer Immunol Res* OF1–OF18 (2023) doi:10.1158/2326-6066.CIR-22-0961.
414. Li, K. *et al.* Single-cell analysis reveals the chemotherapy-induced cellular reprogramming and novel therapeutic targets in relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Leukemia* **37**, 308–325 (2023).
415. Madamanchi, A., Santoro, S. A. & Zutter, M. M. $\alpha 2\beta 1$ Integrin. *Adv Exp Med Biol* **819**, 41–60 (2014).

416. Dickinson, M. J. *et al.* Glofitamab for Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **387**, 2220–2231 (2022).
417. Budagaga, Y. *et al.* Tazemetostat synergistically combats multidrug resistance by the unique triple inhibition of ABCB1, ABCC1, and ABCG2 efflux transporters in vitro and ex vivo. *Biochem Pharmacol* **216**, 115769 (2023).
418. Hou, Y. *et al.* Transient EZH2 suppression by Tazemetostat during in vitro expansion maintains T cell stemness and improves adoptive T cell therapy. *bioRxiv* 2023.02.07.527459 (2023) doi:10.1101/2023.02.07.527459.
419. Yuan, H. *et al.* The EZH2 inhibitor tazemetostat upregulates the expression of CCL17/TARC in B-cell lymphoma and enhances T-cell recruitment. *Cancer Sci* **112**, 4604–4616 (2021).

RESUME

Le lymphome folliculaire (LF) est un lymphome dérivé du centre germinatif (CG), dont les cellules représentent la contrepartie néoplasique des cellules B du CG. Il est composé d'une niche de cellules tumorales et d'un microenvironnement spécifique à la tumeur. Ce dernier contribue à l'hétérogénéité biologique observée entre les patients mais également au niveau intra-tumoral chez un même patient, notamment par le biais des nombreux signaux fournis par les cellules du microenvironnement tumoral et qui sont spécifiques à chaque tumeur. Il joue par ailleurs un rôle crucial dans la progression de la maladie mais surtout dans la résistance à l'immunochimiothérapie. L'étude du LF est rendue difficile en raison d'un manque de modèles pré-cliniques *in vitro* ou *in vivo* permettant d'étudier l'efficacité des traitements couramment utilisés dans le LF, comme le R-CHOP, de prédire la résistance des tumeurs de patients au traitement mais surtout d'investiguer les mécanismes impliqués dans cette résistance. Pour pallier ce manque de systèmes expérimentaux, nous avons adapté un modèle organoïde à la culture de cellules primaires de patients atteints de LF. Ce modèle 3D organoïde dérivé de patients atteints de LF a permis de cultiver les cellules tumorales de LF et de maintenir leur survie jusqu'à 3 jours de culture en l'absence de traitement. Des biopsies de patients atteints de LF (bons ou mauvais répondeurs au R-CHOP selon la progression dans les 24 mois après initiation du traitement) ont été cultivées en 3D puis traitées par R-CHOP afin d'évaluer l'aptitude du modèle organoïde à prédire la réponse des patients et à corrélérer avec la réponse clinique de ces patients. A l'inverse de la culture 2D, le modèle 3D organoïde parvient à prédire la réponse clinique *in vivo*. Nous avons par ailleurs mis en évidence que la résistance des patients à la chimiothérapie au sein du modèle 3D organoïde est corrélée à une sous-population T spécifique, les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Tfh). En vue d'investiguer cette hétérogénéité inter-patients, des données de single-cell RNA-seq ont été exploitées afin de corrélérer dans la mesure du possible les mécanismes de chimiorésistance chez les patients qui ne répondent pas au traitement mais également d'identifier à l'échelle « single-cell » des signatures transcriptomiques obtenues lors du profilage de l'expression génique d'échantillons de LF provenant de l'essai clinique PRIMA.

ABSTRACT

Follicular lymphoma (FL) is a lymphoma derived from the germinal center (GC), with its cells representing the neoplastic counterpart of GC B cells. It consists of a niche of tumor cells and a tumor-specific microenvironment. The latter contributes to the biological heterogeneity observed among patients but also at intra-tumoral level within the same patient, notably through the numerous signals provided by the cells of the tumor microenvironment, which are specific to each tumor. It also plays a crucial role in disease progression, and above all, in resistance to immunochemotherapy. The study of FL is challenging due to a lack of *in vitro* or *in vivo* preclinical models to study the efficacy of commonly used FL treatments, such as R-CHOP, to predict the resistance of patients' tumors to treatment and to investigate the mechanisms involved in this resistance. To overcome this lack of experimental systems, we adapted an organoid model to culture primary cells from FL patients. This 3D organoid model derived from FL patients enabled FL tumor cells to be cultured and maintained for up to 3 days in the absence of treatment. Biopsies from FL patients (good or poor responders to R-CHOP based on progression within 24 months of treatment initiation) were cultured in 3D and then treated with R-CHOP to assess the organoid model's ability to predict patient response and correlate with the clinical response of these patients. In contrast to 2D culture, the 3D organoid model manages to predict *in vivo* clinical response. We have also demonstrated that patients' resistance to chemotherapy within the 3D organoid model is correlated with a specific T-cell subset, follicular helper T lymphocytes (Tfh). To investigate inter-patient heterogeneity, single-cell RNA-seq data were exploited to correlate, as much as possible, the mechanisms of chemoresistance in non-responders' patients, and also to identify single-cell transcriptomic signatures obtained from gene expression profiling of FL samples from the PRIMA clinical trial.