

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N°605
BIOLOGIE SANTE

Par

Antonin PAPIN

« Rôle du microenvironnement tumoral dans l'expansion des lymphomes B »

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 08 octobre 2019

Unité de recherche : Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers – U1232

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Pr Mary Callanan
Pr Loïc Ysebaert

Professeur d'Université, Praticien Hospitalier, Université de Bourgogne
Professeur d'Université, Praticien Hospitalier, Université de Toulouse

Composition du Jury :

Président : Pr Karin Tarte

Professeur d'Université, Praticien Hospitalier, Université de Rennes

Examineurs : Pr Karin Tarte
Dr Thierry Defrance

Professeur d'Université, Praticien Hospitalier, Université de Rennes
Directeur de Recherche INSERM, Université de Lyon

Dir. de thèse : Pr Steven Le Gouill
Co-dir. de thèse : Dr David Chiron

Professeur d'Université, Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Chargé de Recherche CNRS, Université de Nantes

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent naturellement au Dr David Chiron sans qui l'ensemble des travaux présentés n'aurait jamais vu le jour. Nos discussions m'ont permis de grandir scientifiquement mais aussi personnellement. Je te remercie sincèrement, travailler à tes côtés est un plaisir au quotidien.

Merci au Pr Steven Le Gouill d'avoir accepté d'être directeur de cette thèse et pour ses conseils.

Aux Pr Mary Callanan, Karin Tarte, Loïc Ysebaert et Dr Thierry Defrance de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail et de participer à mon jury de thèse.

Merci au Dr Catherine Pellat-Deceunynck pour sa disponibilité, nos discussions, son exigence et cette agréable balade à Olomouc.

Au Dr Martine Amiot pour avoir réussi, malgré les apparences, à me faire apprécier la famille Bcl-2.

Au Dr Agnès Moreau-Aubry, pour sa joie de vivre et son humour caustique.

Merci à Céline pour nos réflexions et son soutien à l'occasion de nombreuses heures en salle de culture cellulaire où la musique est parfois douteuse.

Aux « superwomen » de l'équipe 10, indispensable soutien au quotidien. A Christelle pour son « cœur de loup », à Sophie pour son écoute et pour être lumineuse, à Patricia pour notre Margarita à San Diego, à Géraldine pour son calendrier musical, à Charlotte pour sa gentillesse et pour avoir partagé un « chapeau sac plastique » avec moi, à Manu pour ses infos nécrologiques.

Merci à Benoît pour toutes nos discussions et pour avoir partagé beaucoup de rires grâce à l'étendu de ses références culturelles. Merci pour son soutien et son amitié.

Merci à Carolane pour avoir pris le relais avec brio « comme sa petite taille le laissait deviner ».

A Sophie et Louise pour les rires, les réflexions et leur amitié.

Merci à ma famille, à Jessie et à mes amis pour leur soutien de tous les jours.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	4
INDEX DES FIGURES.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	11
I) Les hémopathies B malignes en regard de la différenciation lymphocytaire B.....	11
I-1) Définitions	11
I-2) Étapes précoces de la différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse	11
I-2-1) Description des différentes étapes	11
I-2-2) La moelle osseuse : la niche de la différenciation lymphocytaire B précoce....	13
I-2-3) Hémopathies B associées	14
I-3) Etapes tardives de la différenciation lymphocytaire B dans les organes lymphoïdes secondaires.....	15
I-3-1) Migration des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires	15
I-3-2) Structure des organes lymphoïdes secondaires	16
I-3-3) Etapes tardives de la différenciation des lymphocytes B folliculaires des centres germinatifs et leurs lymphomes associés	17
I-3-3-a) Formation des centres germinatifs	17
I-3-3-b) Interactions majeures entre les lymphocytes B et les lymphocytes T folliculaires helpers.....	19
I-3-3-c) Lymphomes associés aux centres germinatifs.....	21
I-3-4) Les lymphocytes B de la zone marginale et lymphomes apparentés.....	24
I-3-4-a) La réponse humorale T-indépendantes	24
I-3-4-b) Lymphomes associés.....	26
I-4) La différenciation terminale des lymphocytes B en plasmocytes et en lymphocytes B mémoires	26
I-4-1) Les plasmocytes et le myélome multiple dans la moelle osseuse	26

I-4-1-a) Les plasmocytes.....	26
I-4-1-b) Niche des plasmocytes dans la moelle osseuse	27
I-4-1-c) Le myélome multiple.....	28
I-4-2) Les lymphocytes B mémoires et la leucémie lymphoïde chronique	29
I-4-2-a) Les lymphocytes B mémoires	29
I-4-2-b) La leucémie lymphoïde chronique.....	30
II) Le lymphome à cellules du manteau	31
II-1) Présentation du lymphome à cellules du manteau	31
II-1-1) Epidémiologie et présentation clinique	31
II-1-2) Présentation biologique : les différents sous-types	31
II-1-3) La pathogénèse du lymphome à cellules du manteau	32
II-1-4) Les anomalies génétiques du lymphome à cellules du manteau	34
II-1-3-a) La translocation t(11;14)(q13;q32)	34
II-1-3-b) Les anomalies génétique secondaires	35
II-2) Prise en charge thérapeutique	36
II-2-1) Première ligne	36
II-2-2) Rechutes et patients réfractaires.....	37
II-3) Les voies de signalisation majeures dans le lymphome à cellules du manteau.....	37
II-3-1) La voie du récepteur B	37
II-3-1-a) La signalisation BCR	37
II-3-1-b) La voie BCR : une voie de survie dans le LCM	40
II-3-2) La voie NF- κ B.....	41
II-3-2-a) La signalisation NF- κ B	41
II-3-2-b) La voie NF- κ B dans le LCM	42
II-3-3) La famille Bcl-2	43
II-3-3-a) La voie intrinsèque (ou mitochondriale) de l'apoptose	43
II-3-3-b) La famille Bcl-2 dans le lymphome à cellules du manteau.....	45
III) Microenvironnement du lymphome à cellules du manteau.....	47

III-1) Arguments sur le rôle du microenvironnement	47
III-2) Les niches tumorales du LCM	47
III-2-1) Construction de la niche tumorale du LCM : implication d'un réseau de chemokines	47
III-2-2) Les lymphocytes T	48
III-2-3) Les macrophages	49
III-2-4) Les cellules d'origine mésenchymateuse	50
III-2-5) Facteurs solubles	51
III-3) Cibler le microenvironnement dans le traitement du LCM.....	53
RESULTATS	56
I) Article : Rationale for targeting tumor cells in their microenvironment for mantle cell lymphoma treatment.....	56
II) Article : Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma	66
III) Article : BCL2-family dysregulation in B-cell malignancies. From gene expression regulation to a targeted therapy biomarker.....	88
IV) Article : CSF1R and BTK inhibitions as novel strategies to disrupt the dialog between mantle cell lymphoma and macrophages	108
IV-1) Les macrophages : généralités	108
IV-2) Les macrophages associés aux hémopathies B	109
IV-3) Résumé	110
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	134
ANNEXES.....	141
REFERENCES	147

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Etapes précoces de la différenciation lymphocytaire B.

Figure 2 : Modèle des mouvements des cellules précurseurs B dans la moelle osseuse.

Figure 3 : Structure des organes lymphoïdes secondaires.

Figure 4 : Maturation et sélection des lymphocytes B dans les CG des OLS.

Figure 5 : Interactions mises en jeu dans la reconnaissance des lymphocytes B par les lymphocytes T_{FH}.

Figure 6 : Les lymphocytes B des CG à l'origine de lymphomes.

Figure 7 : La réponse humorale T-indépendante par les lymphocytes B de la zone marginale.

Figure 8 : Les plasmablastes migrent vers la moelle osseuse où s'établit une niche pour la survie des plasmocytes.

Figure 9 : Hypothèse de développement des différents sous types de LCM.

Figure 10 : Les différents mécanismes impliqués dans la régulation de *SOX11* dans le LCM.

Figure 11 : La cycline D1 dans le cycle cellulaire.

Figure 12 : Profil mutationnel des cellules primaires de LCM.

Figure 13 : La signalisation du récepteur B (BCR).

Figure 14 : L'activation du BCR peut générer deux types de signal.

Figure 15 : Activation des voies classique et alterne de NF- κ B dans les lymphocytes B.

Figure 16 : Les protéines la famille Bcl-2.

Figure 17 : La voie intrinsèque (ou mitochondriale) de l'apoptose.

Figure 18 : Présence de macrophages dans les ganglions d'un patient atteint de LCM.

Figure 19 : Présence de CDF dans les ganglions d'un patient atteint de LCM.

Figure 20 : Rôle du microenvironnement dans le LCM.

Figure 21 : Polarisation des macrophages en différentes populations.

Figure 22 : Schéma bilan de l'étude.

Figure 23 : La co-culture des cellules primaires de LCM dans le modèle « CD40L + cytokines » *ex vivo* mime le profil transcriptomique des cellules tumorales dans les ganglions *in vivo*.

Figure 24 : Rationnel biologique des thérapies ciblées dans le traitement des LCM.

LISTE DES ABREVIATIONS

AMC : Absolute Monocytes Count, (Nombre Absolu de Monocytes)

APC : Analyse en Composante Principale

BCR : B Cell Receptor, (Récepteur B)

BL : Lymphome de Burkitt

BTK : Bruton Tyrosine Kinase

CAM-DR : Cell Adhesion Mediated Drug Resistance

CDF : Cellule Dendritique Folliculaire

CG : Centre Germinatif

CLP : Progéniteur Lymphoïde Commun

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CR : Complete Response, (Réponse Complète)

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

DLBCL : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules

FAK : Focal Adhesion Kinase

FL : Lymphome Folliculaire

GVL : Greffe contre la tumeur

HEV : High Endothelial Vessel, (Veinules à Epithélium Epais)

Ig : Immunoglobuline

IGHV : Région Hypervariable de la Chaîne Lourde des Ig

IHC : Immunohistochimie

IKK : I κ B kinases

IL : Interleukine

IMiD : Médicament Immunomodulateur

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine based-Activation Motifs

LAL : Leucémie Aigue Lymphoblastique

LCM : Lymphome à Cellules du Manteau

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LNH : Lymphome Non-Hodgkinien

M ϕ LCM : Macrophages Associés au Lymphome à Cellules du Manteau

MM : Myélome Multiple

MPC : Mesenchymal Progenitor Cell

MSC : Cellule Stromale Mésenchymateuse

MZL : Lymphome de la Zone Marginale

NGS : Nod Scid Gamma

NLC : Nurse Like Cell

ORR : Overall Response Rate, (Taux de Réponse Globale)

PDX : Patient-Derived Xenograft

R : Rituximab

RB : Rétinoblastome

S1P : Sphingosine-1-Phosphate

S1PR1 : Récepteur à la Sphingosine-1-Phosphate

SLC : Surrogate Light Chain

TAM : Macrophages Associés à la Tumeur

TCR : T Cell Receptor, (Récepteur T)

T_{FH} : T folliculaires « helper »

TLR : Toll Like Receptor

INTRODUCTION

I) Les hémopathies B malignes en regard de la différenciation lymphocytaire B

I-1) Définitions

L'hématopoïèse s'initie dans la moelle osseuse et est le processus qui permet la génération de l'ensemble des cellules sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ (CSH). Les CSH sont à l'origine de deux lignages distincts : le lignage myéloïde et le lignage lymphoïde. Le lignage lymphoïde est généré à partir du progéniteur lymphoïde commun (CLP) pour produire les lymphocytes NK, les lymphocytes T et les lymphocytes B (Galy et al., 1995).

Les lymphocytes B sont les principaux acteurs de la réponse immunitaire humorale. Ils assurent notamment la production d'anticorps pour une réponse immunitaire adaptative spécifique d'un antigène étranger.

La différenciation lymphocytaire B est un processus finement régulé qui depuis le CLP mène à la génération et à la sélection de plasmocytes sécréteurs d'anticorps et de lymphocytes B mémoires (Kurosaki et al., 2015; Nutt et al., 2015). L'acquisition d'anticorps de haute affinité dans ces cellules nécessite une instabilité génomique au sein des lymphocytes B qui peut prendre part à l'apparition d'hémopathies B. Des défauts acquis aux différents stades de la différenciation lymphocytaire B sont à l'origine d'hémopathies B (Küppers, 2005).

I-2) Étapes précoces de la différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse

I-2-1) Description des différentes étapes

Les étapes précoces de la différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse permettent, depuis le CLP, la génération des lymphocytes B immatures exprimant une immunoglobuline (Ig)M spécifique d'un antigène et non auto-réactif. Ces différentes étapes sont marquées par le réarrangement des gènes des chaînes lourdes et légères des Ig pour aboutir à l'expression du récepteur B fonctionnel appelé le BCR (« B cell receptor »). Les

progéniteurs B, aux différents stades, sont également caractérisés par l'expression de différentes molécules de surface (LeBien, 2000) (**Figure 1**).

Le CLP ($CD34^+ CD10^+ CD19^- IgM^-$) est à l'origine des différentes cellules lymphoïdes. La différenciation lymphocytaire B est régie par des facteurs de transcription dont E2A, EBF et PAX5 sont majeurs pour permettre l'expression des gènes restreints au lignage lymphocytaire B et la répression des gènes spécifiques des autres lignages. L'expression de ces trois facteurs de transcription engage définitivement les cellules dans la différenciation lymphocytaire B (O'Riordan and Grosschedl, 1999; Souabni et al., 2002; Nutt et al., 2015).

Au stade pro-B précoce le phénomène de réarrangement des gènes des chaînes lourdes des Ig s'initie par la recombinaison des jonctions DJ sur le chromosome 14. Puis au stade pro-B tardif ($CD34^+ CD10^+ CD19^+ IgM^-$), ce sont les fragment V et DJ qui se réarrangent. Si le réarrangement VDJ est productif, c'est à dire que la chaîne lourde est fonctionnelle, le phénomène d'exclusion allélique se réalise, sinon le second allèle se réarrange. L'exclusion allélique consiste à abroger le réarrangement du deuxième allèle si le premier est productif afin d'obtenir des lymphocytes B qui expriment des Ig à partir d'une seule séquence d'ADN (Jung et al., 2006).

Au stade pré-B ($CD34^- CD10^+ CD19^+, IgM^-$), la chaîne lourde des Ig est exprimée et dirigée à la membrane plasmique pour constituer un pré-BCR. Le pré-BCR est composé de deux chaînes lourdes associées à deux chaînes SLC (« surrogate light chain ») qui se substituent aux chaînes légères non réarrangées à ce stade. Les SLC sont constituées des protéines $V\lambda 5$ et $V\lambda PreB$ (Sakaguchi and Melchers, 1986; Winkler and Mårtensson, 2018). Le pré-BCR est associé aux protéines transductrices $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ (CD79A et CD79B) et engage une signalisation BCR pour un signal positif de survie et de prolifération des cellules pré-B. Seuls les lymphocytes B dont la signalisation BCR est efficace survivent, c'est un premier point de contrôle dans la différenciation lymphocytaire B. La signalisation BCR permet également d'engager le réarrangement des chaînes légères. Le locus κ est réarrangé sur le chromosome 2, si le réarrangement n'est pas productif il s'observe le réarrangement de la chaîne λ sur le chromosome 22 (Herzog et al., 2009).

Une fois la chaîne légère réarrangée, les lymphocytes sont au stade B immature ($CD34^- CD10^+ CD19^+ IgM^+$) où il coexprime un BCR fonctionnel d'isotypes IgM et IgD. Avant une sortie de la moelle osseuse, une sélection négative élimine les lymphocytes B auto-réactifs. Les mécanismes décrits pour cette sélection négative sont le « BCR editing », la délétion clonale et l'anergie (Melchers, 2015; Nemazee, 2017).

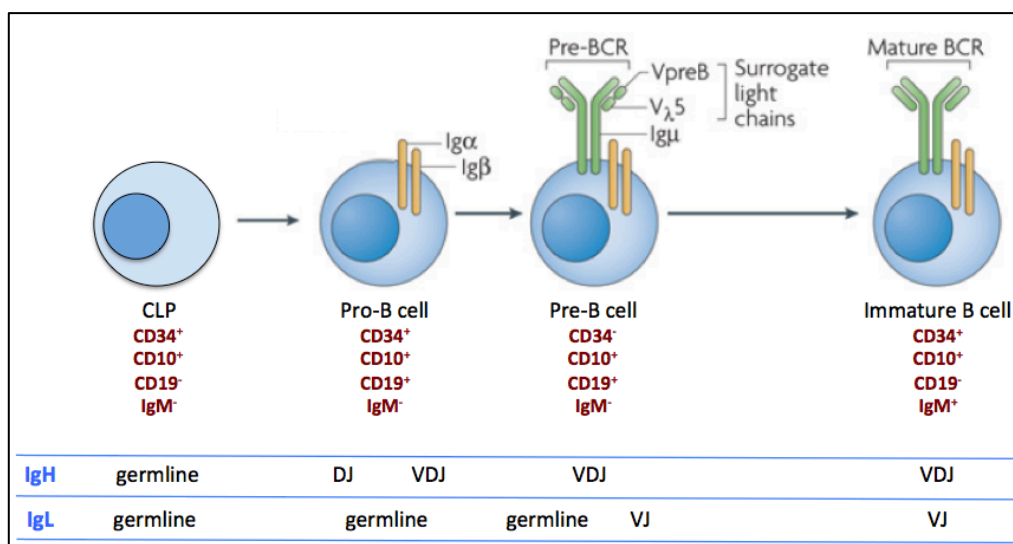


Figure 1 : Etapes précoces de la différenciation lymphocytaire B. A partir du CLP sont générés les lymphocytes B immatures. Durant ces étapes précoces de la différenciation B dans la moelle osseuse, les gènes des chaînes lourdes puis légères des Ig sont réarrangés pour aboutir à l'expression d'un pré-BCR puis d'un BCR fonctionnel mature. D'après Cambier et al., 2007.

I-2-2) La moelle osseuse : la niche de la différenciation lymphocytaire B précoce

La niche des étapes précoces de la différenciation lymphocytaire B est la moelle osseuse mais la localisation précise des précurseurs B est mal définie. Chez la souris, les lymphocytes au stade pré-B et pro-B ont été décrits dans la zone subendostéale de la moelle osseuse alors que les cellules B immatures sont localisées dans la zone centrale (Osmond et al., 1988).

Dans cette niche, les étapes de la différenciation lymphocytaire B sont régies par des signaux extrinsèques aux cellules en maturation notamment par des facteurs solubles. Parmi eux, le CXCL12 et l'interleukine (IL)-7 jouent les premiers rôles (Tokoyoda et al., 2004; Nagasawa, 2006). Le CXCL12 est un ligand du CXCR4 qui est impliqué dans la rétention des cellules précurseurs B dans la moelle osseuse (Ma et al., 1999). L'IL-7 joue un rôle dans toutes les étapes précoces de différenciation lymphocytaire B et intervient dans l'engagement, la survie, la prolifération et la maturation des cellules B (Milne and Paige, 2006).

Des cellules accessoires permettent l'apport du CXCL12 et de l'IL-7 aux précurseurs B. Parmi elles, les ostéoclastes ou des cellules stromales sont décrits comme impliqués dans la sécrétion de ces deux facteurs (Namen et al., 1988; Nagasawa, 2006; Zhu et al., 2008). De plus, de récentes études ont montré l'existence de mouvements des précurseurs B durant

leur développement. Au stade pro-B, l'IL-7 induit une forte expression du CXCR4 et des protéines FAK (focal adhesion kinase) impliquées dans l'adhésion. Ainsi les cellules pro-B restent voisines des cellules CXCL12⁺ IL-7⁺. Au stade pré-B, ce contact est rompu et le pré-BCR prend en charge la régulation du CXCR4 et inhibe l'expression des FAK et de l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$. Ainsi les cellules pré B transitent rapidement entre les zones concentrées et moins concentrées en IL-7 avant de poursuivre leur développement vers le stade immature (Fistonich et al., 2018; Zehentmeier and Pereira, 2019) (**Figure 2**). Ce circuit cellulaire entre en jeu dans le contrôle du nombre et de la qualité des précurseurs B.

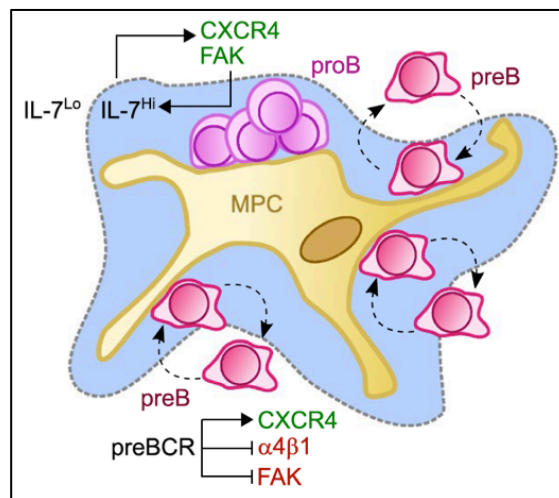


Figure 2 : Modèle des mouvements des cellules précurseurs B dans la moelle osseuse. Le CXCL12 attire les cellules pro B à proximité de cellules stromales (ici MPC : mesenchymal progenitor cells) où l'IL-7 induit le CXCR4 et les protéines kinases FAK. Ainsi, les cellules pro B restent proches des MPC. Au stade pré-B le signal pré-BCR contrôle à son tour l'expression du CXCR4 et réduit l'expression des FAK et de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$. Ainsi, les cellules pré B transitent rapidement des microenvironnements faibles et forts en IL-7. D'après Zehentmeier and Pereira, 2019.

I-2-3) Hémopathies B associées

Durant ces stades de différenciation précoces, les précurseurs B peuvent subir des altérations génétiques menant à l'apparition d'hémopathies B. La pathologie la plus fréquente durant le développement précoce, avec une incidence de 1,5 nouveau cas pour 100 000 habitants en France, est la leucémie aigue lymphoblastique (LAL) ayant pour cellule d'origine, le CLP, une cellule pro-B ou une cellule pré-B. Parmi les nombreuses anomalies génétiques des cellules de LAL, certains gènes mutés interviennent dans le développement B précoce tel que le gène *PAX5* (Shah et al., 2013).

Il existe également d'autres entités plus rares telles que la leucémie polyclonale à cellules B et le lymphome lymphoblastique à précurseurs B.

I-3) Etapes tardives de la différenciation lymphocytaire B dans les organes lymphoïdes secondaires

I-3-1) Migration des cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires

Les lymphocytes B immatures sélectionnés quittent la moelle osseuse pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (OLS) en passant par le sang périphérique. Dans le sang périphérique, ces lymphocytes B sont qualifiés de transitionnels et sont caractérisés par le phénotype CD19⁺, CD38⁺, CD24⁺ (Martin et al., 2016). La migration des lymphocytes B vers les différents OLS repose sur la balance entre des signaux qui permettent la rétention et des signaux qui autorisent la sortie des cellules.

La sortie des cellules B immatures de la moelle osseuse est dépendante du récepteur CXCR4 et de son ligand le CXCL12, ainsi que l'interaction entre l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ et la molécule d'adhésion VCAM-1. L'expression du CXCR4 et de l' $\alpha 4\beta 1$ diminue dans les lymphocytes B au stade immature ce qui limite leur rétention dans la moelle osseuse (Beck et al., 2014). Le récepteur aux cannabinoïdes CB2 est également impliqué dans cette rétention (Pereira et al., 2009). D'autre part, le récepteur à la sphingosine-1-phosphate (S1PR1) joue un rôle pour attirer les cellules B vers le sang périphérique. L'expression du S1PR1 est acquise au cours de la différenciation lymphocytaire B précoce et est forte sur les lymphocytes B immatures. La concentration en S1P, un chemoattractant lipidique, est élevée dans le sang et soutient la sortie des cellules S1PR1⁺ (Allende et al., 2010).

Les lymphocytes B transitionnelles sont ensuite attirés dans les OLS tels que la rate ou les ganglions par un réseau de chemokines. Les chemokines CXCL12, CXCL13, CCL20 et CCL19 qui se lient respectivement aux récepteurs CXCR4, CXCR5, CCR6 et le CCR7 jouent les premiers rôles dans la chemoattraction vers les OLS. Au niveau des ganglions, les cellules B entrent par l'intermédiaire des HEVs ("High Endothelial Vessels") c'est à dire des veinules à épithélium épais (Bowman et al., 2000; Okada et al., 2002). Ces lymphocytes B entrants sont matures et naïfs de l'antigène.

I-3-2) Structure des organes lymphoïdes secondaires

Les OLS sont la rate, les ganglions et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (ou plaques de Peyer). Dans ces structures, il s'organise la réponse immunitaire adaptative et donc la maturation des lymphocytes B naïfs dépendants d'un antigène.

Les ganglions sont des OLS irrigués à la fois par la lymphe et par le sang et sont organisés en trois structures anatomiques distinctes. Les lymphocytes B sont localisés dans le cortex sous forme de follicules primaires entourés d'une zone marginale. En cas d'infection, les follicules primaires se différencieront en follicules secondaires avec la génération des centres germinatifs (CG). Les lymphocytes T sont localisés dans le paracortex et donc mitoyens des zones B. Enfin, dans la médulla se trouvent des plasmocytes et des lymphocytes B mémoires (Ruddle and Akirav, 2009). (**Figure 3A**)

La rate est seulement irriguée par le sang périphérique et est composée de deux structures distinctes : la pulpe rouge et la pulpe blanche. La pulpe rouge joue principalement les fonctions d'épuration du sang et de stockage du fer. La pulpe blanche est une structure lymphoïde organisée autour d'une artériole centrale. Le compartiment T entoure les artérioles et une zone B plus en périphérie est structurée en follicules. La pulpe rouge et la pulpe blanche sont séparées par une zone marginale essentiellement composée de lymphocytes B et de macrophages (Mebius and Kraal, 2005) (**Figure 3B**).

Brièvement, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses sont organisés en plaques de Peyer. Elles sont constituées de follicules de lymphocytes B avec une zone marginale, en contact avec l'épithélium de la muqueuse et entourées de régions riches en lymphocytes T (Ruddle and Akirav, 2009).

Les lymphocytes B transitionnels du sang périphérique colonisent les OLS où ils sont stockés en tant que lymphocytes B naïfs matures prêts à répondre à un antigène. On distingue les lymphocytes B folliculaires des lymphocytes B de la zone marginale.

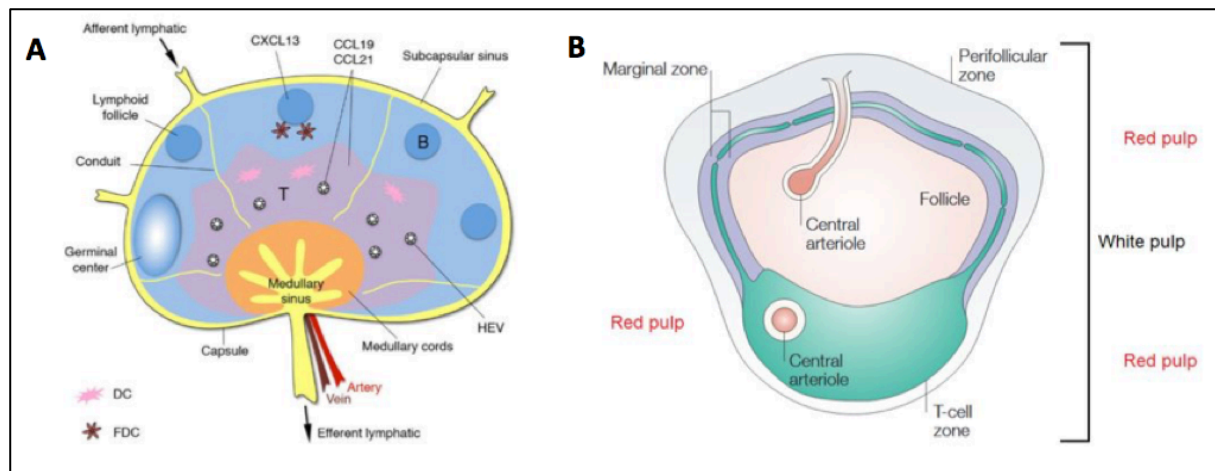


Figure 3 : Structure des organes lymphoïdes secondaires. (A) Les ganglions lymphatiques sont composés de trois structures principales. Le cortex où se trouve les zones B organisées en follicules. Le paracortex correspondant à la zone T et la médulla contenant des plasmocytes et des lymphocytes B mémoires. **(B)** La rate est composée de la pulpe rouge et la pulpe blanche séparée par une zone marginale. La pulpe blanche correspond à une structure lymphoïde avec des lymphocytes T et B.
D'après Ruddle and Akirav, 2009; Mebius and Kraal, 2005.

I-3-3) Etapes tardives de la différenciation des lymphocytes B folliculaires des centres germinatifs et leurs lymphomes assimilés

I-3-3-a) Formation des centres germinatifs

Une réponse immunitaire humorale adaptative efficace nécessite la différenciation des lymphocytes B folliculaires en plasmocytes sécréteurs d'anticorps à longue durée de vie et en lymphocytes B mémoires. La génération de ces cellules se réalise dans des structures anatomiques appelées les centres germinatifs (CG). Les CG sont le lieu de la sélection et de la prolifération des lymphocytes B dépendantes de l'antigène et des lymphocytes T. Durant ces étapes tardives de la différenciation lymphocytaire B s'opère les processus d'hypermutations somatiques et de commutation de classe (De Silva and Klein, 2015) **(Figure 4)**.

Dans la rate, les antigènes sont amenés par le sang vers la pulpe blanche où ils sont captés par des macrophages au niveau de la zone marginale. Dans les ganglions, les antigènes sont drainés par le système lymphatique où des macrophages les transfèrent vers la région interfolliculaire (Batista and Harwood, 2009). Pour initier une réponse immunitaire, les lymphocytes B naïfs dans les follicules primaires (IgM^+ , IgD^+ , CD19^+ , CD27^-) qui rencontrent

l'antigène migrent vers la bordure entre la zone B et la zone T où ils interagissent avec des lymphocytes T folliculaires helpers (T_{FH}). Cette interaction mène à l'activation des lymphocytes B qui deviendront soit des cellules sécrétrices d'anticorps à courte durée de vie soit généreront des CG. Ce destin cellulaire est déterminé selon la force et la durée d'interaction qui lie le lymphocyte T_{FH} et le lymphocyte B (Schwickert et al., 2011).

Les CG sont des structures transitoires dans les OLS composées d'une zone sombre et d'une zone claire et entourés par une zone du manteau. Dans la zone sombre, les lymphocytes B sont des centroblastes qui prolifèrent rapidement et subissent des hypermutations somatiques. En subissant ces hypermutations, les centroblastes vont diminuer ou augmenter leur affinité pour l'antigène puis migrent vers la zone claire. La zone claire est composée de lymphocytes B plus espacés appelés les centrocytes où se réalise la sélection des lymphocytes B par les lymphocytes T_{FH} . Si l'affinité à l'antigène n'est pas suffisante, le lymphocyte B n'est pas sélectionné et meurt par apoptose. En revanche, si l'affinité est suffisante, les lymphocytes T_{FH} sélectionnent le clone B qui retourne dans la zone sombre pour proliférer et subir de nouvelles hypermutations puis de nouveau une sélection dans la zone claire. Ces allers et retours se font plusieurs fois et permettent en quelques jours d'obtenir une population B majoritaire qui exprime des Ig de haute affinité pour les antigènes dans les CG (Gitlin et al., 2014; De Silva and Klein, 2015). Les mouvements des lymphocytes B dans les CG sont régis par des couples chemokines-récepteurs. Les centroblastes sont dépendants du CXCR4 et ont un phénotype $CXCR4^{fort}$, $CD83^{faible}$, $CD86^{faible}$ alors que les centrocytes sont dépendants du CXCR5 et ont donc un phénotype $CXCR4^{faible}$, $CD83^{fort}$, $CD86^{fort}$ (Caron et al., 2009; Victora et al., 2010). En plus des lymphocytes T_{FH} , les cellules dendritiques folliculaires (CDF) interviennent dans la sélection des lymphocytes B en présentant les antigènes. Les CDF forment un réseau dans la zone claire des CG et sont une source majeure de CXCL13 (Haberman et al., 2019).

De plus, dans la zone claire des CG se réalise la commutation de classe qui permet aux lymphocytes B de présenter une Ig adaptée à l'antigène (IgA, IgE ou IgG) (Xu et al., 2012).

Au final, ces processus complexes mènent à la génération de plasmocytes qui migrent vers la moelle osseuse et à la génération de cellules B mémoires (Nutt et al., 2015; Kurosaki et al., 2015).

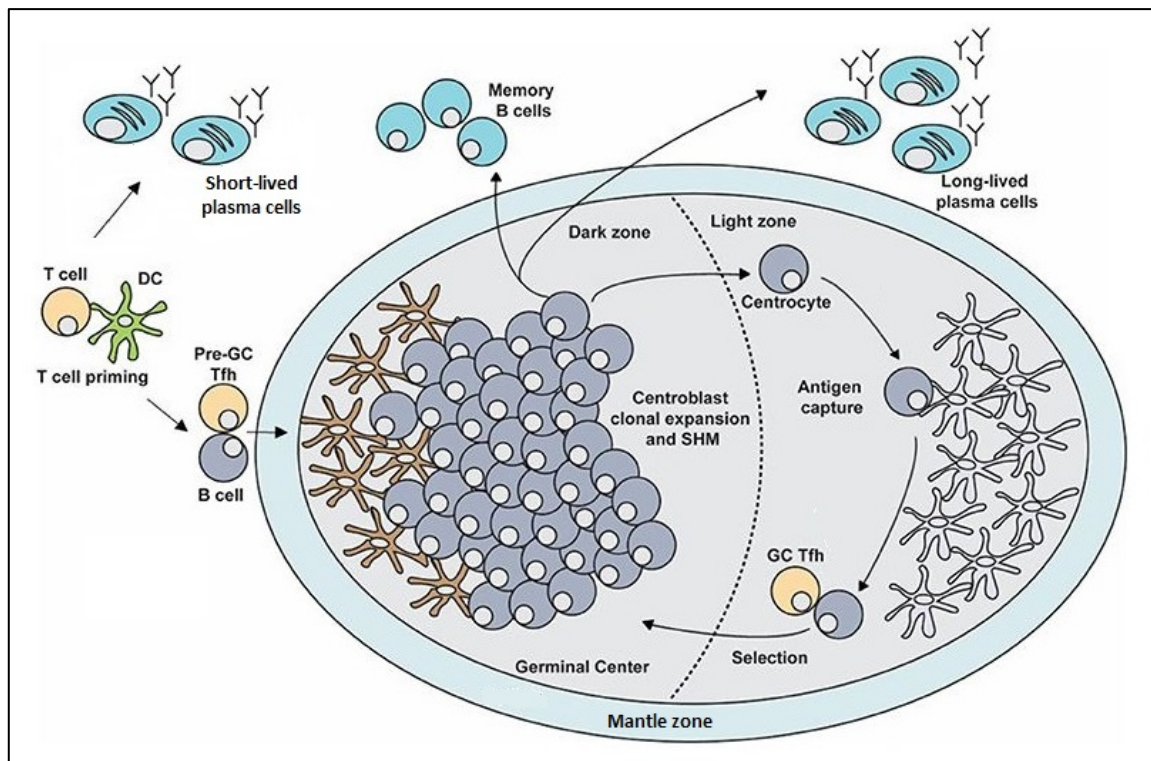


Figure 4 : Maturation et sélection des lymphocytes B dans les CG des OLS. Les CG sont composés d'une zone sombre et d'une zone claire et entourés par la zone du manteau. Les lymphocytes B sont activés dans l'espace interfolliculaire puis forme le CG. Dans la zone sombre, les centroblastes prolifèrent et subissent des hypermutations somatiques. Dans la zone claire, les centrocytes sont sélectionnés par des lymphocytes T_{FH} . L'ensemble de ces mécanismes permet la génération précoce de cellules sécrétrices d'anticorps de courte durée de vie, des plasmocytes de longue durée de vie et des cellules B mémoires. D'après Stebegg et al., 2018.

I-3-3-b) Interactions majeures entre les lymphocytes B et les lymphocytes T folliculaires helpers

La génération des cellules B permettant une réponse humorale efficace nécessite l'intervention de différents types cellulaires, comme les cellules dendritiques folliculaires (CDF), les macrophages ou les lymphocytes T_{FH} . Ces cellules accessoires interagissent avec les cellules B ou produisent des facteurs solubles utiles à la survie et à la différenciation des lymphocytes B. Parmi ces cellules, les lymphocytes T_{FH} jouent un rôle majeur pour la sélection et pour la différenciation des lymphocytes B dans les CG. (Biram et al., 2019).

Dans la zone T, la rencontre avec un antigène active les cellules T qui se différencient en différentes sous-populations dont les lymphocytes T_{FH} . A la bordure entre la zone T et la zone B puis dans les CG les T_{FH} et les lymphocytes B vont interagir par l'intermédiaire de

différents couples de molécules (**Figure 5**). Dans un premier temps, des protéines transmembranaires de la famille SLAM « *signaling lymphocytic activation molecule* » exprimées à la fois par les lymphocytes T et les lymphocytes B interagissent entre elles. Ce sont des interactions faibles qui permettent l'activation de la protéine transductrice SAP dans les lymphocytes T et une adhésion entre les deux types cellulaires. Ces interactions ne semblent pas mises en jeu dans les phénomènes de sélection des lymphocytes B mais sont essentielles à la formation des CG (Qi et al., 2008).

Les lymphocytes B folliculaires qui rencontrent un antigène vont l'internaliser puis le présenter sous forme de peptides à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II. A la bordure entre les zones T et B, les lymphocytes en contact avec les lymphocytes T_{FH} grâce aux protéines SLAM vont présenter le complexe peptide-CMH_{II} au récepteur T (TCR) du T_{FH}. Une forte affinité engendre une synapse immunologique et une sélection du clone B. Au niveau de cette synapse immunologique, d'autres couples de molécules interagissent notamment le CD40L (sur les cellules T) et le CD40 (sur les cellules B) nécessaire à l'activation et à la prolifération des lymphocytes B (Han et al., 1995).

Enfin, l'interaction du TCR avec le complexe peptide-CMH_{II} permet la mise en jeu des intégrines comme LFA-1 exprimée par les lymphocytes T et ICAM-1 à la surface des lymphocytes B. Cette interaction est forte, de longue durée et nécessaire à la migration du couple lymphocytes T–B dans le follicule pour la formation d'un CG (Zaretsky et al., 2017; Yeh et al., 2018).

Dans les CG, ce modèle à trois étapes est garant de la sélection des lymphocytes B en sélectionnant ceux qui présentent un fort niveau de CMH_{II} avec un peptide de forte affinité pour un TCR.

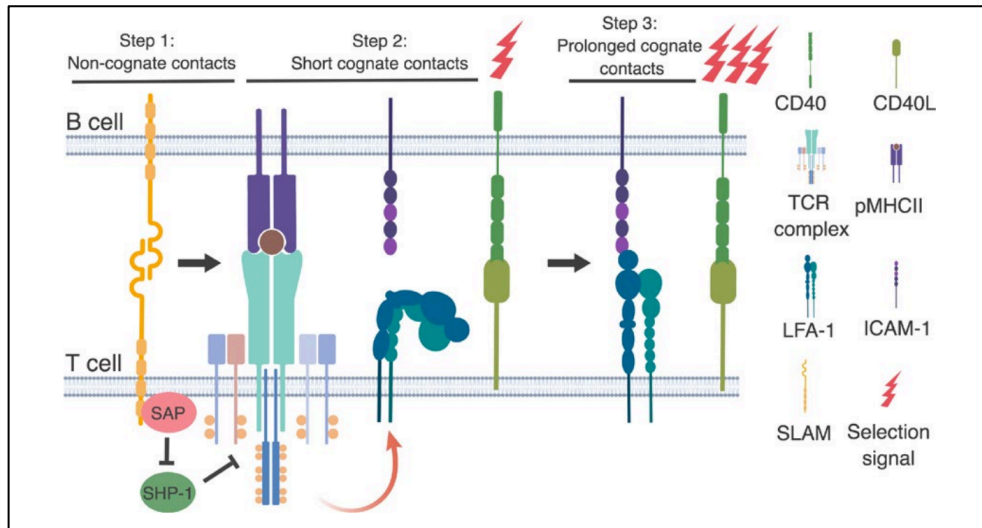


Figure 5 : Interactions mises en jeu dans la reconnaissance des lymphocytes B par les lymphocytes T_{FH}. Les deux cellules adhèrent par des interactions faibles que permettent les protéines SLAM. Puis, les lymphocytes T_{FH} reconnaissent spécifiquement le complexe peptide-CMH_{II} présenté par les lymphocytes B et ce contact est potentialisé par l'interaction CD40-CD40L. Pour une interaction forte et de longue durée les protéines LFA-1 des lymphocytes T_{FH} interagissent avec les molécules ICAM-1 des lymphocytes B. D'après Biram et al., 2019.

I-3-3-c) Lymphomes associés aux centres germinatifs

Les mécanismes de génération des différentes sous-populations des lymphocytes B sont à l'origine de différents lymphomes non-hodgkiniens (LNH). Plus de 80% des LNH ont pour cellules d'origine les lymphocytes B des CG à différents stades de différenciation. Les lymphomes de Burkitt (BL) ont pour origine les centroblastes de la zone sombre alors que les lymphomes folliculaires (FL) et les lymphomes diffus à grandes cellules (DLBCL) ont pour origine les centrocytes de la zone claire pour le sous-type GC et les plasmablastes pour le sous-type ABC. De plus, les cellules B de la zone du manteau qui entourent les CG sont à l'origine des lymphomes à cellules du manteau (LCM) (§II). De nombreux gènes mis en jeu dans le développement des lymphocytes B sont également impliqués dans la pathogénèse des LNH (Basso and Dalla-Favera, 2015) (**Figure 6**).

Les BL sont des LNH agressifs et hétérogènes avec 3 sous-types distincts. Malgré cette hétérogénéité l'ensemble des BL partagent des caractéristiques communes et sont issus des centroblastes (Schmitz et al., 2012). Les BL ont pour caractéristique principale des translocations impliquant le gène *MYC*. La plus fréquente est la translocation t(8;14) mais des translocation t(2;8) et t(8;22) sont aussi décrites. La protéine *MYC* est un facteur de

transcription qui régule des gènes contrôlant la survie et la prolifération des cellules. Lors de la différenciation lymphocytaire B dans les CG, *MYC* s'exprime transitoirement après la sélection par les lymphocytes T_{FH} dans la zone claire avec l'activation des signalisations BCR et CD40L (Luo et al., 2018). Paradoxalement à son rôle dans la prolifération, le gène *MYC* n'est normalement pas exprimé dans les centroblastes (Calado et al., 2012). En plus de cette surexpression de *MYC*, les BL sont caractérisés par une activation constitutive de la voie PI3K liée au BCR. Cette activation est principalement due à des mutations activatrices du gène *TCF3* codant pour le facteur de transcription E2A et à des mutations répressives de son inhibiteur *ID3* (Love et al., 2012). Le facteur E2A est important pour l'activation tonique du BCR, caractérisée par une signalisation PI3K, et donc dans le développement lymphocytaire B pour la prolifération des centroblastes. De plus, les souris qui surexpriment *MYC* et activent la voie PI3K dans les lymphocytes B matures développent des lymphomes très proches des BL humains ce qui confirme l'importance de ces deux caractéristiques dans cette pathologie (Sander et al., 2012). Les cellules de BL sont peu dépendantes de leur microenvironnement contrairement à d'autres lymphomes. Cependant, des macrophages sécrétant le facteur soluble BAFF ont été décrits et potentialisent la survie des cellules de BL (Ogden et al., 2005).

Le FL est un LNH incurable caractérisé par la translocation t(14;18) qui se produit lors de la recombinaison VDJ au cours des étapes précoces de la différenciation B dans la moelle osseuse. Cette translocation place le gène anti-apoptotique *BCL2* sous le contrôle d'un enhancer du gène des chaînes lourdes des Ig. La cellule d'origine de ce lymphome est un lymphocyte B issu de la zone claire des CG (Swerdlow et al., 2016). L'expression ectopique de *BCL2* inhibe le déclenchement spontané de l'apoptose même lorsque le BCR a une affinité faible pour un antigène et des événements oncogéniques secondaires peuvent mener à l'apparition d'un FL. Le paysage mutationnel du FL met en évidence des altérations de plusieurs gènes impliqués dans des régulations épigénétiques notamment le gène *MLL2* dans près de 80% des cas. D'autres régulateurs épigénétiques sont fréquemment mutés dans le FL tels que *CREBBP* et *EZH2* (Morin et al., 2011). Le FL est également très dépendant de son microenvironnement pour sa survie et sa prolifération comme en témoigne une prolifération différentielle des cellules tumorales selon les niche tumorales (Amé-Thomas and Tarte, 2014). Des mutations du gène *TNFRSF14* sont recensées favorisant les interactions avec les lymphocytes T_{FH} (Launay et al., 2012). La voie BCR, essentielle à la survie des cellules tumorales, est également activée notamment par des interactions entre des Ig mannosylées et des lectines. En effet, des résidus glycosylés sont introduits au niveau du BCR durant le processus d'hypermutations somatiques et ils interagissent avec

des lectines présentes sur les cellules myéloïdes (Amin et al., 2015). Dans 35% des cas, les FL se transforment en DLBCL associés à une mauvaise survie (Montoto et al., 2007).

Le DLBCL représente près de 40% des LNH et est une pathologie très hétérogène. Deux sous-types majoritaires se distinguent par leurs profils transcriptionnels inhérents à leur cellule d'origine. Les DLBCL-GC ont pour cellules d'origine des lymphocytes B de la zone claire des CG et les DLBCL-ABC proviennent des plasmablastes c'est à dire des cellules engagées dans une différenciation plasmocytaires près à rejoindre la moelle osseuse (Alizadeh et al., 2000). Les altérations du DLBCL sont très complexes avec de nombreuses mutations décrites. Les deux sous types présentent des dérégulations du facteur de transcription BCL6 (35%) qui est primordial dans la formation des CG. Les gènes des régulateurs épigénétiques *MLL2* et *CREBBP* sont également fréquemment mutés dans la pathologie (30-35%). Le sous type DLBCL-GC présente plus fréquemment des mutations du gène *EZH2* et des expressions ectopiques de MYC et BCL2 alors que le sous-type DLBCL-ABC est caractérisé par une voie NF- κ B constitutivement active et une inactivation du gène *PRDM1*. Le gène *PRDM1* est activé lors de la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes suite à une répression de *BCL6*. Les DLBCL présentent également des mutations du gène codant pour la β -2-microglobuline induisant une diminution du nombre de molécules de CMH_I à la surface des cellules tumorales et en conséquence un échappement au système immunitaire (Pasqualucci and Dalla-Favera, 2018). Le DLBCL est une pathologie agressive mais les cellules tumorales intègrent également des signaux provenant du microenvironnement tumoral. Le microenvironnement permet une promotion tumorale notamment par l'activation de la voie BCR et l'interaction CD40-CD40L (Ito et al., 2012; Li et al., 2018).

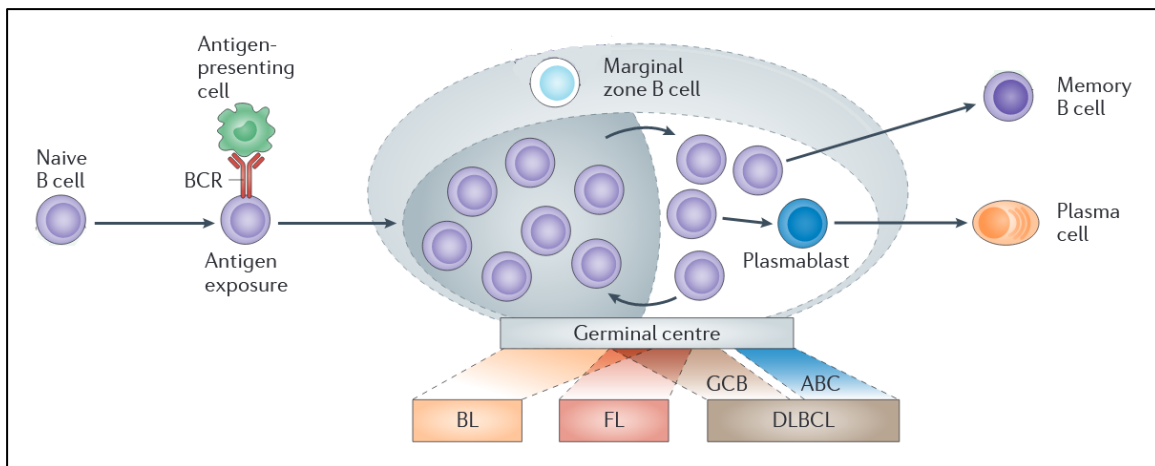


Figure 6 : Les lymphocytes B des CG à l'origine de lymphomes. Les lymphocytes B de la zone sombre des CG sont à l'origine des BL. Les cellules B de la zone claire sont à l'origine des FL et des DLBCL. D'après Scott and Gascoyne, 2014.

I-3-4) Les lymphocytes B de la zone marginale et lymphomes associés

I-3-4-a) La réponse humorale T-indépendantes

Les études sur les lymphocytes B de la zone marginale sont plus limitées et des différences sont notables entre l'homme et la souris. Ces cellules B sont à la croisée des immunités innée et adaptative et se localisent dans la zone marginale des OLS. Chez l'homme, ils se caractérisent par un phénotype $\text{IgM}^+ \text{IgD}^{+/-} \text{CD21}^+ \text{CD23}^- \text{CD1c}^+$ et sont aussi présents dans le sang périphérique (Weill et al., 2009). Les lymphocytes B naïfs de la zone marginale possèdent des récepteurs BCR peu diversifiés et polyréactifs qui permettent une réponse humorale rapide contre des motifs microbiens conservés. Cette réponse immunitaire peut être dépendante ou indépendante des lymphocytes T et inclut des processus d'hypermutations somatiques et de commutation de classe (Weller et al., 2008).

Des antigènes T-indépendants entrent dans la zone marginale d'un OLS. Ils sont capturés par des cellules dendritiques ou des neutrophiles pour être présentés aux lymphocytes B de la zone marginale. Le contact avec ces cellules est important pour la présentation de l'antigène au BCR mais aussi aux « Toll-like receptors » (TLR) indispensables à la réponse T-indépendante. Ces cellules apportent également des facteurs solubles essentiels à l'activation des lymphocytes B : le BAFF, APRIL et l'IL-21. Il en résulte la différenciation des lymphocytes B de la zone marginale en plasmablastes c'est à dire en cellules sécrétrices d'anticorps à courte durée de vie (Cerutti et al., 2013). Il est également possible d'observer

sur ces cellules des commutations de classe et des hypermutations somatiques grâce à une induction de l'enzyme AID dépendante des neutrophiles « *helpers* » mais ce phénomène est peu étudié (Puga et al., 2011). Les anticorps produits sont de type IgM, IgG et IgA (Cerutti et al., 2013) (**Figure 7**).

Les lymphocytes B de la zone marginale sont également capables de générer des réponses T-dépendantes. Le choix de la voie de différenciation dépend principalement de la nature de l'antigène.

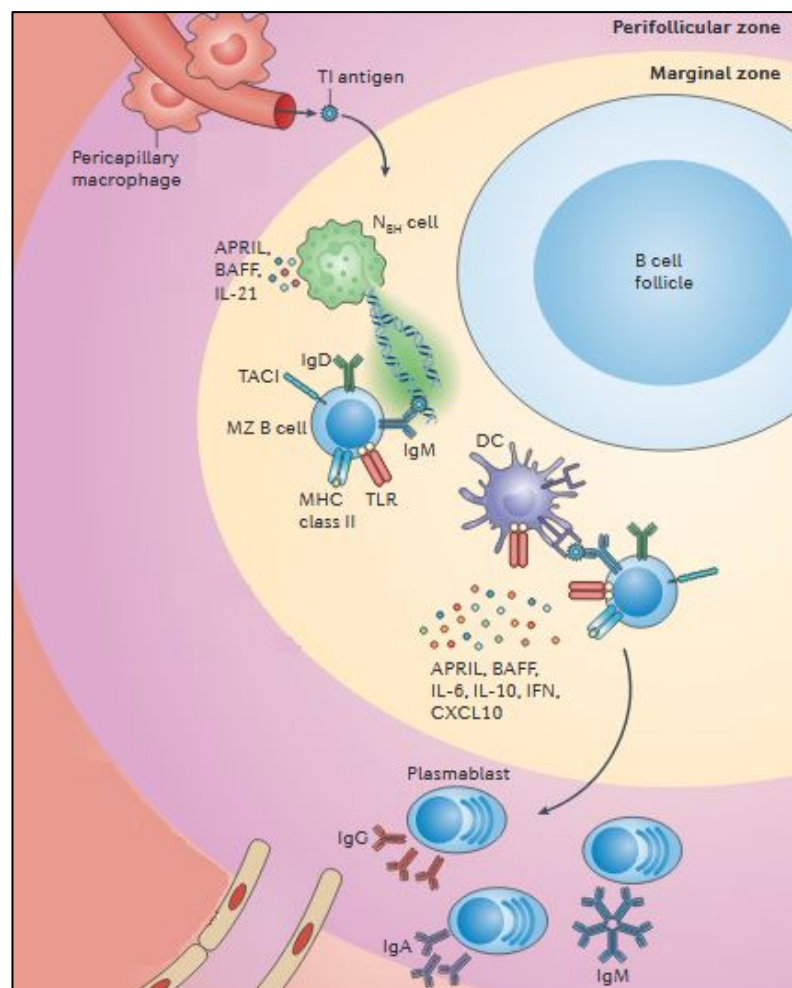


Figure 7 : La réponse humorale T-indépendante par les lymphocytes B de la zone marginale.

Un antigène bactérien entre dans la zone marginale d'un OLS et est capturé par des neutrophiles « *helpers* ». Ces neutrophiles présentent l'antigène au BCR et aux TLR des lymphocytes B de la zone marginale ainsi que des facteurs de survie et de différenciation (BAFF, APRIL et IL-21). En conséquence, les lymphocytes B se différencient en plasmablastes à courte durée de vie. D'après Cerutti et al., 2013.

I-3-4-b) Lymphomes associées

Les lymphocytes B de la zone marginale sont à l'origine des lymphomes de la zone marginale (MZL) classifiés en trois entités différentes : les MZL de la rate, les MZL ganglionnaires et les MZL des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses aussi appelés les lymphomes du MALT. Les MZL de la rate et ganglionnaires représentent seulement 2% des LNH alors que les lymphomes du MALT en comprennent 8%. Les MZL sont qualifiés de lymphomes indolents (Swerdlow et al., 2016).

La pathogenèse des différents MZL est mal connue mais est souvent liée à une inflammation chronique par exemple à cause d'une infection. Les lymphomes du MALT sont en effet souvent associés à une infection par *Helicobacter pylori* et l'élimination de la bactérie par antibiotique permet le traitement de ces lymphomes (Zucca et al., 2014). De même, l'apparition de MZL peut être due à l'infection par le virus de l'hépatite C parmi d'autres pathogènes identifiés (Couronné et al., 2018). Les MZL possèdent des altérations génétiques qui participent à la pathogenèse telles que des délétions 7q, dont les gènes cibles restent non identifiés, ou des anomalies des gènes des voies NF- κ B, BCR ou TP53 également communes aux autres LNH. De plus, des gènes importants dans le développement des lymphocytes B de la zone marginale sont fréquemment mutés dans les MZL, notamment *NOTCH2* dans plus de 20% des cas (Saito et al., 2003; Rossi et al., 2012). Enfin, la surreprésentation de certains idiotypes dans le répertoire *IGHV* (région hypervariable de la chaîne lourde des Ig) est en faveur de l'intervention d'un pathogène ou d'alloréactivité dans la pathogénèse des MZL (Bikos et al., 2012).

I-4) La différenciation terminale des lymphocytes B en plasmocytes et en lymphocytes B mémoire

I-4-1) Les plasmocytes et le myélome multiple dans la moelle osseuse

I-4-1-a) Les plasmocytes

La différenciation terminale des lymphocytes B mène à la génération de cellules à longue durée de vie exprimant une Ig de forte affinité contre un antigène. Il se distingue alors les lymphocytes B mémoires des plasmocytes. Les plasmocytes sont des cellules B sécrétrices

d'anticorps localisées dans la moelle osseuse avec une morphologie et un transcriptome caractéristique (Nutt et al., 2015). Lors de la réponse immunitaire humorale, les plasmocytes vont sécréter des anticorps qui se fixent spécifiquement sur un antigène pour la formation d'un complexe immun et l'élimination du pathogène par phagocytose par les macrophages.

Seule une petite proportion de cellules B proliférantes des CG deviennent des lymphocytes B sécréteurs d'anticorps. La différenciation des cellules B des CG en cellules sécrétrices est permise par une reprogrammation transcriptomique avec, d'une part, la mise sous silence du programme transcriptionnel des lymphocytes B des CG et, d'autre part, l'induction du programme transcriptionnel des cellules sécrétrices d'anticorps. Ces modifications sont régies par les facteurs de transcription IRF4, PRDM1 et XBP1. (Fairfax et al., 2007; Nutt et al., 2015). L'acquisition de l'expression de *PRDM1* s'initie au stade plasmablastes qui deviennent sensibles à une migration dans le sang périphérique. Il s'ensuit un recrutement des cellules B dans la moelle osseuse où elles se différencient définitivement en plasmocytes non-proliférant avec une expression de *PRDM1* plus élevée.

I-4-1-b) Niche des plasmocytes dans la moelle osseuse

La présence d'anticorps dirigés contre un antigène durant plusieurs années dans le sang périphérique suppose l'existence de plasmocytes à longue durée de vie. Cependant, tous les plasmablastes qui migrent vers la moelle osseuse ne deviennent pas des cellules sécrétrices à longue durée de vie (Chu and Berek, 2013) (**Figure 8**).

L'expression du récepteur S1PR1 est nécessaire à la sortie des plasmablastes des OLS puis le ligand CXCL12 et son récepteur CXCR4 sont majeurs pour leur recrutement dans la moelle osseuse (Kabashima et al., 2006). L'axe CXCR4 n'agit pas seul et d'autres chemokines peuvent se substituer comme le CXCL9, le CXCL10 et le CXCL11, toutes ligands du CXCR3 (Hauser et al., 2002). Une fois dans la moelle osseuse, les plasmocytes expriment fortement le CXCR4 et le CXCR6 et sont donc sensibles au CXCL12 et au CXCL16 mais également au CCL28 malgré une faible expression des récepteurs CCR10 et CCR3 (Nakayama et al., 2003).

Pour leur rétention, les plasmocytes sont essentiellement dépendants des cellules stromales qui produisent le CXCL12 et expriment des molécules d'adhésion telles que VCAM-1 qui se lie aux intégrines $\alpha 4\beta 7$ des plasmocytes (Cyster, 2003).

Les plasmocytes sont très dépendants de leur microenvironnement pour leur survie et une niche se construit avec l'arrivée de plasmablastes pour rendre matures et entretenir les

plasmocytes à longue durée de vie. La niche des plasmocytes dans la moelle osseuse est majoritairement composée de différentes sous-populations de cellules stromales mais celles mises en jeu dans la survie des plasmocytes sont encore peu décrites. La présence de macrophages et d'éosinophiles est également montrée. *In vitro*, les cellules stromales supportent la survie des plasmocytes tout comme plusieurs facteurs solubles tels que l'IL-6, le BAFF, APRIL ou le CXCL12 (Cassese et al., 2003; Benson et al., 2008). *In vivo*, ces cytokines sont fournies par les macrophages, les éosinophiles et les fibroblastes. Une boucle autocrine d'APRIL par les plasmocytes a également été décrite (O'Connor et al., 2004; Chu and Berek, 2013).

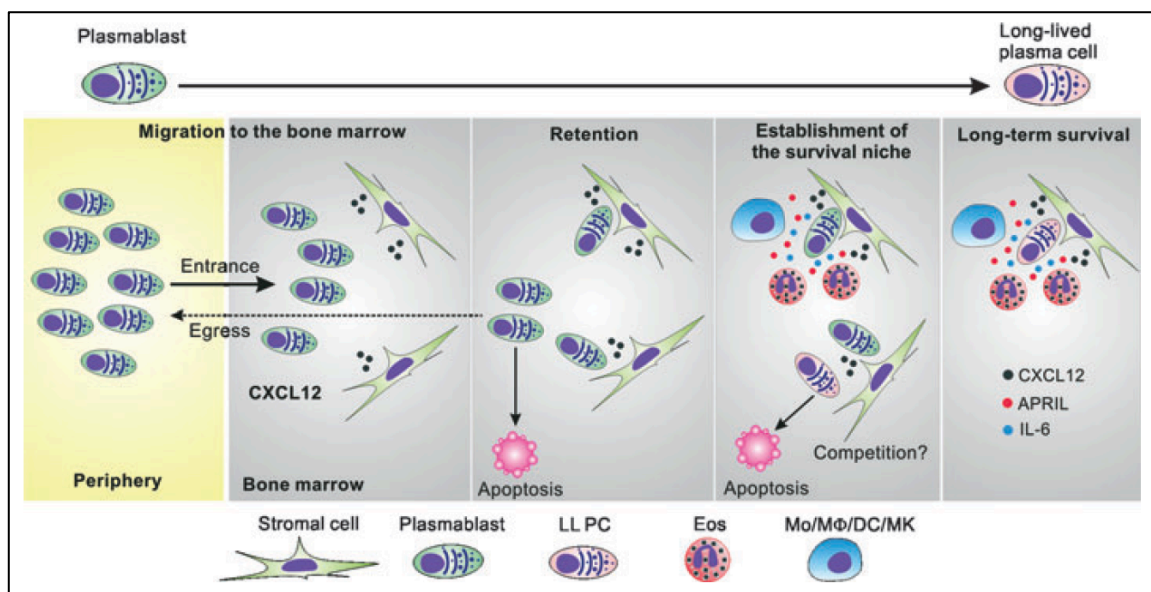


Figure 8 : Les plasmablastes migrent vers la moelle osseuse où s'établit une niche pour la survie des plasmocytes. Les plasmablastes des organes lymphoïdes secondaires migrent dans la moelle osseuse où ils continuent leur maturation pour devenir des plasmocytes. Une minorité des cellules deviendront des plasmocytes à longue durée de vie dépendants de leur niche. D'après Chu and Berek, 2013.

I-4-1-c) Le myélome multiple

Le myélome multiple (MM) est une hémopathie B maligne caractérisée par la prolifération clonale de plasmocytes au niveau de la moelle osseuse. L'oncogénèse du MM se déroule en plusieurs étapes incluant une phase asymptomatique avec une gammopathie monoclonale puis une phase plus agressive. L'apparition d'un MM est caractérisée par des événements oncogéniques majeurs tels que des hyperploïdies et des translocations juxtaposant le

promoteur du gène des chaînes lourdes des Ig et différents partenaires. Les translocations décrites se réalisent lors des processus d'hypermutations somatiques et de commutation de classe et impliquent fréquemment les gènes codant pour les cyclines D1 et D3 (*CCND1* et *CCND3*), les gènes *FGFR3*, *MMSET* (*NSD2*) ou le gène *MAF* (Chng et al., 2011; Sonneveld et al., 2016). D'autres altérations génétiques secondaires sont décrites telles que des surexpressions de *MYC* ou des mutations activatrices de voies oncogéniques telles que les anomalies de *RAS* pour une activations des voies MAPK. Les rechutes successives dans cette pathologie voient émerger des clones de plus en plus agressifs. Par exemple, les mutations et délétions du gène *TP53* sont plus présentes à la rechute qu'au diagnostic (Manier et al., 2017; Tessoulin et al., 2017).

Le microenvironnement joue également un rôle capital dans le MM. En effet, les plasmocytes malins ne survivent pas isolés *in vitro*. Les cellules stromales de la moelle osseuse sont capables de sécréter de l'IL-6 et de l'IGF-1 pour induire les voies NF- κ B, MAPK ou PI3K. Ces voies sont impliquées dans la survie et la prolifération des cellules de MM notamment par induction des protéines pro-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1, ou Bcl-2 dans le groupe *CCND1* transloqué, et répression de la protéine pro-apoptotique Bim (Puthier et al., 1999; De Bruyne et al., 2010).

I-4-2) Les lymphocytes B mémoires et la leucémie lymphoïde chronique

I-4-2-a) Les lymphocytes B mémoires

Lors d'une réponse humorale primaire suite à une infection par un pathogène, il va s'établir une immunité B mémoire qui permet lors d'une infection secondaire une réponse rapide et efficace. Les lymphocytes B mémoires ($CD19^+ CD27^+$) sont principalement générés lors de la différenciation dépendante des lymphocytes T à la fois à la bordure des zones T et B et dans les CG (Inoue et al., 2018). A la bordure T-B, les lymphocytes B mémoires sont majoritairement générés avec des lymphocytes de faible affinité pour l'antigène et sont d'isotype IgM^+ et pour une minorité d'isotype IgA^+ et IgG^+ (Takemori et al., 2014). Les lymphocytes peuvent également être générés dans les CG mais les mécanismes mis en jeu sont peu décrits. Des premières études mettent en évidence que les lymphocytes B du CG exprimant un fort niveau de Bcl-2 ont un avantage pour être sélectionnés en B mémoire (Smith et al., 2000). De plus, les lymphocytes B mémoires sont générés à partir de lymphocytes B du CG plutôt de faible affinité et précocement dans le développement des CG (Shinnakasu et al., 2016; Weisel et al., 2016).

Lors d'une réponse secondaire, une partie des lymphocytes B mémoires IgM⁺ permet le maintien de la mémoire B avec un passage dans le CG afin de générer de nouveaux lymphocytes B mémoires. D'autre part, les lymphocytes B mémoires IgG⁺ sont qualifiés d'effecteurs en se différenciant en plasmablastes pour devenir des plasmocytes et réaliser leur action sécrétrice (Kurosaki et al., 2015).

I-4-2-b) La leucémie lymphoïde chronique

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie B où les cellules tumorales sont des lymphocytes B CD5⁺ présents dans les OLS, la moelle osseuse et le sang périphérique. La LLC est une pathologie majoritairement indolente mais elle peut évoluer et devenir agressive notamment par l'acquisition d'altérations du gène *TP53*. Les cellules tumorales présentent fréquemment des mutations sur des gènes tels que *TP53*, *ATM*, *NOTCH1* ainsi que des gènes important dans la voie NF-κB, par exemple *BIRC3* (Puente et al., 2018). Les cellules à l'origine de la LLC ne sont pas clairement identifiées mais l'analyse du BCR met en évidence deux groupes distincts de LLC (Hamblin et al., 1999). Un premier groupe de LLC présente des Ig ayant subis des hypermutations somatiques (70%) et correspond majoritairement à des patients dont le profil clinique est indolent. Un second groupe de patients présente peu d'hypermutations somatiques (30%) et est cliniquement agressif. De plus, le premier groupe exprime le CD27 à la surface des cellules tumorales ce qui suggère une origine B mémoire alors que le deuxième groupe aurait pour origine des lymphocytes B naïfs. Récemment, les analyses étudiant la méthylation des cellules B confirme les origines cellulaires de la LLC (Oakes et al., 2016). Ces deux groupes se distinguent également par l'expression de la protéine tyrosine kinase ZAP70 chez les patients agressifs et confirme l'importance de la voie BCR dans les hémopathies B. La voie NF-κB est également très importante dans la pathologie. Le microenvironnement est crucial pour la survie et la prolifération des cellules tumorales. En effet, bien que les cellules de LLC soient circulantes, le site primaire d'expansion se localise dans les ganglions où les cellules tumorales sont en contact avec les lymphocytes T et les macrophages appelés « nurse like cells » (Puente et al., 2018).

II) Le lymphome à cellules du manteau

II-1) Présentation du lymphome à cellules du manteau

II-1-1) Épidémiologie et présentation clinique

Le lymphome à cellules du manteau (LCM) est une hémopathie B agressive représentant moins de 10% des LNH. Le LCM est caractérisé par la translocation chromosomique t(11;14)(q13;q32) qui survient au stade pré B dans la moelle osseuse, lors du réarrangement VDJ du gène de la chaîne lourde des Ig. Cet évènement oncogénique majeur mène à la surexpression de la cycline D1 impliquée dans le cycle cellulaire. L'incidence du LCM est de 1 nouveau cas pour 100 000 personnes par an, en France, et il affecte principalement les hommes avec un sexe ratio de 3:1. L'âge médian au diagnostic est de 72 ans et la survie globale est de 4 ans hors essai clinique (Leux et al., 2014).

Le site primaire d'expansion des cellules tumorales se localise dans les OLS tels que les ganglions et la rate, et plus précisément dans la zone du manteau qui entoure les CG. Les patients présentent alors une splénomégalie et des adénopathies diffuses. Cependant, il s'observe très rapidement une dissémination des cellules tumorales dans d'autres sites avec une atteinte médullaire quasiment systématique et une hyperlymphocytose décrite pour 30% des patients au diagnostic. Il est également décrit une atteinte au niveau du tractus digestif pour 25% des patients (Romaguera et al., 2003). De plus, un clone tumoral circulant est identifié dans plus de 90% des cas (Ferrer et al., 2007).

II-1-2) Présentation biologique : les différents sous-types

Les cellules de LCM sont de phénotype CD19⁺ CD20⁺ CD5⁺ CD23⁻ et expriment des IgM et des IgD de surface ce qui le différencie des autres LNH (Craig and Foon, 2008). Malgré ce phénotype discriminant, le LCM est une pathologie hétérogène avec différents sous-types qui se distinguent anatomopathologiquement, biologiquement et cliniquement (Jares et al., 2012; Navarro et al., 2012).

La forme commune représente environ 70 à 80% des LCM et est définie par une surexpression de l'oncogène *SOX11* et par l'absence de mutation dans la région hypervariable de la chaîne lourde des Ig (*IGHV*) en comparaison à la lignée germinale

(<97%), résultant en un phénotype cliniquement agressif. Les sous-types blastoïde et pléomorphe représentent 10 à 20% des LCM et sont également $SOX11^+$ et $IGHV^{non-mutés}$ et se distinguent de la forme commune par leur morphologie anatomopathologique. De plus les sous-types blastoïdes et pléomorphes sont plus agressifs et présentent un nombre plus important d'altérations génétiques. Les sous-types commun, blastoïde et pléomorphe sont des formes de LCM ganglionnaires (Dreyling et al., 2018).

Par opposition, il existe une forme dite leucémisée non-ganglionnaire (10%) définie par l'absence de surexpression de $SOX11$ et la présence de mutations dans la région $IGHV$ (<97% de la lignée germinale). Les LCM leucémisés non-ganglionnaires ne présentent pas d'adénopathies mais une splénomégalie et des cellules tumorales circulantes. Cette forme est cliniquement indolente mais peut toutefois se transformer et devenir agressive avec l'acquisition d'altérations génétiques secondaires et le plus fréquemment une mutation du gène $TP53$ (Fernández et al., 2010).

II-1-3) La pathogénèse du lymphome à cellules du manteau

Les formes commune et leucémisée non-ganglionnaire se distinguent également par leur potentielle cellule d'origine. En effet, les formes commune, blastoïde et pléomorphe $SOX11^+$ sont $IGHV^{non-mutés}$, ce qui témoigne d'une absence de stimulation par un antigène. Ce sont des lymphocytes B matures et naïfs. En revanche la forme leucémisée non-ganglionnaire $SOX11^-$ est $IGHV^{muté}$ et a pour origine supposée des lymphocytes B ayant rencontrés l'antigène dans les CG (**Figure 9**) (Navarro et al., 2012).

Cette dichotomie a récemment été confirmée à l'échelle épigénétique et transcriptomique où l'oncogène $SOX11$ a un rôle majeur (Queirós et al., 2016; Clot et al., 2018). $SOX11$ est une protéine exprimée normalement dans les cellules du système nerveux et est impliquée dans le développement embryonnaire (Bergsland et al., 2006). Cette protéine n'est pas exprimée dans les lymphocytes B normaux.

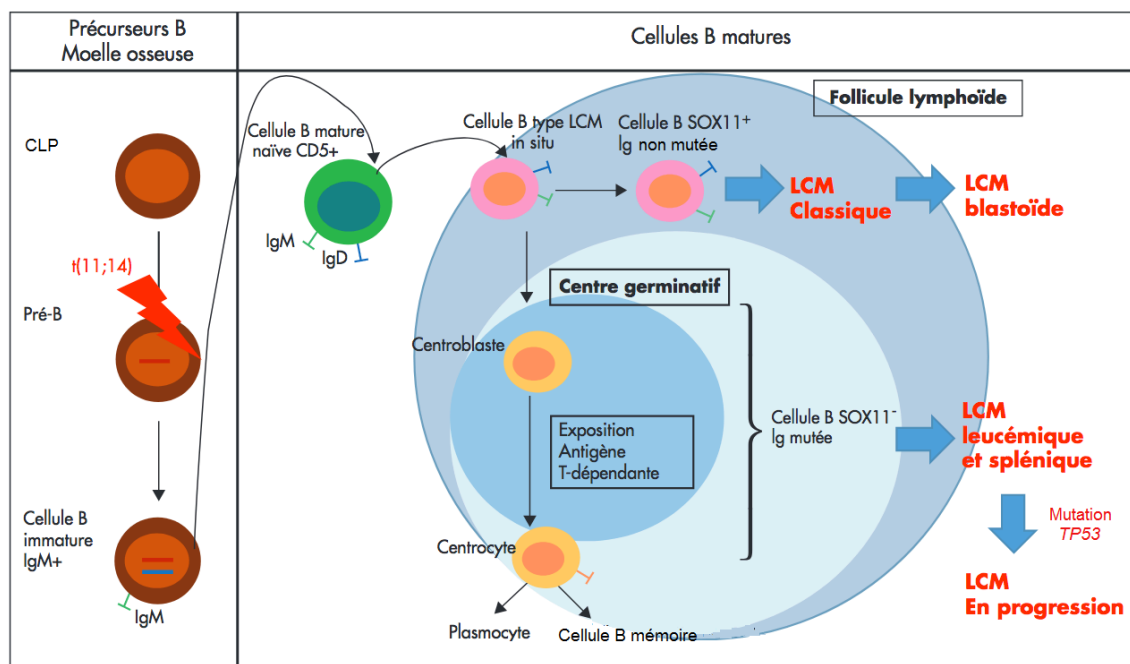


Figure 9 : Hypothèse de développement des différents sous-types de LCM. Les cellules de LCM subissent la translocation t(11;14) au stade pré-B dans la moelle osseuse puis colonisent la zone du manteau dans les OLS. Il se distingue trois sous types de LCM : la forme commune (ou classique), les formes blastoïde et pléomorphe et la forme leucémisée non-ganglionnaire. D'après Lamarque, 2014.

Ces dernières années, plusieurs travaux ont enrichi les connaissances sur les mécanismes impliqués dans l'expression différentielle de *SOX11* selon les différents sous-types de LCM. Parmi ces études majeures, Queirós et al. ont analysé les régions différentiellement méthylées dans les cellules de LCM en comparaison aux CSH. La grande majorité de ces régions est impliquée dans la différenciation lymphocytaire B normale. En revanche, d'autres régions hypométhylées fonctionnelles sont partagées par plusieurs échantillons primaires de LCM. Parmi ces régions les auteurs ont identifié une séquence enhancer hypométhylée à une distance de 650 kb du promoteur de *SOX11*. L'analyse de la structure chromatinienne du locus de *SOX11* a démontré que cette région enhancer interagissait avec la région promoteur de l'oncogène pour permettre sa transcription (Queirós et al., 2016) (**Figure 10A**). Mohanty et al ont mis en évidence deux autres systèmes de régulation de *SOX11*. Cette étude démontre d'une part que la cycline D1 interagit et séquestre des éléments régulateurs négatifs du gène *SOX11* à savoir les histones désacétylases HDAC1 et HDAC2. D'autre part, ces travaux montrent que le facteur de transcription STAT3 peut fixer une région du gène *SOX11* et un de ses enhancer pour inhiber sa transcription (Mohanty et al., 2019) (**Figure 10B**). Ces observations sont en cohérence avec une activation de STAT3 supérieure dans le sous-type leucémisé non-ganglionnaire (Baran-Marszak et al., 2010).

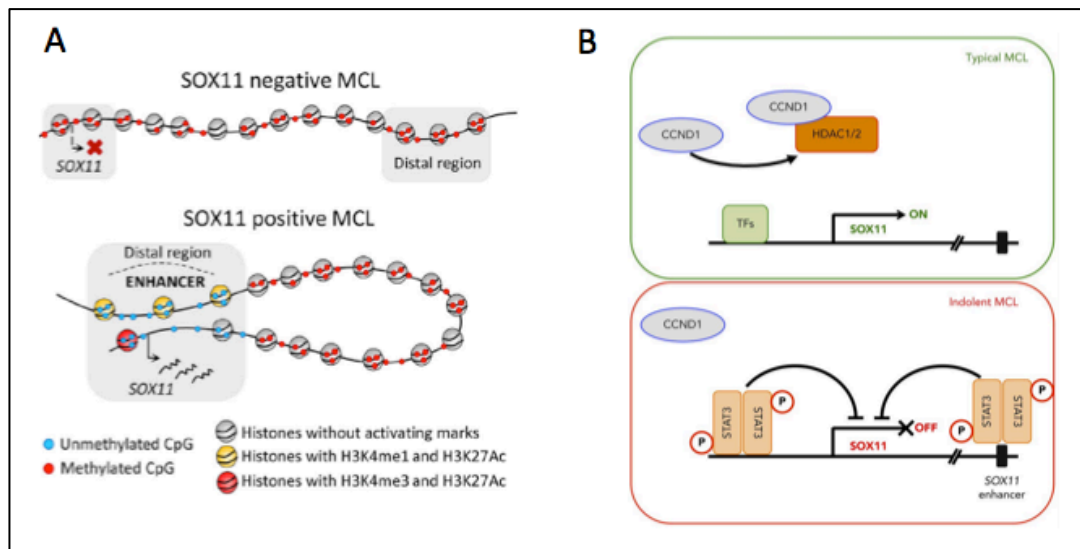


Figure 10 : Les différents mécanismes impliqués dans la régulation de *SOX11* dans le LCM. (A) Dans les cas des LCM *SOX11*⁻, les régions promotrices et enhancer de *SOX11* sont hyperméthylés empêchant la transcription du gène. Dans les cas *SOX11*⁺, ces deux régions sont hypométhylées et se rejoignent spatialement pour une transcription du gène. D'après Queirós et al., 2016. **(B)** Dans les cas *SOX11*⁺, la cycline D1 séquestre les protéines régulatrices inhibitrices de *SOX11*, HDAC1 et HDAC2 pour une transcription du gène. A l'inverse dans les cas *SOX11*⁻, STAT3 se fixe sur les séquences régulatrices du gène ce qui aboutit à une répression de la transcription de *SOX11*. D'après Mohanty et al., 2019.

II-1-4) Les anomalies génétiques du lymphome à cellules du manteau

II-1-3-a) La translocation t(11;14)(q13;q32)

Les cellules de LCM sont caractérisées par la translocation chromosomique t(11;14)(q13;q32) qui place le gène codant pour la cycline D1 (*CCND1*) sous le contrôle d'un enhancer de la chaîne lourde des Ig menant à une expression aberrante de la cycline D1 et une dérégulation du cycle cellulaire (Swerdlow et al., 2016). Cet événement survient lors de la recombinaison VDJ du gène de la chaîne lourde des Ig dans la moelle osseuse. La cycline D1 est une protéine impliquée dans le cycle cellulaire et contrôle le passage des cellules de la phase G1 à la phase S (**Figure 11**). En effet, durant la phase G1, la cycline D1 se lie aux protéines kinases dépendantes des cyclines CDK4 et CDK6 et forme un complexe qui phosphoryle la protéine rétinoblastome (RB). La phosphorylation de RB permet la libération du facteur de transcription E2F qui initie le passage en phase S du cycle cellulaire c'est à dire la réplication de l'ADN (Sherr, 1996).

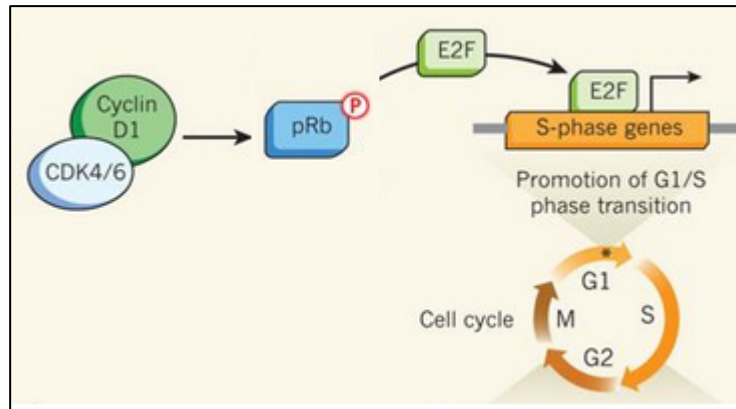


Figure 11 : La cycline D1 dans le cycle cellulaire. La cycline D1 interagit avec les kinases CDK4/6 pour induire la phosphorylation de la protéine RB. Ainsi, le facteur E2F est libéré pour initier la transcription de gènes impliqués dans la phase S du cycle cellulaire. D'après Bartek and Lukas, 2011.

La translocation $t(11;14)(q13;q32)$ est présente dans une très grande majorité des LCM (99% des cas), cependant certains cas négatifs pour la cycline D1 ont été observés (1% des cas) (Royo et al., 2011). Ces derniers possèdent les mêmes caractéristiques histologiques et phénotypiques que les LCM positifs pour la cycline D1 et présentent dans leur majorité des réarrangements impliquant les gènes codant pour la cycline D2 (*CCND2*) et la cycline D3 (*CCND3*) (Salaverria et al., 2013) (Martín-Garcia et al., 2019).

II-1-3-b) Les anomalies génétique secondaires

La translocation chromosomique $t(11;14)(q13;q32)$ est un événement majeur du LCM mais n'est pas suffisante à l'apparition de la pathologie. Les modèles murins surexprimant la cycline D1 associent une surexpression de *MYC* ou une déficience dans l'expression de *BCL2L1* pour la génération de modèles tumoraux et argumentent l'implication d'anomalies génétiques secondaires dans la pathogénèse du LCM (Bodrug et al., 1994; Lovec et al., 1994; Katz et al., 2014). Les altérations génétiques secondaires des cellules primaires humaines de LCM ont été mises en évidence par les technologies de séquençage de nouvelles générations telles que le séquençage d'exomes, « whole exome sequencing » (**Figure 12**). Il est fréquemment décrit des mutations sur des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN comme *ATM* (40-50%) ou *TP53* (14-28%). En plus d'être transloqué, le gène *CCND1* est également souvent muté. Sans être exhaustif, des mutations sur des gènes tels que *MLL2*, *MEF2B*, *BIRC3* ou *NOTCH1* sont aussi décrites (Beà et al., 2013; Meissner et al., 2013; Zhang et al., 2014). En plus des mutations, il est décrit des délétions

des gènes *CDKN2A* (délétion 9p), *TP53* (délétion 17p) ou encore *RB1* (délétion 13q) et des gains de copies du gène *MYC* (Royo et al., 2011; Delfau-Larue et al., 2015). A ce jour, seules les délétions de *CDKN2A* et les anomalies de *TP53* sont associées à un mauvais pronostic (Halldórsdóttir et al., 2011; Delfau-Larue et al., 2015; Eskelund et al., 2017).

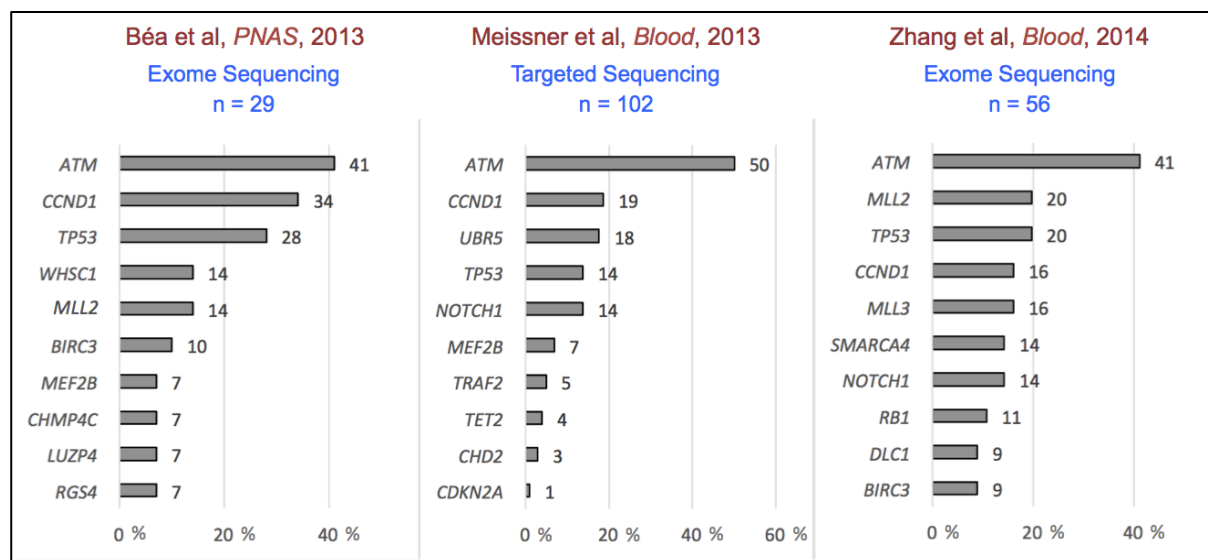


Figure 12 : Profil mutationnel des cellules primaires de LCM. Les cellules de LCM présentent fréquemment des mutations sur des gènes tels que *ATM*, *CCND1*, *TP53* selon trois principales études utilisant des techniques de séquençage. D'après Beà et al., 2013; Meissner et al., 2013; Zhang et al., 2014.

II-2) Prise en charge thérapeutique

II-2-1) Première ligne

Brièvement, pour les patients atteints de LCM agressif, le régime thérapeutique en première ligne diffère selon l'âge. Pour les patients jeunes (< 65 ans) le traitement repose sur une induction par chimiothérapie incluant de la cytarabine associée à l'anti-CD20 rituximab (R), suivie d'une autogreffe puis d'un entretien au rituximab (Hermine et al., 2016; Le Gouill et al., 2017). Pour les sujets âgés (> 65 ans) le traitement de référence repose sur une chimiothérapie associée au rituximab tels que R-CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone) ou à base de bendamustine, suivi d'un traitement d'entretien par rituximab (Kluin-Nelemans et al., 2012; Dreyling et al., 2017).

Les patients atteints de LCM cliniquement indolent sont sujets à une surveillance jusqu'à évolution de la maladie où ils sont traités en première ligne sous le même arbre décisionnel.

II-2-2) Rechutes et patients réfractaires

Les patients de LCM présentent toujours des rechutes et leur prise en charge n'est pas uniforme. Actuellement, quatre molécules sont approuvées dans le traitement des rechutes dans le LCM. Le temsirolimus est un inhibiteur de mTOR, une protéine impliquée dans la prolifération des cellules et activée par la voie BCR. Cette molécule est approuvée dans le traitement du LCM en rechute (Hess et al., 2009). Le bortézomib est un inhibiteur du protéasome ciblant indirectement la voie NF- κ B et qui a montré son efficacité dans les LCM réfractaire ou en rechute (taux de réponse global (ORR) : 33% et réponse complète (CR) : 8%) (Goy et al., 2009). Le lénalidomide est un immunorégulateur qui a montré des résultats intéressants en agent seul (ORR : 28% et CR : 7,5%) (Goy et al., 2013). Enfin, l'ibrutinib est un inhibiteur de la protéine Bruton Tyrosine Kinase (BTK) essentielle dans la signalisation BCR a montré une efficacité remarquable avec une ORR de 68% et une CR de 21% (M. L. Wang et al., 2013).

II-3) Les voies de signalisation majeures dans le lymphome à cellules du manteau

II-3-1) La voie du récepteur B

II-3-1-a) La signalisation BCR

La voie de signalisation du BCR est cruciale pour le développement, la survie, la prolifération et la maturation des lymphocytes B (Niiri and Clark, 2002). Le BCR est composé d'une Ig constituée de deux chaînes lourdes associées à deux chaînes légères liées entre elles par des liaisons covalentes. Les protéines de transduction du signal Ig α et Ig β (CD79A et CD79B) sont associées à l'Ig pour former un récepteur B fonctionnel. Lors d'une activation du BCR par un antigène, les motifs ITAMs (« immunoreceptor tyrosine based-activation motifs ») cytoplasmiques des molécules de transduction sont phosphorylés par des protéines SRC kinases (LYN, FYN et BLK). Les protéines transductrices phosphorylées recrutent la

protéine kinase SYK qui recrute à son tour d'autres protéines pour former le signalosome. Le signalosome est composé de différentes protéines dont BTK. Une fois formé, le signalosome recrute la PLC γ 2 qui catalyse le PIP2 en IP3 et en DAG afin d'augmenter le calcium intracellulaire et d'activer la PKC (Rickert, 2013).

En parallèle de cette cascade d'activation du BCR, d'autres molécules membranaires interviennent dans cette voie tel que le corécepteur CD19. Le CD19 est phosphorylé par une protéine SRC kinase et recrute la PI3K. Cette dernière va participer à la formation du signalosome et à l'activation de la voie AKT/mTOR (Molina-Cerrillo et al., 2017)(Young and Staudt, 2013).

En conséquence de cette stimulation de la voie BCR, différentes voies sont activées, dont les voies NF- κ B, NFAT et MAPK ou encore Ras (Burger and Wiestner, 2018). Il s'ensuit la transcription de gènes impliqués dans la survie ou la prolifération des lymphocytes B (**Figure 13**).

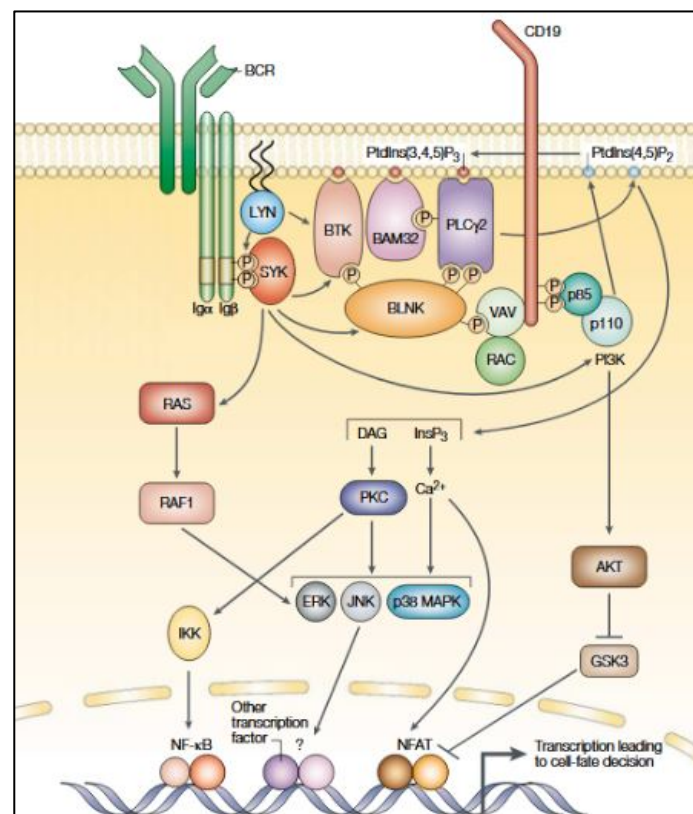


Figure 13 : La signalisation du récepteur B (BCR). L'activation du BCR induit une cascade de signalisation impliquant essentiellement des protéines kinases pour la formation d'un signalosome. Il en résulte l'activation des voies RAS, AKT/mTOR, NF- κ B et NFAT pour promouvoir la prolifération, la survie et la différenciation des lymphocytes B. D'après Niir and Clark, 2002.

L'activation de la voie BCR peut être dépendante de l'antigène : c'est une activation chronique qui se réalise par exemple lors d'une réponse immunitaire humorale avec la génération des CG. L'activation chronique engage les lymphocytes B dans de multiples voies de signalisation et notamment la voie NF- κ B.

De plus, les cellules B matures activent leur BCR indépendamment de la présence d'un antigène pour obtenir un signal de survie : c'est une activation tonique. Dans le cas de l'activation tonique seule la voie PI3K est activée (Kraus et al., 2004; Young and Staudt, 2013) (**Figure 14**).

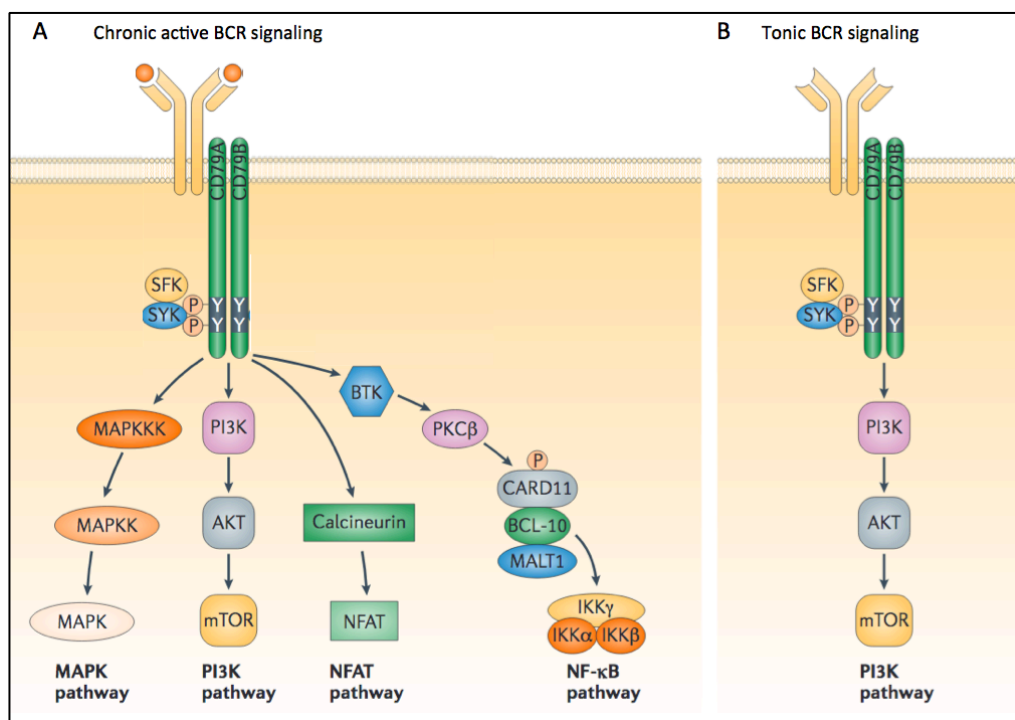


Figure 14 : L'activation du BCR peut générer deux types de signal. (A) L'activation chronique implique un antigène et induit l'activation de nombreuses voies de signalisation telles que les voies MAPK, PI3K, NFAT et NF- κ B. (B) L'activation tonique est indépendante de l'antigène et induit la voie de signalisation PI3K. D'après Young and Staudt, 2013.

II-3-1-b) La voie BCR : une voie de survie dans le LCM

L'efficacité des inhibiteurs du BTK notamment l'ibrutinib dans les traitements du LCM témoigne de l'importance de la voie BCR dans la pathologie (M. L. Wang et al., 2013). Les altérations génétiques impactant directement les gènes de la voie BCR sont rares dans le LCM. En effet, contrairement à d'autres LNH peu de mutations de *CD79A* sont recensées dans les cellules primaires de LCM (Beà et al., 2013). En revanche, il est décrit des amplifications du gène *SYK* dans des lignées et des cellules primaires de LCM ainsi que des mutations acquises *de novo* de *BTK* chez des patients traités avec l'ibrutinib (Rinaldi et al., 2006; Chiron et al., 2014).

De plus, indépendamment de ces altérations génétiques, des analyses de phosphoprotéomique ont décrit une activation constitutive de la voie BCR dans le LCM. L'ensemble des protéines de la voies BCR sont phosphorylées à l'état basal dans les lignées et les SRC kinases SYK, LYN ainsi que la protéine du signalosome BLNK sont activées dans les tissus tumoraux ganglionnaires (Pighi et al., 2011). Plus récemment, il a été constaté des niveaux élevés de phospho-SYK, phospho-PLC γ 2 et de phospho-AKT mais le profil d'activation de la voie BCR est très hétérogène selon les échantillons de patients et semble dépendre du niveau d'expression du CD79 (Myklebust et al., 2017).

Les lignées et les échantillons primaires de LCM ont une voie BCR constitutivement active mais peu d'informations indiquent la nature moléculaire de cette activation. L'étude transcriptionnelle des cellules primaires de LCM montre une activation de la voie BCR associée à une activation de la voie NF- κ B dans les ganglions de patients comparé au sang périphérique. Cette observation plaide en faveur de la présence d'une activation « chronique » de la voie BCR et donc dépendante d'un antigène (Young and Staudt, 2013; Saba et al., 2016). En effet, bien que le LCM soit défini comme une hémopathie du lymphocyte B naïf, plus de 70% des cellules de LCM sont mutées (au moins 1 mutation) dans la région *IGHV* et 14% sont fortement mutées (<97%) comparé à la lignée germinale. Cette même étude montre une surreprésentation de certains réarrangements *IGHV* dans le LCM suggérant le rôle d'un auto-antigène récurrent (Hadzidimitriou et al., 2011). Depuis cette étude, peu de travaux ont identifiés des auto-antigènes responsables de l'activation chronique de la voie BCR. Les auto-antigènes dans le LCM décrits sont la vimentine ou la protéine LRPAP1 (Cha et al., 2013; Khodadoust et al., 2017; Thurner et al., 2019).

II-3-2) La voie NF- κ B

II-3-2-a) La signalisation NF- κ B

La voie NF- κ B joue un rôle dans de nombreux mécanismes biologiques et dans quasiment tous les types cellulaires. Il existe deux voies d'activation de NF- κ B, la voie classique et la voie alterne, qui mènent à l'activation des facteurs de transcription de NF- κ B et permettent l'expression de nombreux gènes cibles. Cette voie est activée par plusieurs stimuli le plus souvent inflammatoires comme le BAFF, le TNF ou le CD40L dans les lymphocytes B. La voie classique (ou canonique) met en jeu NF- κ B1 (ou RelA/p50) et la voie alterne (non-canonique), NF- κ B2 (ou RelB/52) (Perkins, 2012).

L'activation de la voie classique de NF- κ B commence par la fixation d'un ligand sur son récepteur qui va recruter des protéines adaptatrices telles que les protéines TRAF. La transduction du signal mène à la phosphorylation et à l'activation des I κ B kinases (IKK). Ces IKK phosphorylent à leur tour les protéines inhibitrices de NF- κ B (I κ B) menant à la dissociation d'I κ B et de RelA/p50 (NF- κ B1). Alors que RelA/p50 est transloqué au noyau pour jouer son rôle de facteur de transcription, la protéine I κ B est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome.

La voie alterne de NF- κ B mobilise la protéine NIK qui phosphoryle IKK α . La kinase IKK α phosphoryle ensuite la protéine p100 autorisant ainsi son clivage par le protéasome. Il en résulte la protéine p52, qui, complexée à RelB est transloquée au noyau pour activer la transcription de gènes cibles (Krappmann and Vincendeau, 2016) (**Figure 15**).

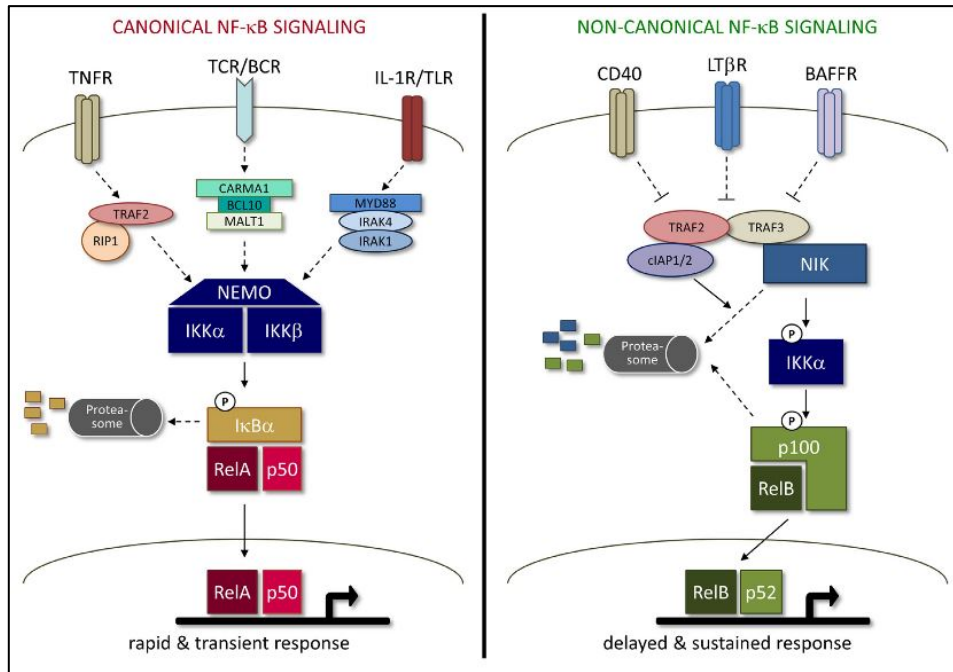


Figure 15 : Activation des voies classique et alterne de NF-κB dans les lymphocytes B. Après stimulation, l'activation de la voie NF-κB classique mobilise RelA/p50 alors que la voie alterne mobilise RelB/p52. D'après Krappmann and Vincendeau, 2016.

II-3-2-b) La voie NF-κB dans le LCM

Les voies classique et alterne de NF-κB sont constitutivement actives dans les cellules de LCM et l'inhibition des voies par différentes molécules arrête la croissance des cellules tumorales et induit leur mort spontanée (Pham et al., 2003). Différents mécanismes sont mis en évidence pour l'activation de ces voies dans le LCM et il en résulte l'expression des gènes cibles de NF-κB parmi lesquels des gènes codant pour de nombreux facteurs solubles tels que *CCL3*, *CCL4*, *TNF*, *LTA* ou *IL12B* (Saba et al., 2016).

L'étude du profil mutationnel des lignées et des cellules primaires de LCM met en évidence des mutations de *TRAF2* et *TRAF3* dans certaines lignées et des mutations de *TRAF2* dans 6% des cellules primaires. Des mutations récurrentes de *BIRC3* sont aussi décrites dans les cellules primaires de LCM. *TRAF2* et *BIRC3* sont deux protéines impliquées dans la régulation de NIK. Les mutations de *BIRC3* ont pour conséquence une accumulation de NIK et une activation constitutive de la voie alterne de NF-κB permettant la survie des cellules de LCM (Rahal et al., 2014). Des mutations inactivatrices du régulateur négatif de NF-κB, *TNFAIP3* sont également décrites (Honma et al., 2009).

Les voies BCR et NF- κ B sont intimement liées dans les cellules de LCM comme en témoigne l'influence des inhibiteurs du BCR sur la voie NF- κ B dans les cellules sensibles à l'Ibrutinib (Rahal et al., 2014). Dans les lymphocytes B, la voie du BCR mène à l'activation du complexe CBM composé de CARD11, BCL10 et MALT1. Le complexe CBM est nécessaire à l'activation des IKK dans la voie classique de NF- κ B (Juillard and Thome, 2016). Des mutations du gène *CARD11* sont décrites pour 5% des patients et des amplifications du gène sont fréquentes (Wu et al., 2016).

Le microenvironnement est également impliqué dans l'activation de la voie NF- κ B par l'intermédiaire de l'interaction CD40-CD40L ou des cellules stromales qui secrètent le facteur soluble BAFF (Medina et al., 2012; Chiron et al., 2015; Saba et al., 2016). La signalisation de BAFF permet l'activation de la voie alterne de NF- κ B qui induit la transcription des gènes cibles et notamment du gène *TNFSF13B* pour la mise en place d'une boucle autocrine (Fu et al., 2006). La stimulation du TLR4 ou de la voie STAT3 active également les voies NF- κ B dans les cellules de LCM (Molavi et al., 2013; L. Wang et al., 2013b).

L'activation constitutive des voies NF- κ B permet la survie et la prolifération des cellules de LCM mais est aussi à l'origine de la chemorésistance à la fois aux molécules de chimiothérapie et aux thérapies ciblées. Rahal et al. expliquent notamment l'activation mutuellement exclusive des deux voies de NF- κ B avec une résistance à l'Ibrutinib associée à une voie alterne constitutivement active (Rahal et al., 2014). D'autre part, notre laboratoire a montré l'influence de la voie NF- κ B dans l'induction de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL et la résistance à l'inhibiteur de Bcl-2, le Venetoclax (Chiron et al., 2015).

II-3-3) La famille Bcl-2

II-3-3-a) La voie intrinsèque (ou mitochondriale) de l'apoptose

L'apoptose (ou mort spontanée) est un processus physiologique par lequel une cellule s'engage dans une autodestruction en réponse à un signal de mort. Il existe deux principales voies de déclenchement de l'apoptose : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie extrinsèque est déclenchée par les récepteurs de mort de la famille des récepteurs TNF alors que la voie intrinsèque (ou mitochondriale) est contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2. Quelque soit la voie mobilisée les effecteurs terminaux de la mort sont les caspases (Green, 2019).

La famille Bcl-2 est subdivisée en trois groupes de protéines partageant un domaine structural d'homologie : le domaine BH3. Les protéines anti-apoptotiques, dites à multi-domaines, sont Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xL. Les protéines pro-apoptotiques dites à domaine BH3 unique (« BH3 only ») sont Bim, Bid, Bad, Bik, Noxa, Puma, Hrk et Bmf. Enfin, les protéines pro-apoptotiques à multi-domaines aussi qualifiées d'effectrices sont Bak et Bax (Letai, 2008) (**Figure 16**).

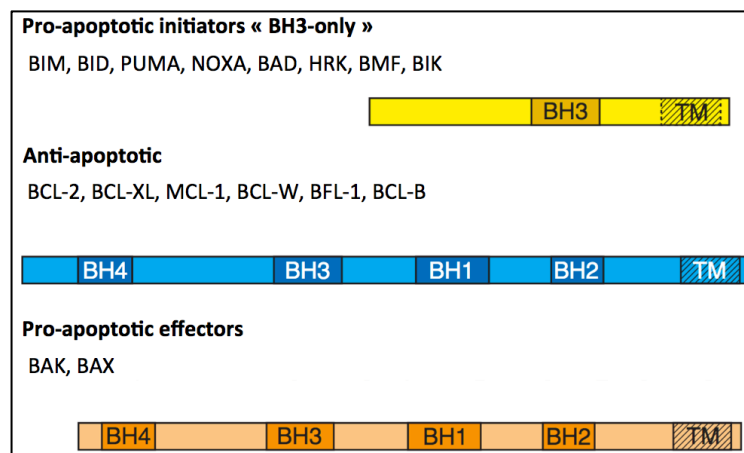


Figure 16 : Les protéines la famille Bcl-2. La famille Bcl-2 est composée de protéines anti-apoptotiques, de protéines pro-apoptotiques sensibilisatrices et de protéines pro-apoptotiques effectrices. D'après Adams and Cory, 2018.

Le destin d'une cellule pour sa survie ou son entrée en apoptose repose sur l'équilibre entre les protéines pro-apoptotiques et les protéines anti-apoptotiques. En effet, les protéines anti-apoptotiques sont capables de séquestrer les protéines pro-apoptotiques à la membrane mitochondriale externe. Lors d'un signal de mort, les protéines pro-apoptotiques « BH3 only » inhibent les protéines anti-apoptotiques et activent les protéines pro-apoptotiques effectrices Bak et Bax. Il s'ensuit l'oligomérisation des protéines effectrices Bak et Bax et la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie pour créer des pores. Par ces pores, le cytochrome C est libéré dans le cytoplasme et active l'apoptosome. L'apoptosome est composé du cytochrome C, de la protéine Apaf-1 et de la caspase 9. Enfin une chaîne d'activation des caspases avec la caspase 3 comme effecteur finalise l'apoptose par la voie mitochondriale (Singh et al., 2019) (**Figure 17**).

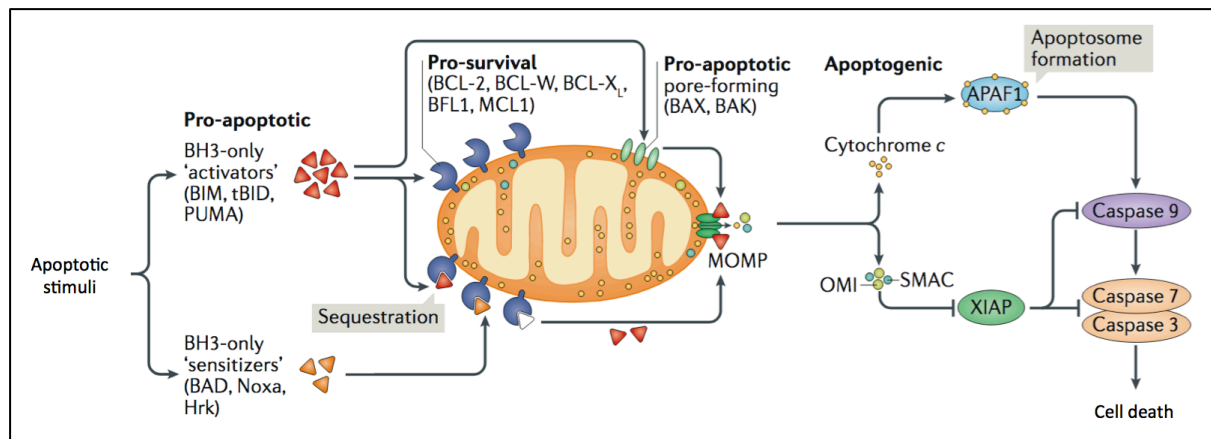


Figure 17 : La voie intrinsèque (ou mitochondriale) de l'apoptose. Après un stimulus apoptotique, les protéines pro-apoptotiques inhibent les protéines anti-apoptotiques et activent les protéines pro-apoptotiques effectrices Bak et Bax pour former des pores à la membrane externe de la mitochondrie. Le cytochrome C est libéré et induit la formation d'un apoptosome qui active les caspases et provoque la mort cellulaire. D'après Singh et al., 2019.

II-3-3-b) La famille Bcl-2 dans le lymphome à cellules du manteau

Les cellules cancéreuses sont présentes dans des niches où elles sont sujettes à de nombreux signaux de mort pouvant engendrer l'apoptose. En conséquence les cellules cancéreuses ont pour caractéristique la capacité d'échapper à l'apoptose. L'apoptose est contrôlée par des interactions complexes entre les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques et dont l'équilibre est dérégulé dans les cancers (Hanahan and Weinberg, 2011). Dans certains lymphomes, les modèles murins surexprimant la protéine Bcl-2 ou la translocation t(14;18) dans le FL témoignent de l'importance de la famille Bcl-2 (McDonnell et al., 1989; Adams et al., 2018). De plus le BH3 mimétique, Venetoclax, ciblant l'anti-apoptotique Bcl-2, a montré son efficacité dans différents LNH et notamment dans le LCM en agent seul avec une ORR 75% et des CR 21% (Davids et al., 2017).

Les cellules de LCM expriment fortement les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL et expriment faiblement les protéines pro-apoptotiques et notamment les protéines effectrices Bak et Bax comme observé dans des biopsies ganglionnaires par immunohistochimie (IHC) (Agarwal and Naresh, 2002). Ces résultats sont aussi observés à l'échelle transcriptomique avec également une faible expression des protéines de l'apoptosome telles que la caspase 9 et le cytochrome C (Hofmann et al., 2001). Récemment, il a été décrit une surexpression des gènes anti-apoptotiques *BCL2*, *BCL2L1* (codant pour Bcl-xL) mais aussi *BCLW* dans les cellules de LCM comparées à des lymphocytes B normaux (Adams et al., 2017).

Peu d'altérations génétiques expliquent les surexpressions des gènes de la famille Bcl-2. Alors qu'il est décrit des délétions du gène *BCL2L11* codant pour la protéine pro-apoptotique Bim dans une grande majorité des lignées cellulaires, il n'en est pas décrit dans les cellules primaires (Tagawa et al., 2005). De plus, la surexpression de la cycline D1 dans les lymphocytes B murins ne permet pas l'apparition d'un LCM, mais l'association avec une délétion de *BCL2L11* mène au développement d'un lymphome avec une expansion des cellules B de la zone du manteau de la rate (Katz et al., 2014). L'ensemble de ces études montre l'importance de Bim dans la pathologie du LCM. Parmi les autres anomalies génétiques de la famille Bcl-2, une étude récente montre l'émergence de clones avec une perte des amplifications du gène *BCL2* après traitement au Venetoclax dans des lignées et des cellules primaires de LCM (Zhao et al., 2019).

L'absence de mutations fréquentes des gènes de la famille Bcl-2 dans les cellules primaires de LCM montre que leur expression est régulée par d'autres mécanismes. Les mécanismes épigénétiques semblent jouer un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes pro-apoptotiques. Le gène *BCL2L11* (codant pour Bim) est réprimé par l'expression des miRNA 181a et 17-92, *BIK* par méthylation et *PMAIP1* codant pour Noxa par l'histone H2A (Lwin et al., 2010; Rao et al., 2012; M. L. Wang et al., 2013; Brosseau et al., 2014). De plus, la régulation de l'ensemble des protéines pro-apoptotiques semble dépendante de l'acétylation de leur promoteur respectif comme en témoigne leur induction après traitement avec un inhibiteur des histones désacétylases, le Vorinostat (Xargay-Torrent et al., 2011).

Notre laboratoire a pu montrer l'impact du microenvironnement sur la régulation des anti-apoptotiques et notamment de l'interaction CD40/CD40L qui induit une surexpression de Bcl-xL. De plus, alors que les cellules primaires du sang périphérique sont sensibles au Venetoclax (Dose Létale 50 < 10nM) les cellules primaires stimulées par le CD40L acquièrent une résistance. Le ratio d'expression d'ARN *BCL2* / (*BCL2L1* + *MCL1*) est prédictif de la réponse au Venetoclax (Chiron et al., 2015). Récemment, les premiers essais de la combinaison entre le Venetoclax et un inhibiteur de Mcl-1 (le S63845) dans des modèles de xénogreffes de cellules primaires de patients dans des souris (PDX) montrent des réponses synergiques par rapport aux molécules seules (Prukova et al., 2019).

III) Microenvironnement du lymphome à cellules du manteau

III-1) Arguments sur le rôle du microenvironnement

L'étude du microenvironnement tumoral est aujourd'hui un axe majeur de recherche en cancérologie. En effet, il est désormais admis que les cellules tumorales communiquent et éduquent leur microenvironnement pour qu'il favorise leur survie, leur prolifération et leur chemorésistance (Hanahan and Weinberg, 2011). Les hémopathies B, dont le LCM, n'échappent pas à cette logique (Amé-Thomas and Tarte, 2014; Burger and Gribben, 2014; Puente et al., 2018).

Le LCM doit son nom à son site d'expansion : la zone du manteau qui entourent les CG dans les OLS. Cependant, les cellules de LCM se disséminent précocement dans la moelle osseuse, le sang périphérique ou encore le tractus gastro-intestinal (Argatoff et al., 1997). Ces différentes niches tumorales sont le lieu de dialogues entre les cellules cancéreuses et les cellules accessoires. Parmi ces dernières, la présence dans les ganglions de cellules immunitaires et de cellules mésenchymateuses est décrite. Ces dialogues s'opèrent par l'intermédiaire de molécules de surface et de facteurs solubles (Burger and Ford, 2011; Papin et al., 2018; Puente et al., 2018). Récemment, il a été montré que l'activation des voies BCR et NF- κ B ainsi que la prolifération des cellules tumorales étaient restreintes aux ganglions et réduites dans le sang périphérique confirmant l'importance du microenvironnement dans l'activation des voies de survie dans le LCM (Saba et al., 2016).

De plus, la mort spontanée des cellules primaires de LCM isolées, le nombre limité de lignées cellulaires ainsi que la difficulté de développement de modèles animaux sont autant d'arguments qui montrent l'intérêt d'étudier le microenvironnement dans le LCM et plus largement dans les hémopathies B.

III-2) Les niches tumorales du LCM

III-2-1) Construction de la niche tumorale du LCM : implication d'un réseau de chemokines

La niche tumorale est organisée par un réseau de chemokines qui permet d'une part de retenir les cellules de LCM dans leur niche et d'autre part d'attirer de nouvelles cellules tumorales et des cellules accessoires (Franciszkiewicz et al., 2012).

L'étude des récepteurs de chemokines à la surface des cellules de LCM montre une expression du CCR5, du CCR6, du CCR7, du CXCR4 et du CXCR5 (Trentin et al., 2004). La migration des cellules de LCM est contrôlée par le CXCL12, le CXCL13 et le CCL19 qui se lient respectivement aux récepteurs CXCR4, CXCR5 et CCR7. De plus, alors que le CXCL12 est un chemoattractant commun aux cellules de LCM et aux cellules B normales, le CCL19 est spécifiquement impliqué dans la rétention/migration des cellules tumorales (Corcione et al., 2004; Kurtova et al., 2009). En revanche, contrairement à la LLC, les chemokines ligands du CXCR3 semblent peu impliquées dans la chemoattraction des cellules de LCM (Trentin et al., 1999; Jones et al., 2000).

D'autre part, les cellules de LCM, surexpriment le CCL4, décrit pour être un chemoattractant des monocytes, ainsi que le CCL5 et le TNFSF9, impliqués dans les interactions avec les lymphocytes T, par rapport à des lymphocytes B normaux (Ek et al., 2006). Le CCL17 et le CCL22, décrit pour attirer les lymphocytes T, ont également été détectés dans le plasma de patients (Chang et al., 2013). Enfin, les concentrations plasmatiques élevées des chemokines CXCL8 et CCL4 corréleront avec un mauvais pronostic clinique (Sonbol et al., 2014).

III-2-2) Les lymphocytes T

Lors de la réponse immunitaire humorale T-dépendante, les lymphocytes T coopèrent étroitement avec les lymphocytes B. Ces interactions privilégiées vont également jouer les premiers rôles dans le microenvironnement du LCM et plus généralement dans l'ensemble des LNH (Pham et al., 2005; Amé-Thomas et al., 2015).

Dans le sang périphérique, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ ainsi que le ratio CD4/CD8 au diagnostic corréleront positivement avec la survie (X.-Y. Zhang et al., 2016). Dans les ganglions, les lymphocytes T représentent environ 15% des cellules totales et un fort ratio CD4:CD8 prédit également une meilleure survie indépendamment du score MIPI (Nygren et al., 2014). Les lymphocytes T régulateurs CD4⁺ CD25⁺ sont connus pour leur rôle protumoral, et sont nombreux dans les LNH et notamment dans le LCM (Yang et al., 2006). Cependant la complexité et la diversité du phénotype des lymphocytes T exigent de nouvelles études pour caractériser précisément le compartiment T des niches tumorales du LCM.

Différents couples de molécules sont impliquées dans les interactions entre les lymphocytes B et les lymphocytes T dont certains ont été identifiés comme des signaux protumoraux dans le LCM. En effet, le CD40L, exprimé par les cellules T, induit la survie et la prolifération des

cellules primaires de LCM *ex vivo* (Andersen et al., 2000; Castillo et al., 2000; Visser et al., 2000; Chiron et al., 2015). L'engagement de la voie du CD40L permet l'activation de la voie classique et alterne de NF- κ B importante dans la prolifération et la chemorésistance du LCM (Chiron et al., 2015; Jayappa et al., 2017; Rauert-Wunderlich et al., 2018). Il est à noter la présence de CD40L soluble à une concentration élevée dans le sang périphérique de patients comparée à des donneurs sains (Hock et al., 2006). De plus, les lignées et les cellules de LCM expriment la molécule PD-L1 qui inhibe l'action cytotoxique des lymphocytes T et participe à l'échappement tumorale vis-à-vis du système immunitaire *in vitro* (L. Wang et al., 2013a). Cette expression de PD-L1 est induite par une activation par le CD40L avec l'ajout d'IFN γ *ex vivo*. Un traitement avec un inhibiteur de BTK atténue l'expression de PD-L1 sur les cellules de LCM (Harrington et al., 2019). Ces interactions avec les lymphocytes T nécessitent une proximité spatiale entre les deux types cellulaires ce qui a été observé dans un modèle de PDX (Iyengar et al., 2016).

III-2-3) Les macrophages

Le nombre d'études montrant un rôle des monocytes / macrophages dans le LCM est très limité. Ils sont pourtant présents dans les ganglions tumoraux de patients et caractérisés par l'expression du CD68 et du CD163 (Hermann et al., 1998; Koh et al., 2014) (**Figure 18**). De plus, les cellules myéloïdes semblent jouer un rôle dans la survie et la prolifération des cellules tumorales. Les cellules de LCM circulantes mises en culture *in vitro* ont observé une croissance tumorale grâce à des interactions avec les macrophages autologues. Ces conditions de culture ont permis la génération de nouvelles lignées de LCM (Pham et al., 2015). La survie et la prolifération des cellules de LCM dépendantes des macrophages *in vitro* sont privilégiées en milieu hypoxique dans ce modèle (Pham et al., 2018). Cependant, la mécanistique mise en jeu dans ces interactions entre les cellules tumorales et les macrophages est inconnue. Seule une étude montre l'expression de VEGF-C par les macrophages avec un rôle dans la lymphangiogenèse et en conséquence dans la progression du LCM dans un modèle de xénogreffe de souris (Song et al., 2013).

Dans le sang périphérique, le nombre absolu de monocytes circulants (AMC) est corrélé positivement avec une mauvaise survie indépendamment du MIPI (Porrata et al., 2013; von Hohenstaufen et al., 2013; Koh et al., 2014).

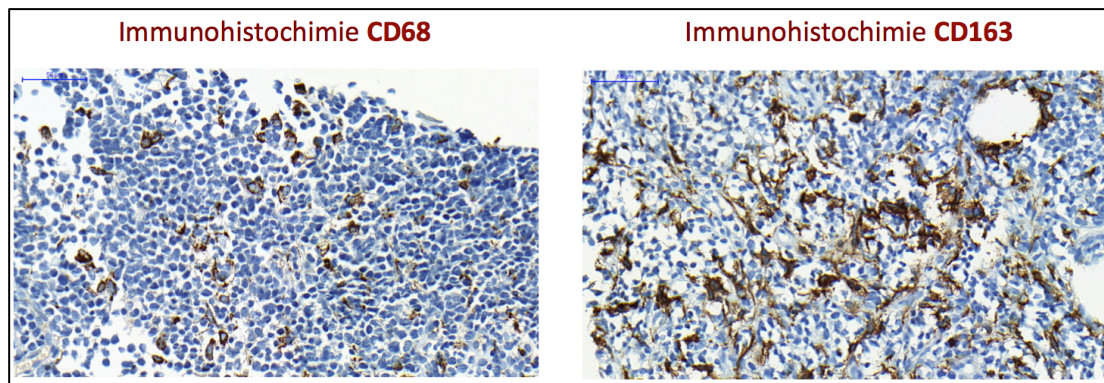


Figure 18 : Présence de macrophages dans les ganglions d'un patient atteint de LCM. Les macrophages sont identifiés par IHC CD68 et CD163. D'après Koh et al., 2014.

III-2-4) Les cellules d'origine mésenchymateuse

Dans les ganglions, les deux principaux types de cellules stromales d'origine mésenchymateuse sont les cellules dendritiques folliculaires (CDF) et les cellules réticulaires. Les cellules mésenchymateuses ont pour rôle de retenir et structurer les lymphocytes B dans les OLS (Lamaison and Tarte, 2019).

Les cellules mésenchymateuses maintiennent les cellules de LCM dans les ganglions par l'intermédiaire du facteur soluble CXCL12 et par la molécule d'adhésion ICAM-1 qui se lie à la protéine VLA-4 exprimée par les cellules tumorales. Ces signaux extrinsèques sont également impliqués dans la survie des cellules de LCM tout comme le BAFF sécrété par ces cellules mésenchymateuses (Kurtova et al., 2009; Medina et al., 2012). La rétention des cellules tumorales semble également impliquée la molécule d'adhésion JAM-C comme décrit dans un modèle de xénogreffe de souris (Doñate et al., 2016).

Les CDF expriment un faible niveau de CD23, CD35 et CD54 dans les ganglions de patients atteints de LCM par rapport à des ganglions réactionnels suggérant des différences fonctionnelles (Jin et al., 2011). De plus, l'analyse de la distribution spatiale des CDF dans les biopsies de LCM distingue deux groupes de patients. Certains patients ont un profil de CDF diffus et sont associés à une mauvaise survie en comparaison à des patients avec un profil de CDF nodulaire (Schrader et al., 2006) (**Figure 19**). D'autre part, les CDF supportent la survie des cellules de LCM. Au contact des CDF, les cellules de LCM augmentent leur expression en miRNA 181a, menant à une diminution du pro-apoptotique Bim. Ce mécanisme est également mis en jeu dans la chemorésistance des cellules tumorales (Lwin et al., 2010).

Les cellules stromales d'origine mésenchymateuse sont impliquées dans les mécanismes de chemorésistance associée à l'adhésion souvent appelé CAM-DR (« *Cell Adhesion Mediated Drug Resistance* »). Effectivement, l'adhésion par l'interaction ICAM-1/VLA-4 active les voies ERK, AKT et NF- κ B et induit une chemorésistance à des agents de chimiothérapie comme la fludarabine et la cyclophosphamide (Kurtova et al., 2009). Le CAM-DR est également observé pour les inhibiteurs du protéasome comme le bortézomib qui augmente l'expression du CXCR4 favorisant la rétention et la résistance du LCM (Chen et al., 2016).

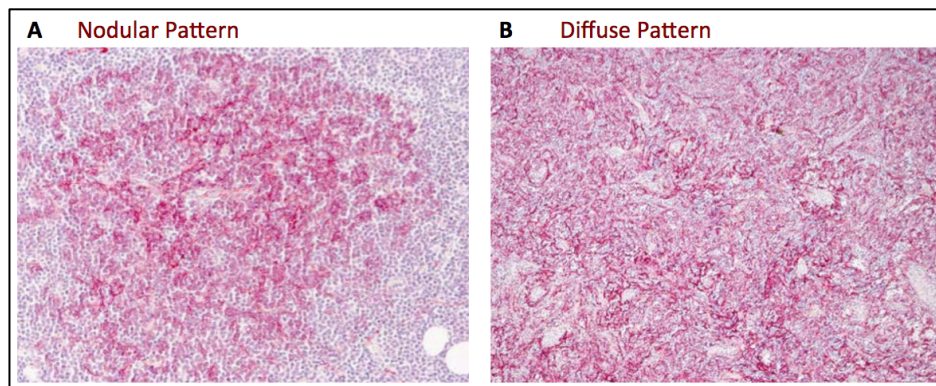


Figure 19 : Présence de CDF dans les ganglions d'un patient atteint de LCM. (A) Distribution des CDF avec un profil nodulaire identifiée par IHC avec un marquage Ki-M4P. **(B)** Distribution des CDF avec un profil diffus par IHC avec un marquage Ki-M4P. D'après Schrader et al., 2006.

III-2-5) Facteurs solubles

En plus des contacts directs entre les cellules du microenvironnement et les cellules de LCM, les facteurs solubles jouent un rôle majeur dans la survie et la prolifération des cellules tumorales ainsi que dans la rééducation du microenvironnement au profit de la tumeur. Ces facteurs solubles sont présents dans les différentes niches tumorales et peuvent être sécrétés par les cellules tumorales ou par les cellules accessoires.

Dans le sang périphérique, des concentrations élevées de cytokines et chemokines sont décrites chez les patients comme celles en IL-12, en CXCL10, en CXCL8, en CCL3 ou encore en CCL4. Les hautes concentrations en CXCL8, CCL3 et CCL4 sont associées à une mauvaise survie (Sonbol et al., 2014). Contrairement à ce qui est observé dans d'autres LNH, ces concentrations ne corréleront pas avec une surreprésentation d'un type cellulaire dans le sang périphérique par exemple l'AMC (Binder et al., 2017). Cette observation

interroge sur la nature des cellules productrices de ces facteurs solubles (Binder et al., 2017).

Dans les cellules de LCM, la signalisation BCR joue un rôle majeur dans les sécrétions de cytokines. La stimulation du BCR mène à une sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8, d'IL-10 de TNF α et de VEGF α confirmant ainsi l'importance de cette voie de signalisation dans la pathologie. Ces sécrétions sont inhibées par un traitement avec l'inhibiteur du BTK Ibrutinib *in vitro* et *in vivo* (Chang et al., 2013; Bernard et al., 2015). Ces cytokines semblent sécrétées classiquement mais les cellules de LCM produisent également des exosomes (Hazan-Halevy et al., 2015). En revanche, le contenu de ces exosomes est inconnu.

Les cellules mésenchymateuses sont décrites pour sécréter du CXCL12, du CXCL13 et du BAFF impliqués dans la survie et la prolifération des cellules de LCM (Medina et al., 2012). En plus de ces cellules, peu d'autres acteurs de la niche tumorale sont décrits pour leur sécrétion dans le LCM. Une description plus fine des cellules de la niche tumorale et de leurs productions respectives permettra une meilleure compréhension des dialogues paracrins mis en jeu. Par exemple, l'implication des macrophages, connus pour être des usines de production de facteurs solubles, ne sont pas décrits dans le microenvironnement du LCM et restent à étudier.

Différents facteurs solubles sont décrits pour jouer un rôle dans la survie, la prolifération et la chimiorésistance des cellules tumorales. L'activation du récepteur CXCR4 par son ligand CXCL12 induit les voies MAPK et permet la survie des cellules de LCM (Kurtova et al., 2009). De plus, l'axe CXCR4 est important dans la résistance au bortézomib qui s'associe avec une surexpression de ce récepteur (Chen et al., 2016). D'autres cytokines permettent la survie et potentialisent la prolifération CD40L dépendante parmi lesquelles l'IL-6, l'IL-10 ou l'IL-4 (Castillo et al., 2000; Visser et al., 2000; Zhang et al., 2012). Bien que l'IL-4 soit utilisée dans plusieurs études, sa pertinence semble limitée dans le LCM. En effet, l'ajout d'IL-4 induit fortement la protéine CD23 alors que le LCM est caractérisé par une absence d'expression de ce marqueur *in vivo* (Dorfman and Pinkus, 1994). L'IL-6 comme l'IL-10 activent la voie STAT3 notamment par des sécrétions autocrines dans les cellules primaires et les lignées de LCM. De plus, l'inhibition des voies JAK/STAT altère la survie et la prolifération des cellules de LCM (Lai et al., 2003; Baran-Marszak et al., 2010). L'activation de STAT1 est également observée et pourrait être induite par l'IFN γ qui n'est pas étudié dans le LCM (Myklebust et al., 2017). Les voies JAK/STAT peuvent être inhibées par les protéines SOCS. Des mutations inactivatrices du gène *SOCS1* (6%) sont observées dans les cellules primaires de LCM (Mottok et al., 2009). De plus, *SOCS3* est rarement exprimée dans le LCM en conséquence de l'hyperméthylation de son gène et sa restauration provoque une inhibition la voie STAT3 mais aussi de la voie NF- κ B (Molavi et al., 2013). En plus de la

voie STAT3, l'IL-6 peut induire la voie PI3K et la voie classique de NF- κ B et permet une survie des cellules tumorales dans des conditions de stress (Zhang et al., 2012; H. Zhang et al., 2016). Le BAFF, important pour le développement des lymphocytes B normaux joue également un rôle protumoral dans le LCM par induction de la voie alterne de NF- κ B (Fu et al., 2006; Medina et al., 2012).

En plus de ces cytokines bien décrites dans le LCM, d'autres facteurs solubles jouent un rôle potentiel de pro-survie dans le LCM tels que l'IL-21, le VEGF ou l'IGF1 (Vishwamitra et al., 2011; L. Wang et al., 2013b; Bhatt et al., 2015).

III-3) Cibler le microenvironnement dans le traitement du LCM

Depuis plusieurs années, des avancées thérapeutiques majeures ont permis d'augmenter la survie globale des patients atteints de LCM. L'utilisation de doses élevées d'aracytine, l'autogreffe de CSH ou encore la maintenance avec un anticorps anti-CD20, le rituximab font partie de ces progrès majeurs (Jain and Wang, 2019). Cependant, l'émergence de nouvelles thérapies ciblées par exemple, en inhibant la voie BCR avec l'anti-BTK (Ibrutinib) ou en ciblant l'anti-apoptotique Bcl-2 par le BH3 mimétiques (Venetoclax) bougent les lignes dans le traitement des LCM réfractaires ou en rechute. Parmi ces innovations thérapeutiques, cibler le microenvironnement peut être une stratégie prometteuse. Plusieurs drogues comme le lénalidomide, le bortézomib et plus récemment l'ibrutinib affecte le microenvironnement et les dialogues avec les cellules tumorales (**Figure 20**). De plus, de nouvelles molécules sont en développement telles que les inhibiteurs de « *checkpoints* » et les anticorps anti-PD1.

Le lénalidomide est une molécule immunomodulatrice (IMiD) avec l'AMM dans le LCM avec un effet modéré sur la réponse des patients en agent seul (ORR : 28% CR : 8%) mais de bons résultats en association avec l'anti-CD20 rituximab (ORR : 57%, CR : 36%) ou avec la dexaméthasone (ORR : 52%, CR : 12%) (Wang et al., 2012; Zaja et al., 2012; Trněný et al., 2016). Le lénalidomide a pour cible le Cereblon qui est une ubiquitine-ligase et impacte directement les cellules tumorales. D'autres part, cette molécule modifie le microenvironnement en activant les cellules anti-tumorales comme les cellules NK ou les cellules T *in vitro*. De plus, le lénalidomide augmente l'expansion des cellules T $\gamma\delta$ et leur cytotoxicité contre les cellules tumorales lors de cocultures (Gribben et al., 2015). Dans un modèle xénogreffe de souris, le lénalidomide inhibe la lymphangiogenèse en sous exprimant les protéines Prox1, la podoplanine et le VEGFR-3 dans les tumeurs et en diminuant le nombre de macrophages VEGFC⁺ associés à la tumeur (Song et al., 2013). Cependant, il

n'a pas été détecté une baisse des facteurs néo-angiogéniques *in vivo* chez les patients traités par lénalidomide (Zaja et al., 2012).

En plus des IMiD, d'autres molécules aux rôles immunomodulateurs sont en cours de développement et d'évaluation. Les « *checkpoints* » sont des régulateurs du système immunitaire parmi lesquels CTLA-4, PD1, PDL1. Les inhibiteurs de « *checkpoints* » sont parmi les options thérapeutiques les plus prometteuses. Les premiers résultats dans le traitement du mélanome mais aussi du lymphome du Hodgkin montrent leur efficacité (Ansell et al., 2015). Des données préliminaires dans différents LNH suggèrent que bloquer l'axe PD-1/PD-L1 pourrait être intéressant dans le traitement du LCM (Westin et al., 2014).

Le Bortézomib est un inhibiteur réversible du complexe ubiquitine-protéasome et il est approuvé dans le traitement des LCM en première ligne, associé avec une chimiothérapie, ou pour les LCM en rechute ou réfractaires (Robak et al., 2015). Le bortézomib a montré son efficacité dans le traitement du LCM comme agent seul (ORR : 33%, CR : 8%) et en association avec le rituximab et la dexaméthasone (ORR : 81%, CR : 44%) (Goy et al., 2009; Lamm et al., 2011). A l'échelle moléculaire, de multiples mécanismes d'action des inhibiteurs du protéasome ont été proposés comme une diminution de l'activation de la voie NF- κ B dans les cellules tumorales notamment permise par les signaux du microenvironnement du LCM. Cependant, l'efficacité du bortézomib est limitée par des effets secondaires majeurs et des inhibiteurs plus spécifiques de la voie NF- κ B pourraient être d'intérêt.

L'ibrutinib se lie de manière covalente à la kinase BTK pour une inhibition irréversible de la voie BCR. L'ibrutinib est approuvé dans le traitement des lymphomes réfractaires et en rechute et a montré son efficacité en agent seul dans le LCM (ORR : 68 %, CR : 21%). Actuellement, de nombreux essais cliniques évaluent l'efficacité de l'ibrutinib en association avec de la chimiothérapie ou d'autres molécules de thérapie ciblée. L'ibrutinib joue un rôle direct sur les cellules tumorales et impacte indirectement sur l'organisation du microenvironnement. Tout d'abord, l'ibrutinib interfère avec la rétention des cellules de LCM dans les niches tumorales induisant une lymphocytose après traitement *in vivo*. Celle-ci est conséquente à une baisse de l'expression du récepteur CXCR4 et des facteurs de migration CCL22, CCL4 et CXCL13 dans les cellules tumorales (Chang et al., 2013). La rétention des cellules tumorales présente dans la moelle osseuse est particulièrement perturbée après traitement à l'ibrutinib (Furtado et al., 2015). De plus, les sécrétions autocrines d'IL-1 β , de CCL5, d'IL-10 et de VEGF des cellules de LCM sont inhibées par traitement à l'ibrutinib affectant ainsi la survie et la prolifération tumorale (Bernard et al., 2015). Peu de données sont connues sur l'impact de l'ibrutinib sur les cellules accessoires mais de premières études sur la LLC montrent que l'ibrutinib réduit l'activité anti-tumorale des cellules NK et la

phagocytose des macrophages médiés par l'anti-CD20 rituximab (Kohrt et al., 2014; Maffei et al., 2015). Ces phénomènes pourraient-être impliqués dans les rechutes des LCM.

Les BH3 mimétiques ciblent spécifiquement les protéines anti-apoptotiques qui sont essentielles pour la survie des cellules de lymphome. La première étude qui utilise le BH3 mimétique ciblant Bcl-2 le Venetoclax chez les patients atteints de LNH en rechute ou réfractaires confirme la tolérance et l'efficacité de la molécule (ORR : 75, CR : 21%) (Davids et al., 2017). Les modulations de la famille Bcl-2 par le microenvironnement du LCM ont été décrites précédemment avec une induction des gènes anti-apoptotiques et particulièrement *BCL2L1* (codant pour Bcl-xL) et une diminution de l'expression de *BCL2L11* codant pour Bim. Notre laboratoire a pu montrer que le ratio d'expression des gènes *BCL2* / (*BCL2L1* + *MCL1*) est un bon prédicteur de la réponse au Venetoclax. Alors que les cellules de LCM dans le sang périphérique sont dépendantes de Bcl-2 et donc sensibles au Venetoclax, le microenvironnement déséquilibre la famille Bcl-2, induit de la résistance et pourrait être à l'origine de rechutes (Chiron et al., 2015).

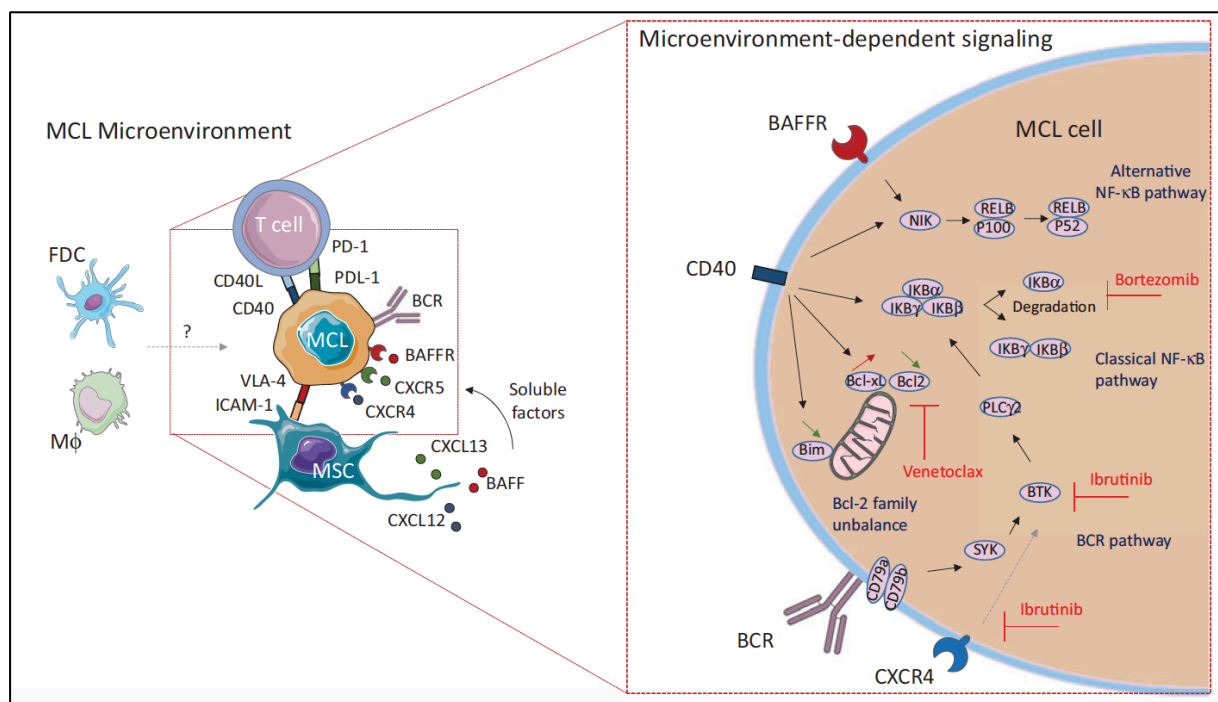


Figure 20 : Rôle du microenvironnement dans le LCM. Les différents composants du microenvironnement du LCM apportent des signaux extrinsèques aux cellules tumorales et activent des voies de pro-survie comme la voie BCR, les voies classiques et alternatives de NF-κB. De plus, ces signaux sont impliqués dans la dérégulation de la balance de la famille Bcl-2. Ces voies activées par le microenvironnement peuvent être ciblées par différentes drogues. D'après Papin et al., 2017.

RESULTATS

I) Article : Rationale for targeting tumor cells in their microenvironment for mantle cell lymphoma treatment

Mon premier travail de thèse a consisté à réaliser une revue de la littérature sur la composition du microenvironnement du LCM et son rôle sur la survie, la prolifération et la chemorésistance des cellules tumorales afin d'apporter un rationnel biologique pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques. L'ensemble de ce travail a largement été présenté à l'occasion de l'introduction.

REVIEW



Rationale for targeting tumor cells in their microenvironment for mantle cell lymphoma treatment

Antonin Papin^{a,b}, Steven Le Gouill^{a,c} and David Chiron^{a,b}

^aCRCINA, INSERM, CNRS, Université de Nantes, Université d'Angers, Nantes, France; ^bGDR3697 Micronit, CNRS, Nantes, France;

^cService d'hématologie clinique, CHU de Nantes, Nantes, France

ABSTRACT

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive non-Hodgkin lymphoma associated with poor prognosis, and despite recent improvements in the therapeutic strategies for treating MCL, its management remains challenging. While improvements in next generation sequencing technology have greatly increased our understanding of the intrinsic abnormalities of MCL, the role of extrinsic signaling remains largely unknown. Recent studies have highlighted the central role of the MCL microenvironment in tumor cell survival, drug resistance and proliferation. Characterization of the diverse MCL tumoral niches and comprehension of the crosstalk between tumor cells and surrounding cells within the MCL microenvironment are needed to increase treatment efficacy. Here, we reviewed the recent findings regarding the MCL microenvironment that could be rapidly translated into new therapeutic strategies to overcome drug resistance during MCL treatment.

ARTICLE HISTORY

Received 16 May 2017

Revised 5 July 2017

Accepted 9 July 2017

KEYWORDS

Lymphoma and Hodgkin disease; tumor environment; targeted therapy

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a rare B-cell malignancy, representing 6% of non-Hodgkin lymphomas (NHLs) with an incidence of 0.8 and 0.2 per 100,000 men and women, respectively (4:1 ratio). The median age at diagnosis is 65–70 years, with an overall survival (OS) of 5–7 years. MCL has one of the poorest outcomes of all NHLs [1]. MCL cells are IgM⁺ CD19⁺ CD5⁺ CD23[−] B cells, and while they initially accumulate in the lymph nodes or the spleen, they disseminate early in extranodal tissues [2].

At the molecular level, MCL cells are characterized by the t(11;14)(q13;q32) translocation, which results in aberrant expression of the cyclin D1 and thus dysregulation of the cell cycle [3]. However, although the cyclin D1 overexpression appears as the *primum movens*, it is not sufficient for MCL development. Indeed, diagnosis of MCL is associated with the occurrence of secondary abnormalities, which are deletion and/or mutation of tumor suppressors and overexpression of oncogenes. Recent progress in next generation sequencing technology has highlighted an important genomic instability that results in recurrent gains of *MYC* and deletions of *RB1*, *ATM*, *CDKN2A* or *TP53* [4]. Mutation or overexpression of several genes, such as *ATM*, *CCND1*, *SOX11*, *TP53* or *UBR5*, also contributes to

the pathogenesis of MCL and can be associated with poorer prognosis [5,6]. *CDKN2A* and *TP53* deletions have been shown to be independent prognostic factors separate from the proliferation index [4]. Additionally, various studies have shown that the transcription factor *SOX11* is overexpressed in 90% of MCL cases, with *SOX11* being negatively associated with clinically indolent cases [7,8]. Taken together, these findings offer novel perspectives in understanding MCL pathophysiology [9].

In addition to these intrinsic abnormalities, it has been shown that extrinsic signaling from the microenvironment has a central role in MCL expansion [10,11]. As previously observed for other NHLs, MCL chemoresistance, survival and proliferation could be impacted by surrounding cells [12]. In this review, we present novel insights regarding the MCL microenvironment and discuss how these findings could offer new therapeutic opportunities to overcome drug resistance during the treatment of MCL.

Composition and dynamics of MCL tumoral niches

Mantle cell lymphoma owes its name to its primary expansion zone, the mantle zone, in lymph nodes,

CONTACT Steven Le Gouill  Steven.legouill@chu-nantes.fr  Service d'hématologie clinique, CHU de Nantes, Place Alexis Ricordeau, 44000 Nantes, France; David Chiron  david.chiron@univ-nantes.fr  CRCINA, INSERM, CNRS, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes, France

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

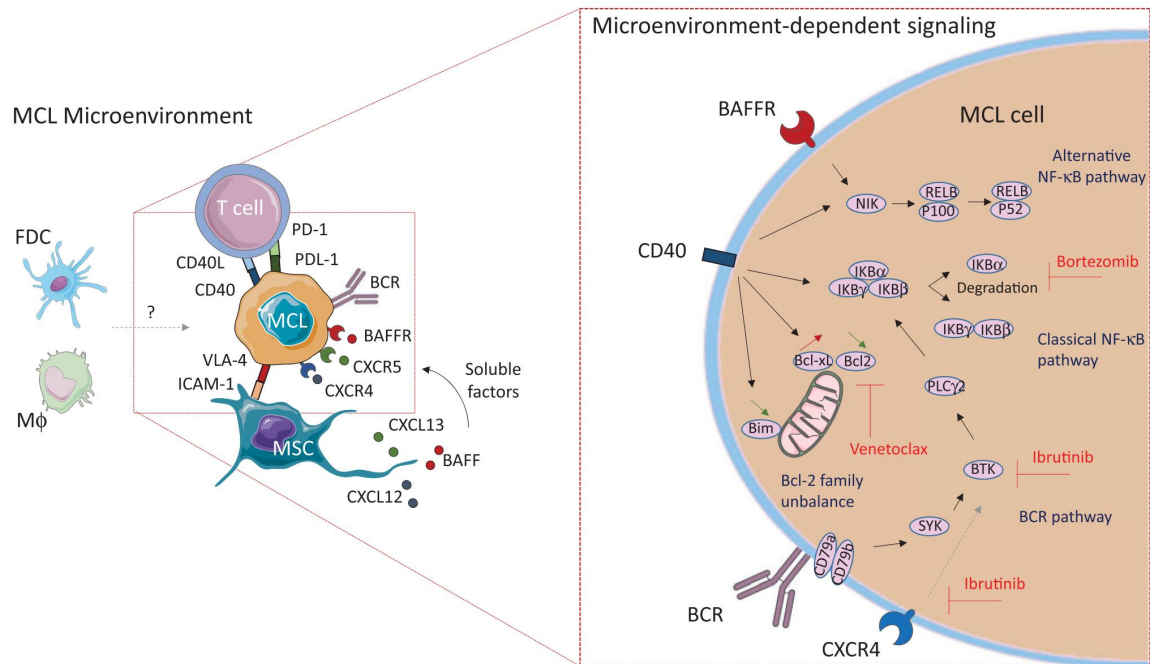


Figure 1. Role of the microenvironment in MCL. The different components of MCL microenvironment provide extrinsic signals to tumor cells and activate pro-survival pathways such as BCR and classical and alternative NF- κ B pathways. In addition, extrinsic signalings are involved in a pro-survival imbalance of the Bcl-2 family, which includes downregulation of Bim and induction of Bcl- x_L . Dotted arrows represent indirect interactions. BCR: B-cell receptor; FDC: follicular dendritic cell; MCL: mantle cell lymphoma; Mφ: Macrophage; MSC: mesenchymal stromal cell.

but extranodal manifestations in the bone marrow, blood or the gastrointestinal tract are often associated with the diagnosis [2]. These tumoral niches are dynamic, and they host crosstalk between tumoral cells, accessory cells and soluble factors [13] (Figure 1).

A complex chemokine network

The attraction of tumoral and accessory cells to their specific tumoral niches is based on a complex chemokine network. Chemotaxis of MCL cells is controlled by several chemokines, such as CXCL12, CXCL13 and CCL19, that bind to the chemokine receptors CXCR4, CXCR5 and CCR7, respectively, which are highly expressed in MCL cells. Interestingly, whereas CXCL12 also attracts normal B cells, CCL19 is specific for the homing of MCL cells [14]. MCL also shapes its tumor microenvironment by attracting accessory cells through chemokine secretions. The expression of CCL4 and CCL5 is increased in tumor cells compared with normal B cells, and they are known to attract monocytes [15]. CCL17 and CCL22 are also detected in MCL blood samples, suggesting they play a role in the

recruitment of immune cells, such as monocytes or T cells, in the lymph nodes [16].

Immune cells: macrophages and T-cells have the first role

Only a few studies have addressed the immune cell composition of MCL tumor niches so far. In peripheral blood and lymph nodes, an evaluation of absolute lymphocyte counts shows that the numbers of CD4⁺ T cells and the CD4:CD8 ratio positively correlate with OS [17,18]. Absolute counts of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells are lower in aggressive forms of MCL [18]. Despite the low levels of T cells, regulatory T cells (CD25⁺, CD4⁺), known to negatively impact many cancer types, have been described as having a high frequency in the microenvironments of several NHLs, including MCL [19]. Moreover, the expression of the protein program cell death 1 (PD-1) in T cells is observed in MCL lymph nodes, mainly in the germinal centers, which suggests an interaction with tumoral cells [20,21]. Indeed, PDL-1, the ligand of PD-1, is expressed in MCL cells and leads to the inhibition of the T cell anti-tumoral response *in vitro* [22]. Of note,

numerous studies have shown the importance of lymphoid-like interactions through the CD40/CD40L axis for proliferation and tumor cell growth [10,23–26] and a recent study highlighted the co-localization of primary MCL cells and autologous T-cells in a model of patient-derived xenograft [27]. These preliminary data should encourage further study of the precise T cell phenotypes in the MCL microenvironment.

Several works have shown that absolute monocyte counts negatively correlate with OS [28], and that CD163⁺ macrophages are present in lymph nodes, suggesting a role of myeloid cells in the MCL microenvironment. Preliminary studies highlight that myeloid cells support primary MCL cell survival and are involved in lymphangiogenesis through VEGF-C production [29,30]. However, the interactions and signaling networks between MCL cells and macrophages are still unidentified and warrant further investigations.

The mesenchymal cells participate to the network

Follicular dendritic cells (FDCs), cells of mesenchymal origin, have low levels of CD23, CD35 and CD54 in MCL compared to reactive lymph nodes [31]. The distribution of FDCs can differentiate between groups of MCL patients that have different outcomes: the diffuse pattern of lymph node FDCs is associated with a poorer outcome than the nodular pattern [32]. FDCs support MCL cell survival through a cell-cell contact mechanism, but the molecular signaling has not yet been identified. In bone marrow, MCL cells and mesenchymal stromal cells (MSC) participate in soluble crosstalk that is essentially driven by the CXCL12/CXCR4 axis and BAFF that promotes the survival of tumor cells [33,34]. Cell-cell interactions occur in the niche through VLA-4/ICAM-1 binding [35] and the adhesion molecule JAM-C, as described in a xenograft mouse model [36].

MCL microenvironment promotes tumor survival and proliferation

The pro-tumoral ecosystem that supports MCL is still poorly understood; however, whereas proliferation is often detected in lymph nodes *in vivo*, MCL cells rarely proliferate in the peripheral blood and bone marrow. In fact, our data suggest a differential proliferation of the same clone in function of its tissue localization *in vivo* [10,37]. Furthermore, Saba et al. recently confirmed the central role of the MCL microenvironment demonstrating that the B-cell receptor (BCR) and nuclear factor κ B (NF- κ B) pathways, in addition to the

proliferation of tumoral cells, is restricted to the lymph nodes and reduced in the peripheral blood [11].

BCR signaling is activated in MCL

BCR signaling plays a central role in the development, proliferation and survival of normal B cells, and a high rate of early responses to BCR signaling inhibition has recently increased interest in this pathway in regards to MCL. Whereas MCL is defined as a naïve B cell malignancy, studies have shown that, in addition to carrying a biased IGHV repertoire, somatic hypermutations (at least one mutation) are detected in more than 70% of MCL samples, and that 14% are highly mutated (<97% germline), suggesting antigen encounter [38]. Of note, highly mutated cases are mostly SOX11 negative MCL cells that are associated with an indolent clinical outcome [39]. However, in contrast to several NHLs, no autoantigens have been described to be associated with MCL [40]. At the plasma membrane, the BCR is associated with a heterodimer composed of the proteins CD79A and CD79B. BCR activation results in phosphorylation of the dimer, which allows for its transduction into the cell. BCR activates a series of kinases, such as SYK, BTK and PLC γ 2 that leads in the activation of several pathways: NF- κ B, PI3K/AKT, and MAPK [40]. It has been shown a specific BCR signaling pattern associated with MCL characterized by strong levels of phospho-(p)-SYK, p-PLC γ 2 and p-AKT [41]. MCL cell lines and primary samples have an active BCR pathway [42], but the molecular nature of *in vivo* BCR activation, either tonic (antigen-independent) or chronically active (antigen-dependent), remains to be defined [40]. Nevertheless, gene expression signatures show high BCR activation in lymph node resident cells compared to peripheral blood cells, which reinforces the hypothesis that the microenvironment is implicated in MCL [11].

The CD40/CD40L axis is central

The CD40/CD40L axis is a major component of B and T-cell communication networks and is well known to be involved in normal B cell activation as well as in the survival and proliferation of various malignant B cells [12]. In MCL, T cells are suspected to provide CD40L molecules in lymph nodes, and soluble CD40L is present in peripheral blood of MCL patients at a high level compared to healthy donors [43]. Considering this, several studies highlighted the relevance of CD40/CD40L in MCL models *in vitro* based on soluble CD40L [24], activators of CD40 [23], or transfected CD40L-expressed fibroblasts [10,25,26].

Importantly, whereas peripheral blood MCL cells rarely proliferate, CD40 activation activates progression of MCL cells into the cell cycle *ex vivo*, suggesting that this extrinsic signal plays a central role in the proliferation of MCL *in vivo*. We recently demonstrated that CD40 activation in the presence of MCL-specific growth factors recapitulates molecular signatures that are characteristic of MCL lymph nodes, such as cell cycle, BCR, NF- κ B/NIK and survival (Bcl-2 family).

Soluble factors play a major role

In addition to direct contacts between accessory cells and MCL cells, autocrine and paracrine secretion of several soluble factors could have a major role within MCL niches. Interestingly, various cytokines and chemokines are present at high levels in the blood of MCL patients, such as interleukin IL-12, CXCL-10, IL-8, CCL3 and CCL4, and some of these are correlated with poor survival (IL-8, CCL3 and CCL4) [44]. In addition, primary MCL cells express receptors for IL-10, BAFF, IGF-1 [10] or IL-6 (IL-6R and CD5) [45,46], allowing efficient signal transduction and survival.

It has been shown that BCR signaling leads to the induction of the autocrine secretion of several cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α and VEGF α , confirming the major role of this signaling pathway in MCL physiopathology [47]. As previously mentioned, MSCs support MCL cell survival through the paracrine supply of CXCL12, CXCL13 or BAFF [34,35]. Macrophages, which can be defined as cytokine factories, are known to be important growth factor sources (BAFF, IL-15, APRIL, CXCL12) in several NHLs but their precise role in MCL is still unknown [12,48]. In addition to supporting survival, soluble factors are involved in MCL cell proliferation. Indeed, CD40L-dependent proliferation is potentiated by IL-4 or IL-10 [23,25]. However, although IL-4 has been used in various models *in vitro*, it is unlikely that it has an *in vivo* role in MCL because of low IL-4R expression in MCL cells and the dramatic IL-4-induced expression of CD23, which is typically unexpressed in MCL cells *in vivo* [49].

IL-6 and IL-10 activate STAT3, and it has been proposed that STAT3 and p-STAT3 expression witness IL-10 implications in both primary and MCL cell lines [50]. IL-6 induces the activation of PI3K/AKT and the NF- κ B pathways [45,51], whereas BAFF is a potent inducer of the alternative NF- κ B pathway [34]. Finally, the CXCL12/CXCR4 axis also promotes MCL cell survival through MAPK activation, particularly in the context of the bone marrow microenvironment [33,35].

How the microenvironment drives chemoresistance

Chemoresistance involves cellular adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR)

As previously described in other malignancies, molecular interactions associated with the homing of MCL cells can result in CAM-DR. Both the CXCL12/CXCR4 and the ICAM-1/VLA-4 axis facilitate the interactions and adhesion between MSCs and MCL cells. These interactions result in the active phosphorylation of the ERK, AKT and NF- κ B pathways that leads to CAM-DR against chemotherapeutic agents such as fludarabine and cyclophosphamide [35,52]. CAM-DR is also observed for proteasome inhibitors where bortezomib treatment enhances CXCR4 expression, which consequently favors MCL resistance [33].

The NF- κ B pathways are activated

Classical NF- κ B activation results in the phosphorylation and degradation of the I κ B α subunit, followed by the translocation of the p50/65 complex in the cell nucleus. The alternative NF- κ B pathway is independent of I κ B α and consists of the proteolysis of the p100 protein into p52. Several mutations in NF- κ B pathways (*BIRC3*, *TRAF2*, *CARD11*, *NIK* or *IKBKB*) have been described in more than 10% of MCL patients [53] and, as observed for *BTK* mutation [37], could be involved in acquired resistance to novel therapies that target BCR signaling. However, extrinsic signals could also control NF- κ B activity in MCL cells. Indeed, CD40L or MSCs activate both the classical and alternative pathways [26,34]. BAFF signaling induces the alternative NF- κ B pathway and activates the transcription of targeted genes, including *TNFSF13B*, for the formation of an autocrine loop [54]. In MCL, the NF- κ B pathway has a predominant role and is associated with survival and proliferation, whereas its inhibition leads to cell cycle arrest and apoptosis [55]. In addition to tumor promotion, several studies have shown that an active NF- κ B pathway is associated with the acquisition of chemoresistance against not only traditional chemotherapy drugs, but also against targeted drugs, such as ibrutinib [53]. Resistance to the Bcl-2-specific BH3 mimetic Venetoclax has also been associated with microenvironment-dependent NF- κ B activation [26].

The imbalanced expression bcl-2 family proteins favor survival

The Bcl-2 family is composed of multidomain anti-apoptotic members (Mcl-1, Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-W and A1),

multidomain pro-apoptotic members (Bak and Bax) and BH3-only pro-apoptotic members (Bim, Bid, Bad, Bik, Puma, and Noxa). MCL is characterized by overexpression of the anti-apoptotic Bcl-2, and the apoptotic cascade is almost systematically altered [56]. Various evidence shows that Bim downregulation is a central event in MCL physiopathology. Indeed, the homozygous deletion of Bim leads to the development of MCL in a t(11;14) mouse model [57], and five out of the seven widely used MCL cell lines (Z138, Mino, Jeko, UPN1 and SP53) do not express Bim. However, only rare cases of homozygous deletion or mutation of Bim have been reported in MCL primary samples. These discrepancies could be explained by the integration of the central role of the MCL microenvironment. Indeed, Bim is downregulated by many extrinsic signaling factors such as CD40 activation [10], MSC interaction [10] and FDC co-culture [58]. However, molecular signaling that is involved in the microenvironment-dependent regulation of Bim regarding MCL is still unclear.

In addition to the dramatic downregulation of Bim, CD40 signaling induces the NF- κ B-dependent upregulation of Bcl-x_L, leading to a pro-survival signal. This Bcl-2 family unbalance leads to the microenvironment-dependent loss of mitochondrial priming and, consequently, confers resistance to chemotherapeutic agents such as bendamustine or aracytine. In addition, whereas peripheral blood MCL cells are highly sensitive to the Bcl-2-specific BH3 mimetic Venetoclax, cells that are in protective niches appear to be resistant [10,26].

Taken together, these data highlight that the lymphoma ecosystem must be integrated into future mechanism-based therapeutic strategies.

Novel therapeutic strategies integrating the key role of the microenvironment

For over a decade, major therapeutic advances have increased the OS of MCL patients. In particular the use of rituximab for maintenance [59,60], the use of intensive therapies such as autologous stem cell transplantation and the use of high doses of aracytine [61], represent the most recent progress in MCL therapy. Standard chemotherapy has probably reached its limit as an MCL treatment. The emergence of new targeted therapy, such as BTK inhibition and Bcl-2 targeted therapy, is changing the paradigm of treatment in relapsed/refractory MCL and may soon challenge front-line treatment. Among innovative strategies, specifically targeting the MCL microenvironment could be promising.

Several drugs, such as lenalidomide, bortezomib and, more recently, ibrutinib, already directly affect the microenvironment or impair its crosstalk with MCL cells, but new agents in development, such as checkpoint inhibitors and BH3 mimetics, could also improve MCL treatment.

Targeting the microenvironment: IMiDs and checkpoint inhibitors

As a single agent, the immunomodulatory drug (IMiD) lenalidomide has moderate activity against MCL cells and is approved for the treatment of relapsed/refractory MCL [62]. Various studies have also shown good response associated with rituximab (57% of overall response rate [ORR] and 36% of complete response [CR]) [63], and dexamethasone (52% ORR and 12% CR) [64]. Lenalidomide activates anti-tumoral cells, such as T and NK cells *in vitro*, and increases T $\gamma\delta$ expansion and cytotoxicity in coculture assays [65]. In a xenograft mouse model, lenalidomide inhibits lymphangiogenesis by downregulating Prox1, podoplanin and VEGFR-3 and decreasing the number of VEGF-C⁺ tumor-associated macrophages [29]. However, no significant modifications in the level of neo-angiogenic factors have been detected *in vivo* in MCL patients treated with lenalidomide [64].

In addition to the IMiDs, other targeted immunoregulatory strategies are under development. Immune checkpoint inhibitors are among the most promising options for treatment of melanoma and Hodgkin lymphoma. Preliminary data suggest that blocking the PD1/PDL1 axis could be of interest based on encouraging responses in other NHLs. In follicular lymphoma, an anti-tumoral response to immune reactivation upon the implementation of a PD-1 blockade is observed [66].

NF- κ B pathway and CD40-CD40L axis

Bortezomib is a reversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome complex and an approved molecule for treating relapsed/refractory MCL. Bortezomib has proven its efficiency in MCL treatment as a single agent (ORR: 33% CR: 8%) [67], and its association with rituximab and dexamethasone has an ORR of 81%, with 44% of CR [68]. At the molecular level, multiple mechanisms of action of proteasome inhibitors have been proposed, such as downregulation of the NF- κ B pathway through I κ B degradation inhibition in MCL cells [55]. As previously described, the NF- κ B pathway is central in the extrinsic signaling observed in MCL cells, which could participate in the clinical

efficacy of proteasome inhibitors for treatment of the disease [55]. Indeed, we observed that bortezomib can counteract microenvironment-dependent drug resistance by inhibiting NF- κ B-dependent Bcl- x_L expression [10].

Unfortunately, bortezomib efficacy is limited by major side effects, and more selective therapy targeting the NF- κ B pathway could be of interest. We recently showed that the type II anti-CD20 monoclonal antibody Obinutuzumab directly impaired NF- κ B target-genes, such as *BCL2L1*, which consequently counteracts microenvironment-dependent drug resistance in primary MCL cells [10]. Moreover, as previously noted, the CD40/CD40L axis plays a central role in MCL NF- κ B activation by the microenvironment. Targeting the CD40/CD40L axis with antagonistic antibodies could be of interest in MCL treatment.

The BCR pathway inhibition promotes MCL egress

Ibrutinib binds covalently to the kinase BTK and irreversibly inhibits BCR signaling. Ibrutinib has recently been approved to treat relapsed MCL patients and has shown efficacy as a single agent in MCL treatment with an ORR of 68% and a CR of 21% [69]. Currently, numerous clinical trials associating ibrutinib to chemotherapy or rational targeted therapy are ongoing. Ibrutinib interferes with the homing of MCL cells, leading to lymphocytosis *in vivo*, by downregulating CXCR4 expression and migration factors CCL22, CCL4 and CXCL13 in MCL cells [16]. Bone marrow-resident cells seem to be particularly affected by ibrutinib-dependent homing inhibition [70]. BTK inhibition also directly affects MCL survival and proliferation by reducing the autocrine secretion of IL1 β , TNF α and CCL5 [47]. Little is known about the impact of ibrutinib on accessory cells, but initial studies in chronic lymphocytic leukemia show that ibrutinib reduces anti-tumor NK activity and phagocytosis by macrophages that are both mediated by anti-CD20. These phenomena may be involved in MCL relapse [71,72].

Selective targeting of Bcl-2, Bcl- x_L and Mcl-1

BH3 mimetics selectively target anti-apoptotic proteins that are essential for B-cell malignancy survival and drug resistance. The first study using the Bcl-2-specific BH3 mimetic Venetoclax in patients with relapsed or refractory NHL confirmed tolerance and efficacy, with an ORR of 75% and a CR of 21% [73]. We previously described that the MCL microenvironment modulates the expression of members of the Bcl-2 family to promote tumor survival, especially through induction of

the anti-apoptotic Bcl- x_L and, to a lesser extent, Mcl-1, and through the inhibition of the pro-apoptotic protein Bim [10]. By integrating extrinsic signaling, we observed that the *BCL2/(BCL2L1 + MCL1)* mRNA ratio is a strong predictor of Venetoclax sensitivity [26]. Accordingly, whereas peripheral blood MCL cells are Bcl-2-dependent and highly sensitive to Venetoclax, the microenvironment-dependent imbalance of the Bcl-2 family induces drug resistance, which could lead to relapse. In addition to Bcl-2-specific BH3 mimetics, Bcl- x_L and Mcl-1-specific BH3 mimetics are in development and will be critical to targeting cells in their protective niches. Interestingly, preliminary data on these novel BH3 mimetics show encouraging results in B-cell lymphoma.

Therapeutic perspectives: example of the OASIs trial

We have recently demonstrated that lymphocytosis following ibrutinib treatment sensitizes MCL cells that egress into peripheral blood to the Bcl-2-specific BH3 mimetic Venetoclax [26]. In addition, the type II anti-CD20 Obinutuzumab counteracts Bcl- x_L upregulation through inhibition of the microenvironment-dependent NF- κ B pathway, leading to increased mitochondrial priming and Venetoclax sensitization [10]. Based on these preclinical observations, we have designed a multicenter phase I/II clinical trial for MCL treatment consisting of treating with the sequential combination of ibrutinib and Obinutuzumab followed by Venetoclax (OASIs trial NCT#02558816). This mechanism-based clinical trial integrates the lymphoma ecosystem and will rapidly provide information on the efficacy of such a rational strategy.

Conclusions

Increased understanding of MCL biology leads us to reconsider therapeutic strategies for MCL patients. The emergence of novel targeted therapies offers an opportunity to build innovative therapeutic approaches and will soon challenge the role of conventional chemotherapy. However, the cost of such therapeutic strategies could be a challenge, particularly for treating rare diseases and treatment must be based on a strong biological rationale that especially integrates both intrinsic and extrinsic signals.

Acknowledgements

We thank Catherine Pellat-Deceunynck for reviewing this work.

Potential conflict of interest: Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article online at <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1357177>.

References

- [1] Pérez-Galán P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*. 2011;117:26–38.
- [2] Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, et al. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*. 1997;89:2067–2078.
- [3] Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122:3416–3423.
- [4] Delfau-Larue M-H, Klapper W, Berger F, et al. High-dose cytarabine does not overcome the adverse prognostic value of CDKN2A and TP53 deletions in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2015;126:604–611.
- [5] Beà S, Valdés-Mas R, Navarro A, et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:18250–18255.
- [6] Meissner B, Kridel R, Lim RS, et al. The E3 ubiquitin ligase UBR5 is recurrently mutated in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2013;121:3161–3164.
- [7] Nygren L, Baumgartner Wennerholm S, Klimkowska M, et al. Prognostic role of SOX11 in a population-based cohort of mantle cell lymphoma. *Blood*. 2012;119:4215–4223.
- [8] Fernández V, Salameo O, Espinet B, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res*. 2010;70:1408–1418.
- [9] Queirós AC, Beekman R, Vilarrasa-Blasi R, et al. Decoding the DNA methylome of mantle cell lymphoma in the light of the entire B cell lineage. *Cancer Cell*. 2016;30:806–821.
- [10] Chiron D, Bellanger C, Papin A, et al. Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma. *Blood*. 2016;128:2808–2818.
- [11] Saba NS, Liu D, Herman SEM, et al. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF- κ B activation in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2016;128:82–92.
- [12] Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol*. 2014;24:71–81.
- [13] Burger JA, Ford RJ. The microenvironment in mantle cell lymphoma: cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies. *Semin Cancer Biol*. 2011;21:308–312.
- [14] Corcione A, Arduino N, Ferretti E, et al. CCL19 and CXCL12 trigger in vitro chemotaxis of human mantle cell lymphoma B cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10:964–971.
- [15] Ek S, Björck E, Högerkorp C-M, et al. Mantle cell lymphomas acquire increased expression of CCL4, CCL5 and 4-1BB-L implicated in cell survival. *Int J Cancer*. 2006;118:2092–2097.
- [16] Chang BY, Francesco M, De Rooij MFM, et al. Egress of CD19(+)CD5(+) cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients. *Blood*. 2013;122:2412–2424.
- [17] Zhang X-Y, Xu J, Zhu H-Y, et al. Negative prognostic impact of low absolute CD4(+) T cell counts in peripheral blood in mantle cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2016;107:1471–1476.
- [18] Nygren L, Wasik AM, Baumgartner-Wennerholm S, et al. T-cell levels are prognostic in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20:6096–6104.
- [19] Yang Z-Z, Novak AJ, Stenson MJ, et al. Intratumoral CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107:3639–3646.
- [20] Tomita N, Nakamura N, Ikoma H, et al. Mantle cell lymphoma is associated with a variable number of PD-1-positive tumor infiltrating T-cells. *Blood*. 2016;128:5317–5317.
- [21] Myklebust JH, Irish JM, Brody J, et al. High PD-1 expression and suppressed cytokine signaling distinguish T cells infiltrating follicular lymphoma tumors from peripheral T cells. *Blood*. 2013;121:1367–1376.
- [22] Wang L, Qian J, Lu Y, et al. Immune evasion of mantle cell lymphoma: expression of B7-H1 leads to inhibited T-cell response to and killing of tumor cells. *Haematologica*. 2013;98:1458–1466.
- [23] Castillo R, Mascarenhas J, Telford W, et al. Proliferative response of mantle cell lymphoma cells stimulated by CD40 ligation and IL-4. *Leukemia*. 2000;14:292–298.
- [24] Andersen NS, Larsen JK, Christiansen J, et al. Soluble CD40 ligand induces selective proliferation of lymphoma cells in primary mantle cell lymphoma cell cultures. *Blood*. 2000;96:2219–2225.
- [25] Visser HP, Tewis M, Willemze R, et al. Mantle cell lymphoma proliferates upon IL-10 in the CD40 system. *Leukemia*. 2000;14:1483–1489.
- [26] Chiron D, Dousset C, Brosseau C, et al. Biological rationale for sequential targeting of Bruton tyrosine kinase and Bcl-2 to overcome CD40-induced ABT-199 resistance in mantle cell lymphoma. *Oncotarget*. 2015;6:8750–8759.
- [27] Iyengar S, Ariza-McNaughton L, Clear A, et al. Characteristics of human primary mantle cell lymphoma engraftment in NSG mice. *Br J Haematol*. 2016;173:165–169.
- [28] Koh YW, Shin S-J, Park C, et al. Absolute monocyte count predicts overall survival in mantle cell lymphomas: correlation with tumour-associated macrophages. *Hematol Oncol*. 2014;32:178–186.
- [29] Song K, Herzog BH, Sheng M, et al. Lenalidomide inhibits lymphangiogenesis in preclinical models of mantle cell lymphoma. *Cancer Res*. 2013;73:7254–7264.
- [30] Pham LV, Vang MT, Tamayo AT, et al. Involvement of tumor-associated macrophage activation in vitro during development of a novel mantle cell lymphoma cell line, PF-1, derived from a typical patient with relapsed disease. *Leuk Lymphoma*. 2015;56:186–193.
- [31] Jin MK, Hoster E, Dreyling M, et al. Follicular dendritic cells in follicular lymphoma and types of non-Hodgkin

- lymphoma show reduced expression of CD23, CD35 and CD54 but no association with clinical outcome. *Histopathology*. 2011;58:586–592.
- [32] Schrader C, Meusers P, Brittinger G, et al. Growth pattern and distribution of follicular dendritic cells in mantle cell lymphoma: a clinicopathological study of 96 patients. *Virchows Arch*. 2006;448:151–159.
- [33] Chen Z, Teo AE, McCarty N. ROS-induced CXCR4 signaling regulates mantle cell lymphoma (MCL) cell survival and drug resistance in the bone marrow microenvironment via autophagy. *Clin Cancer Res*. 2016;22:187–199.
- [34] Medina DJ, Goodell L, Glod J, et al. Mesenchymal stromal cells protect mantle cell lymphoma cells from spontaneous and drug-induced apoptosis through secretion of B-cell activating factor and activation of the canonical and non-canonical nuclear factor κ B pathways. *Haematologica*. 2012;97:1255–1263.
- [35] Kurtova AV, Tamayo AT, Ford RJ, et al. Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood*. 2009;113:4604–4613.
- [36] Doñate C, Vijaya Kumar A, Imhof BA, et al. Anti-JAM-C therapy eliminates tumor engraftment in a xenograft model of mantle cell lymphoma. *J Leukoc Biol*. 2016;100:843–853.
- [37] Chiron D, Di Liberto M, Martin P, et al. Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma. *Cancer Discov*. 2014;4:1022–1035.
- [38] Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood*. 2011;118:3088–3095.
- [39] Navarro A, Clot G, Royo C, et al. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res*. 2012;72:5307–5316.
- [40] Young RM, Staudt LM. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12:229–243.
- [41] Myklebust JH, Brody J, Kohrt HE, et al. Distinct patterns of B-cell receptor signaling in non-Hodgkin lymphomas identified by single-cell profiling. *Blood*. 2017;129:759–770.
- [42] Koehrer S, Burger JA. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell malignancies. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2016;14:55–65.
- [43] Hock BD, McKenzie JL, Patton NW, et al. Circulating levels and clinical significance of soluble CD40 in patients with hematologic malignancies. *Cancer*. 2006;106:2148–2157.
- [44] Sonbol MB, Maurer MJ, Stenson MJ, et al. Elevated soluble IL-2R α , IL-8, and MIP-1 β levels are associated with inferior outcome and are independent of MIPI score in patients with mantle cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2014;89:E223–E227.
- [45] Zhang L, Yang J, Qian J, et al. Role of the microenvironment in mantle cell lymphoma: IL-6 is an important survival factor for the tumor cells. *Blood*. 2012;120:3783–3792.
- [46] Zhang C, Xin H, Zhang W, et al. CD5 binds to interleukin-6 and induces a feed-forward loop with the transcription factor STAT3 in B cells to promote cancer. *Immunity*. 2016;44:913–923.
- [47] Bernard S, Danglade D, Gardano L, et al. Inhibitors of BCR signalling interrupt the survival signal mediated by the micro-environment in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2015;136:2761–2774.
- [48] Epron G, Ame-Thomas P, Le Priol J, et al. Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. *Leukemia*. 2012;26:139–148.
- [49] Dorfman DM, Pinkus GS. Distinction between small lymphocytic and mantle cell lymphoma by immunoreactivity for CD23. *Mod Pathol*. 1994;7:326–331.
- [50] Baran-Marszak F, Boukhar M, Harel S, et al. Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2010;95:1865–1872.
- [51] Zhang H, McCarty N. Tampering with cancer chemoresistance by targeting the TGM2-IL6-autophagy regulatory network. *Autophagy*. 2017;13:627–628.
- [52] Kim Y-R, Eom K-S. Simultaneous inhibition of CXCR4 and VLA-4 exhibits combinatorial effect in overcoming stroma-mediated chemotherapy resistance in mantle cell lymphoma cells. *Immune Netw*. 2014;14:296–306.
- [53] Rahal R, Frick M, Romero R, et al. Pharmacological and genomic profiling identifies NF- κ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nat Med*. 2014;20:87–92.
- [54] Fu L, Lin-Lee Y-C, Pham LV, et al. Constitutive NF- κ B and NFAT activation leads to stimulation of the BlyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. *Blood*. 2006;107:4540–4548.
- [55] Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, et al. Inhibition of constitutive NF- κ B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Immunol*. 2003;171:88–95.
- [56] Hofmann WK, de Vos S, Tsukasaki K, et al. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood*. 2001;98:787–794.
- [57] Katz SG, Labelle JL, Meng H, et al. Mantle cell lymphoma in cyclin D1 transgenic mice with Bim-deficient B cells. *Blood*. 2014;123:884–893.
- [58] Lwin T, Lin J, Choi YS, et al. Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. *Blood*. 2010;116:5228–5236.
- [59] Kluin-Nelemans HC, Hoster E, Hermine O, et al. Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2012;367:520–531.
- [60] Le Gouill S. Rituximab Maintenance after Autologous Stem Cell Transplantation Prolongs Survival in Younger Patients with Mantle Cell Lymphoma: Final Results of the Randomized Phase 3 LyMa Trial of the Lysa/Goelams Group. San Diego; 2016 [cited 2017

- May 2]. Available from: <https://ash.confex.com/ash/2016/webprogram/Paper89500.html>
- [61] Hermine O, Hoster E, Walewski J, et al. Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Lancet*. 2016;388:565–575.
 - [62] Goy A, Sinha R, Williams ME, et al. Single-agent lenalidomide in patients with mantle-cell lymphoma who relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study. *J Clin Oncol*. 2013;31:3688–3695.
 - [63] Wang M, Fayad L, Wagner-Bartak N, et al. Lenalidomide in combination with rituximab for patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: a phase 1/2 clinical trial. *Lancet Oncol*. 2012;13:716–723.
 - [64] Zaja F, De Luca S, Vitolo U, et al. Salvage treatment with lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: clinical results and effects on microenvironment and neoangiogenic biomarkers. *Haematologica*. 2012;97:416–422.
 - [65] Gribben JG, Fowler N, Morschhauser F. Mechanisms of action of lenalidomide in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol*. 2015;33:2803–2811.
 - [66] Westin JR, Chu F, Zhang M, et al. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15:69–77.
 - [67] Goy A, Bernstein SH, Kahl BS, et al. Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Ann Oncol*. 2009;20:520–525.
 - [68] Lamm W, Kaufmann H, Raderer M, et al. Bortezomib combined with rituximab and dexamethasone is an active regimen for patients with relapsed and chemotherapy-refractory mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2011;96:1008–1014.
 - [69] Wang ML, Rule S, Martin P, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2013;369:507–516.
 - [70] Furtado M, Wang ML, Munneke B, et al. Ibrutinib-associated lymphocytosis corresponds to bone marrow involvement in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2015;170:131–134.
 - [71] Kohrt HE, Sagiv-Barfi I, Rafiq S, et al. Ibrutinib antagonizes rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity. *Blood*. 2014;123:1957–1960.
 - [72] Maffei R, Fiorcari S, Martinelli S, et al. Targeting neoplastic B cells and harnessing microenvironment: the “double face” of ibrutinib and idelalisib. *J Hematol Oncol*. 2015;8:60.
 - [73] Davids MS, Roberts AW, Seymour JF, et al. Phase I first-in-human study of venetoclax in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol*. 2017;35:826–833.

II) Article : Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma

Les cellules de LCM s'accumulent dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions mais se disséminent rapidement notamment dans le sang périphérique et la moelle osseuse. Cependant, peu d'informations rendent compte de la nature et du phénotype des cellules accessoires ainsi que des dialogues qui s'opèrent dans les niches tumorales du LCM. Des études intégrant le rôle du microenvironnement sont nécessaires pour comprendre la résistance aux traitements des cellules tumorales dans les niches protectrices puis pour élaborer des alternatives thérapeutiques. L'intérêt de cette approche a été renforcé par des études montrant que l'inhibition de la voie BCR par des anti-BTK (Ibrutinib) ou des anti-PI3K (Idelalisib) altère la rétention des cellules tumorales dans les ganglions via les voies BCR et CXCR4 dans les cellules de LCM (Chang et al., 2013). Cependant, la conséquence de la fuite des cellules tumorales dans le sang périphérique sur la survie, la prolifération et la chemorésistance reste peu connue.

Ce premier travail montre que malgré un index de prolifération Ki67 élevé dans les ganglions, les cellules présentes dans le sang périphérique ne prolifèrent pas et sont arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire. La prolifération des cellules tumorales est donc restreinte aux ganglions ce qui suggère un rôle majeur des acteurs de la niche dans l'expansion tumorale. En nous basant sur les connaissances de la structure d'un ganglion normal, nous avons émis l'hypothèse que les cellules tumorales sont au contact de cellules d'origine mésenchymateuse et immunitaire. Pour déterminer leur impact, des cellules primaires issues du sang périphérique de 21 patients de LCM ont été mises en co-culture durant plusieurs jours *ex vivo* avec différents supports : des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) et des fibroblastes murins exprimant le CD40L humain pour mimer une interaction avec les lymphocytes T. Les MSC et la stimulation par le CD40L permettent la survie des cellules primaires de LCM. De plus, le signal CD40L mais pas les MSC, induit une prolifération des cellules tumorales pour tous les échantillons testés. Cette prolifération CD40L dépendante peut être potentialisée par un cocktail de facteurs solubles (IL-6, IL-10, IGF1 et BAFF). Le modèle de co-culture *ex vivo* « CD40L + cytokines » maintient la survie et la prolifération des cellules tumorales sur plusieurs semaines.

L'analyse des modulations des cellules du sang périphérique co-cultivées 7 jours dans le modèle « CD40L + cytokines » montre que la co-culture mime les signatures moléculaires des cellules de LCM dans les ganglions. Nous avons notamment démontré une induction des voies classique et alterne de NF- κ B et des modulations des protéines de la famille Bcl-2.

En effet, notre étude démontre que la stimulation « CD40L + cytokines » augmente l'expression de l'anti-apoptotique Bcl-xL et diminue l'expression des protéines pro-apoptotiques Bim, Bak et Bax. Ces régulations semblent spécifiques des cellules de LCM en comparaison avec des lymphocytes B naïfs CD5⁺ normaux. Notre travail montre que ces régulations sont mises en jeu dans la chemoresistance à la bendamustine, un agent de chimiothérapie et au Venetoclax, un BH3-mimétique inhibant Bcl-2. Mécanistiquement, et démontré par « *BH3 profiling* », cette chemorésistance s'explique par une séquestration de la protéine pro-apoptotique Bim par l'anti-apoptotique Bcl-xL à la mitochondrie. La surexpression de Bcl-xL est dépendante de l'activation de la voie NF-κB dans notre modèle. Ces résultats établissent les bases moléculaires d'une régulation dépendante du microenvironnement impliquée dans la résistance des cellules primaires de LCM à certains traitements.

Alors que les cellules de LCM dans le sang périphérique sont sensibles au Venetoclax, les cellules présentes dans les ganglions sont résistantes et pourraient être à l'origine de rechutes, systématiques dans le LCM. Nous avons ensuite démontré que l'obinutuzumab, un anti-CD20 de nouvelle génération, peut contrecarrer la résistance au Venetoclax dans notre modèle de co-culture « CD40L + cytokines » *ex vivo*, par inhibition de l'expression de Bcl-xL dépendante de la voie NF-κB.

En résumé, nous avons, lors de cette étude, développé un modèle de co-culture basé sur l'interaction CD40-CD40L et des cytokines. Ce modèle est reproductible et permet la survie et la prolifération des cellules primaires de LCM sur le long terme. Ce modèle apporte de nouvelles connaissances sur le rôle du microenvironnement dans la régulation des voies moléculaires telles que NF-κB et la famille Bcl-2. L'ensemble des connaissances sur le paysage mutationnel des cellules tumorales, sur l'influence du microenvironnement et le développement d'inhibiteurs de plus en plus spécifiques permettront l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques rationnelles pour surmonter la résistance des cellules aux traitements de premières lignes.

LYMPHOID NEOPLASIA

Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma

David Chiron,^{1,2} Céline Bellanger,^{1,2,*} Antonin Papin,^{1,2,*} Benoit Tessoulin,^{1,3} Christelle Dousset,^{1,2,4} Sophie Maiga,^{1,2} Anne Moreau,⁵ Julie Esbelin,⁶ Valérie Trichet,^{2,7} Selina Chen-Kiang,⁸ Philippe Moreau,^{1,3} Cyrille Touzeau,^{1,3} Steven Le Gouill,^{1,3} Martine Amiot,^{1,2} and Catherine Pellat-Deceunynck^{1,2}

¹Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, INSERM, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Nantes, Nantes, France; ²Groupement De Recherche 3697 Micronit, CNRS, Tours, France; ³Service d'Hématologie Clinique, Unité d'Investigation Clinique, ⁴Centre d'Investigation Clinique, INSERM, ⁵Service d'Anatomie Pathologique, and ⁶Service de Gynécologie et Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France; ⁷Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France; and ⁸Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell Medical College, Cornell University, NY

Key Points

- CD40L plus cytokines induces cell-cycle progression and loss of mitochondrial priming, leading to drug resistance in MCL.
- CD40L plus cytokines mimics in situ molecular profiles and allows the development of new approaches by integrating the role of the microenvironment.

Mantle cell lymphoma (MCL) accumulates in lymphoid organs, but disseminates early on in extranodal tissues. Although proliferation remains located in lymphoid organs only, suggesting a major role of the tumor ecosystem, few studies have assessed MCL microenvironment. We therefore cocultured primary circulating MCL cells from 21 patients several weeks ex vivo with stromal or lymphoid-like (CD40L) cells to determine which interactions could support their proliferation. We showed that coculture with lymphoid-like cells, but not stromal cells, induced cell-cycle progression, which was amplified by MCL-specific cytokines (insulin-like growth factor-1, B-cell activating factor, interleukin-6, interleukin-10). Of interest, we showed that our model recapitulated the MCL in situ molecular signatures (ie, proliferation, NF- κ B, and survival signatures). We further demonstrated that proliferating MCL harbored an imbalance in Bcl-2 family expression, leading to a consequent loss of mitochondrial priming. Of interest, this loss of priming was overcome by the type II anti-CD20 antibody obinutuzumab, which counteracted Bcl-x_L induction through NF- κ B inhibition. Finally, we showed that the mitochondrial priming directly correlated with the sensitivity toward venetoclax and alkylating drugs. By

identifying the microenvironment as the major support for proliferation and drug resistance in MCL, our results highlight a selective approach to target the lymphoma niche. (*Blood*. 2016;128(24):2808-2818)

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a rare but incurable subtype of non-Hodgkin lymphoma (NHL) deriving from immunoglobulin M+ (IgM⁺) CD5⁺ B cells, which initially accumulate in secondary lymphoid organs (LO) such as the lymph nodes or spleen. Hallmarks of MCL include aberrant activation of the cyclin D1/CDK4 complex, which supports unrestrained cell-cycle progression, and deregulation of the apoptotic machinery that leads to drug resistance.^{1,2} Recently, progress in high-throughput technology provided considerable advancement in our understanding of secondary intrinsic alterations in MCL, such as SOX11 aberrant expression or frequent mutations of *ATM/TP53*, NF- κ B regulatory genes, and Notch receptors.³⁻⁵

As described in other B-cell malignancies,^{6,7} extrinsic signaling is believed to favor MCL growth, survival, and migration.⁸ Interactions come from multiple microenvironments and support both nodal and extranodal manifestations (bone marrow, gastrointestinal), as highlighted by the early dissemination observed in most MCL patients at presentation. However, there is relatively little information regarding the

nature of surrounding cells and soluble factors and the resulting molecular regulations induced in MCL. Further investigations that integrate the key role of the microenvironment are now needed to overcome tumor drug resistance in protective niches. The benefits of such an approach have been recently reinforced by studies reporting that selective inhibition of BTK or phosphatidylinositol 3-kinase δ , critical kinases of the B-cell receptor (BCR) and CXCR4 pathways, prevents the homing of MCL, leading to peripheral lymphocytosis.⁹⁻¹² However, the consequences of cell egress in the peripheral blood (PB) on proliferation and survival are still unclear and need further investigations.

In situ, lymphoma B cells are in close contact with cells of immune origin, including CD40L-expressing T cells or macrophages, and mesenchymal cells such as specialized stromal or follicular dendritic cells.^{8,13} Few studies have shown that coculture with stromal cells promoted MCL cell survival through several mechanisms, such as a decrease in Bim expression¹⁴ or cell adhesion-mediated drug resistance.¹⁵ However, regulations induced by coculture are still

Submitted 3 June 2016; accepted 22 September 2016. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, 3 October 2016; DOI 10.1182/blood-2016-06-720490.

*C.B. and A.P. contributed equally to this manuscript.

The online version of this article contains a data supplement.

There is an Inside *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2016 by The American Society of Hematology

unclear, because both cell-cycle arrest^{16,17} and cell expansion^{18,19} have been described. Difficulties in culturing circulating primary MCL cells (observed in around 20% of patients) greatly impeded their long-term use *ex vivo*, and in contrast to normal B-cell or chronic lymphocytic leukemia (CLL), CD40 stimulation generally failed to induce absolute long-term expansion.^{20,21} These limitations restrained most functional studies to a restricted number of well-described MCL cell lines.

In the present work, we further characterized microenvironment-dependent proliferation, survival, and drug resistance of primary MCL cells ($n = 21$) and developed a unique *ex vivo* model for long-term primary MCL cell culture. This model efficiently mimicked molecular signatures observed in lymphoid tissues and allowed us to develop novel mechanism-based strategies that effectively target cancer cells and counteract *in situ* drug resistance.

Methods

Culture and coculture of primary MCL cells and cell lines

Primary cells were obtained after informed consent from MCL patients treated at the Department of Clinical Hematology from the University Hospital of Nantes, France (ethical approval DC-2011-1399). After Ficoll-Hypaque separation, the percentage of CD19⁺/CD5⁺ cells was assessed by flow cytometry, either directly or after storage in liquid nitrogen (fetal calf serum 10% dimethyl sulfoxide). When CD19⁺/CD5⁺ cells infiltration was <90%, MCL cells were purified with anti-human CD19-conjugated magnetic beads (Miltenyi, Paris, France). Primary cells were plated over preestablished layers of adherent stromal cells (primary human mesenchymal stem cells [hMSC]), mitomycin-C-treated parental [L], or CD40L-expressing fibroblast L cells [L-40L], as described previously,²² with or without cytokines (50 ng/mL interleukin-10 [IL-10], 50 ng/mL B-cell activating factor [BAFF], 10 ng/mL insulin-like growth factor-1 [IGF-1], 1 ng/mL IL-6). The ratio of adherent cells and primary MCL cells was 1/10. L-40L cells were kindly provided by Dr. T. Defrance (Lyon, France), and hMSC cells were isolated as described previously.^{23,24} Once a week, primary cells were gently unhooked and counted. Cells were then diluted in fresh medium containing cytokines and plated over fresh layer of adherent cells. For comparison with normal naïve CD5⁺ B cells, cord blood B cells (CBBC) from healthy volunteers were isolated and cultured using the same protocol. MCL cell lines, commercial (JeKo-1, Maver-1, Z138) or generated in our laboratory (NTS1-3, characterized by GEP, GSE86322), were identified using a flow cytometry-based barcode as previously described.²⁵ They were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum and 2 mM glutamine. JeKo-1 and Maver-1 were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany); Z138 was purchased from ATCC (Manassas, VA).

Cell cycle. Primary cells were incubated overnight with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) on a preestablished layer of mitomycin-C-treated L-40L or hMSC cells and then fixed and permeabilized in 70% ethanol for at least 24 hours at 4°C before staining. Ki67 and pS10H3 staining was performed according to the protocol described by Vignon et al.²⁶

BH3 profiling. BH3 profiling was performed using the BH3-mimetic Venetoclax (VNT, 2–20 μ M), the BIM BH3 peptide (0.05 μ M), and engineered HRK* BH3 (5 μ M) and Noxa* BH3 (5 μ M) peptides. The peptide sequence for Noxa* (MS1) has been previously described.²⁷ We used a new sequence peptide for HRK* (Y4eK_21) recently described,²⁸ which showed significant improved efficacy for identifying cells dependence on Bcl-x_L vs Bcl-2. Permeabilized cells were exposed to peptides for 45 minutes at 27°C before fixation with 2% formaldehyde at room temperature for 15 minutes. After addition of neutralizing buffer (Tris 0.41 mol/L glycine pH 9.1) for 5 minutes, cells were stained with anti-cytochrome c–Alexa647 (BLE612310, Ozyme) 1:40 in 0.1% Saponin/1% bovine serum albumin/phosphate-buffered saline overnight at 4°C. Loss of cytochrome c was quantified by gating the cytochrome c negative population measured by flow cytometry.

RNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded samples. Purification of total RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded lymphoid tissues (patients 5 and 22: lymph nodes; patient 16: spleen) was done on freshly

cut 10- μ m sections according to manufacturer's protocol (cat. no. 73504; Qiagen).

Cell viability, short interfering RNA (siRNA) transient transfections, real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Immunoblot assays have been previously described.¹¹ Antibodies and reagents are detailed in supplemental Table 1 (available on the *Blood* Web site) and statistical analyses were performed using Student *t* test, paired Student *t* test, or Wilcoxon test.

Results

CD40L⁺ cells, but not mesenchymal cells, induce primary MCL proliferation in the presence of specific growth factors

In spite of the significant level of the proliferation index Ki67 (gene *MKI67*) in secondary LOs and the elevated percentage of circulating malignant cells (Figure 1A; Table 1), we did not detect any proliferating (BrdU⁺) PB MCL cells, which were in the G1-phase of the cell cycle (Figures 1B; supplemental Figure 1A). In contrast to MCL, normal IgM⁺ CD5⁺ B cells, purified from cord blood (CBBC), were quiescent (G0-phase) (Figure 1B; supplemental Figure 1B). Direct comparison of *MKI67* expression in paired samples from MCL LO and PB showed that the proliferation index dramatically dropped in PB (Figure 1C), confirming that *in vivo* proliferation was related to the LO microenvironment. Thus, we used primary hMSC and CD40L-expressing L-40Ls to mimic stromal and lymphoidlike interactions. L-40L cells, but not hMSCs, were able to induce cell-cycle progression (median BrdU⁺ cells hMSC, 3%; range, 0–11; L-40L, 29%; range, 10–42; $n = 5$) (Figure 1D). The progression into the cell cycle observed on the L-40L layer was dependent on CD40 stimulation, with parental L cells being unable to induce proliferation and sCD40L successfully triggered the cell cycle, albeit less potently (supplemental Figure 2A–B). Biopsies from LO revealed a significant RNA level (*CD40LG*) in the tumor niche, confirming that CD40 stimulation can occur *in situ* (supplemental Figure 2C).

Because cytokines are required for B-cell proliferation, we assessed the expression of cytokine receptors *in vivo* in MCL cells from LO (RNA-seq) and PB (flow cytometry) (supplemental Figure 3A–B). Given that the receptors for IL-6, IL-10, IGF-1, and BAFF cytokines, which were previously identified to significantly promote MCL survival,^{18,29,31} were expressed in LO MCL, we used a cocktail composed of these MCL specific growth factors. Even though IL-4 has been used in most MCL models,^{19,32,33} it was excluded from our study because of a low IL-4R level and to a dramatic IL-4-induced expression of CD23, which is typically unexpressed in MCL *in vivo* (supplemental Figure 3C).³⁴ Cytokines were critical for enhancing the magnitude of proliferation because they considerably increased BrdU⁺ cells (S-phase) when cocultured on L-40L cells (3-fold induction, $n = 9$) (Figure 1E). The cytokine cocktail (Ck) was more efficient than each cytokine alone (supplemental Figure 3D).

Coculture on the L-40L layer in the presence of the Ck (L-40L+Ck) also reproduced the *in vivo* aggressive behavior of blastoid MCL variants. Indeed, the proportion of cells in S-phase was significantly higher for MCL cells with blastoid morphology (median D7, 50%; $n = 3$) than cells of the common type (median D7, 15%; $n = 4$) (Student *t* test, $P = .01$) (Table 1; supplemental Figure 4A). Prolonged stimulation on L-40L+Ck allowed for long-term expansion of primary cells (Figure 1F) and expression of cyclin-D1 and monoclonality confirmed that expanded cells were MCL cells (supplemental Figure 4B–C). Using this system, we were able to maintain proliferation of primary MCL cells for several weeks, and most MCL samples remained dependent on the extrinsic signal over time. After several months of culture, t(11;14) Epstein-Barr

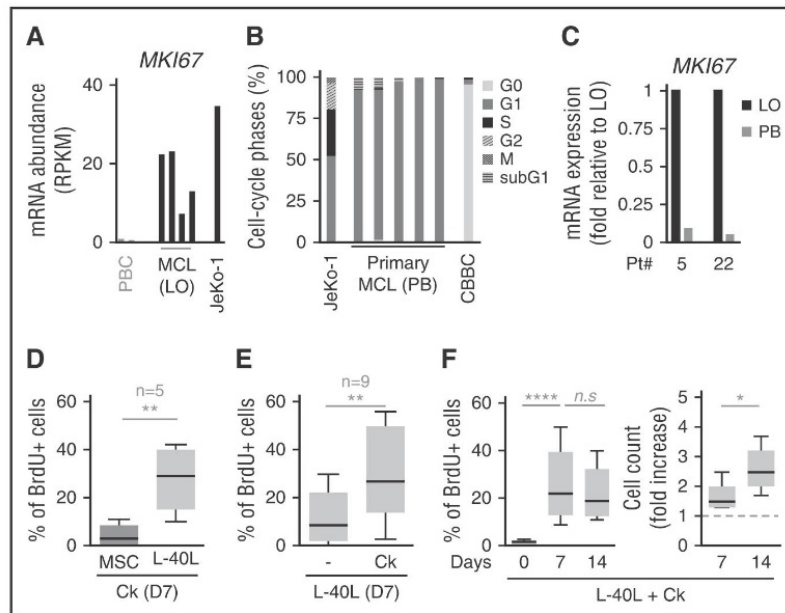


Figure 1. CD40L⁺ but not mesenchymal cells support primary MCL cell proliferation ex vivo. (A) Whole transcriptome sequencing analysis of mRNA abundance (RPKM) of *MKI67* (Ki67 gene) in cyclinD1⁺ primary MCL cells from LO, CD19⁺ PB B cells (PBC) from 2 healthy volunteers, and JEKO-1, as previously described.⁵⁴ (B) Cell distribution in the different cell-cycle phases (%) for 1 proliferating cell line (JeKo-1), 5 primary PB MCL samples, and CD5⁺ CBBCs (healthy donor). The results are detailed in supplemental Figure 1B. (C) qRT-PCR analysis of the *MKI67* gene in primary cells concomitantly isolated from LO and PB for 2 MCL patients. Pt, patient. (D) BrdU/propidium iodide staining of primary MCL cells (n = 5) in the presence of hMSC or L-40L coculture layer and cytokines for 7 days as indicated; paired Student *t* test. (E) BrdU/propidium iodide staining of primary MCL cells (n = 9) in the presence of L-40L coculture layer with or without cytokines for 7 days as indicated; paired Student *t* test. (F) Left (n = 9): cell-cycle analysis (% of BrdU⁺ cells) of primary MCL cells for the time and condition indicated; Student *t* test. Right (n = 5): total number of live cells is represented as fold increase from input on day 0; Student *t* test. n.s., not significant. **P* < .05, ***P* < .01, *****P* < .0001.

virus⁺ subclones gave rise to 2 microenvironment independent cell lines (NTS-1 from patient 10; NTS-2 from patient 15), whereas the t(11;14) Epstein-Barr virus[−] MCL cell line NTS-3 (from patient 16) remained dependent on CD40L and displayed a molecular profile close to widely used commercial MCL cell lines (supplemental Figure 4D-E).

Ex vivo L-40L + Ck coculture model induces a lymphoid organ-like molecular profile in peripheral MCL cells

To assess whether our ex vivo model did recapitulate an LO-like MCL profile, we compared L-40L + Ck cocultured primary MCL cells with

LO/PB paired MCL samples. We first showed that, compared with PB, *MKI67* increased in situ in LO and ex vivo in coculture. The cell-cycle activation was also confirmed at the protein level by the increase in phosphorylation of Rb (pRb) or in proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in the Rb-negative sample (patient 11) (Figure 2A-B).

In addition, the analysis of NF-κB target genes (*IL2RG*, *PLEK*, and *CD74*)³⁵ in paired LO/PB MCL samples revealed an induction in LO, suggesting that NF-κB activation by the microenvironment occurred in vivo (Figure 2C). This induction was recapitulated in L-40L + Ck coculture and, accordingly, was associated with a potent and lasting NF-κB activation through the

Table 1. Characteristics of patients with MCL

Patient	Status	Age	Sex	slg	Blastoid variant	Ki67 ⁺ (%)	CD19 ⁺ CD5 ⁺ (% in PB)	CD5 (ratio MFI)
1	D	67	M	κ	No	ND	60	21.0
2	R	86	M	κ	ND	ND	50	7.1
3	D	73	M	ND	ND	ND	80	16.8
4	R	80	F	κ	No	ND	80	7.9
5	D	74	F	κ	No	10	85	17.6
6	R	62	M	λ	Yes	90	80	18.3
7	D	61	F	λ	ND	ND	28	25.6
8	R	67	M	λ	ND	ND	33	8.8
10	D	69	F	κ	No	ND	60	4.0
11	R	73	F	κ	No	ND	60	5.2
12a	D	69	F	κ	No	30	22	7.5
12b	D	69	F	κ	No	ND	68	30.2
13	D	73	M	κ	No	30	55	3.5
14	R	73	M	λ	ND	ND	70	16.0
15	R	79	F	κ	Yes	40	85	84.3
16	R	73	F	κ	Yes	40	90	22.0
17	D	82	F	κ	ND	ND	33	1.7
18	D	76	M	κ	No	30	25	18.4
19	R	81	M	κ	ND	ND	22	5.0
20	R	72	M	κ	Yes	65	67	16.7
21	D	70	F	λ	ND	ND	75	1.3
22	D	75	M	ND	Yes	70	84	60.0

Ki67 expression was determined in CCND1⁺ cells by immunohistochemistry. All but 1 (12b, pleural effusion) sample was obtained from PB. D, diagnosis; F, female; M, male; MFI, mean fluorescence intensity; ND, not determined; R, relapse.

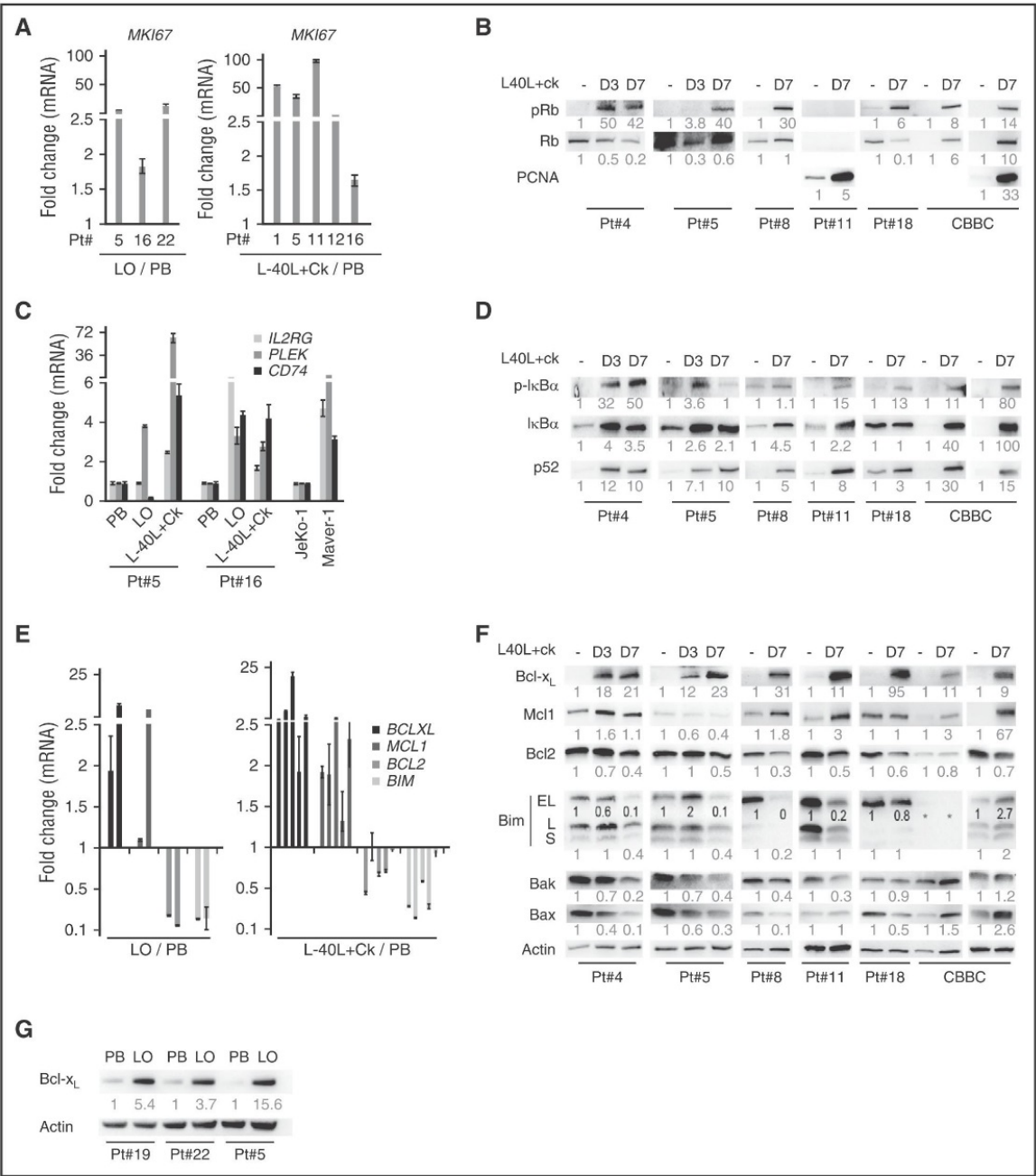


Figure 2. Extrinsic stimulations result in proliferation, NF-κB activation and in an unbalanced modulation of the Bcl-2 family in primary MCL cells. (A) qRT-PCR analysis of MKI67 from: left, primary MCL cells concomitantly isolated from LO (Pts 5 and 22: lymph node, Pt16: spleen) and PB; right, PB primary MCL cells cocultured on an L-40L layer in the presence of cytokines (D7) and relative to PB. (B) Immunoblotting of cell-cycle related proteins (pRb, Rb, PCNA) in primary CD5⁺ cells isolated from healthy donor (CBBC) or MCL patients (PB) at D0 and after coculture on L-40L+Ck at the time indicated (D3, D7). (C) qRT-PCR analysis of NF-κB target genes (*IL2RG*, *PLEK*, and *CD74*)³⁸ in primary MCL cells cultured as in panel A. Maver-1 and JeKo-1 were used as NF-κB signaling positive and negative controls, respectively.⁴ (D) Immunoblotting of classical (p-IκBα) and alternative (p52) NF-κB pathway proteins in primary MCL cells as in panel B. (E) qRT-PCR analysis of indicated genes in primary MCL cells cultured as in panel A. (F) Immunoblotting of Bcl-2 family proteins in primary MCL cells as in panel B. *Highlights Bim underexposure resulting from high expression in sample 18. (G) Immunoblotting analysis of indicated proteins in primary MCL cells concomitantly isolated from LO and PB. Quantification of protein level was normalized to actin and indicated below each protein.

phosphorylation of NF-κB inhibitor alpha (*p-IκBα*) and accumulation of p52. Of note, Maver-1 (known as constitutive NF-κB activated cells)⁴ but not JeKo-1 cells displayed similar expression

of NF-κB target genes (Figure 2C-D). Moreover, primary MCL cells isolated from LO displayed elevated level of NF-κB target genes as well as other NF-κB signature genes (*NFKBIA*, *NFKBIE*,

RELB, *BIRC3*, *TNFAIP3*, *MALT1*)³⁵ compared with JeKo-1 cells (supplemental Figure 5).

Finally, in good agreement with gene and protein expression *in situ*, we observed an increase in Bcl-x_L and Mcl-1 and a decrease in Bcl-2 and Bim expression *ex vivo* (Figure 2E-G). In addition, expression of both effector proteins Bak and Bax was decreased (Figure 2F). These microenvironment regulations were in favor of survival and appeared to be restricted to tumor cells. Indeed, although coculture induced proliferation (pRb⁺PCNA⁺) of CBBC and increased expression of Bcl-x_L and Mcl-1, it did not decrease the expression of Bim, Bak, or Bax (Figure 2F).

Taken together, these results showed that PB MCL cultured with L-40L+Ck displayed a molecular signature of proliferation, NF-κB pathway, and survival, which was similar to MCL in LO. In contrast, we did not observe similar NF-κB activation or modulation of Bcl-x_L, Bcl-2, and Mcl-1 in primary MCL cells cocultured on hMSC. Nevertheless, expression of Bim (EL) was decreased as previously reported (supplemental Figure 6A).¹⁴

Microenvironment-dependent upregulation of Bcl-x_L mediates loss of priming

To determine the functional involvement of microenvironment-induced modulation in expression of Bcl-2 family proteins at the mitochondrial level, we performed flow cytometry BH3 profiling. Using this functional assay, we determined the global priming of the cells using a BIM peptide, which targets all antiapoptotic proteins, and MCL cells dependency on individual antiapoptotic proteins through the use of selective peptides (HRK*, NOXA*) or the BH3 mimetics (VNT) highly specific for Bcl-x_L, Mcl-1, or Bcl-2.³⁶ Resting cells from PB were highly primed for death because BIM peptide induced dramatic cytochrome c release in 77 ± 7% of cells. They were mostly primed on Bcl-2 (strong VNT response, 54 ± 28%) and moderately on Bcl-x_L (weak HRK* response, 19 ± 16%) but not at all on Mcl-1 (no NOXA* response, 2 ± 5%). By contrast, MCL cultured on L-40L+Ck were far less primed (decrease in BIM response, 34 ± 20%) and unprimed to Bcl-2 and Bcl-x_L (2 ± 2% and 6 ± 8%, respectively) (Figure 3A). The loss of priming was specific to MCL cells cultured on L-40L+Ck and was not observed when primary cells were cultured on hMSC (supplemental Figure 6B).

To assess the functional consequences of this priming loss at the cellular level, we compared the drug sensitivity of primary MCL cells freshly isolated from PB and after 7 days on L-40L+Ck coculture. As expected, and in accordance with the priming assays, prolonged coculture resulted in full resistance to 25 nM VNT (Figure 3B). L-40L+Ck cocultured MCL cells also became more resistant to the alkylating drug bendamustine but remained sensitive to the proteasome inhibitor bortezomib (BTZ; Figure 3C). siRNA against Bcl-x_L similarly impaired CD40L-dependent resistance to both bendamustine and VNT, highlighting the central role of Bcl-x_L in CD40L-dependent MCL resistance (Figure 3D).

In accordance with the lack of Bcl-x_L induction, the loss of priming, the resistance to VNT and bendamustine were not observed in MCL cells cocultured with hMSC (supplemental Figure 6C-D).

Given the high expression of Bcl-x_L in MCL cell cocultured on L-40L+Ck, lack of priming on Bcl-x_L was unexpected and suggested that Bcl-x_L could be “empty” of proapoptotic proteins at mitochondria. Indeed, no association with Puma and Bid BH3-only activators or the proapoptotic multidomain Bax was detected and only weak Bcl-x_L/Bim and Bcl-x_L/Bak complexes were observed (Figure 4A and data not shown). We then hypothesized that Bcl-x_L could bind Bcl-2–released BH3 only, leading to loss of

priming and consequent drug resistance. Indeed, in L-40L+Ck cultured cells pretreated with VNT, which selectively disrupted Bcl-2-BH3-only complexes, we demonstrated that Bim released from Bcl-2 was associated with Bcl-x_L after VNT exposure (Figure 4B). This was confirmed by BH3-profiling, VNT pretreatment making the cells now selectively primed on Bcl-x_L as shown by cytochrome c release induced by HRK* peptide (Figure 4C). Taken together, our results demonstrated that CD40L-dependent Bcl-x_L induction triggered loss of mitochondrial priming through its ability to capture back BH3-only released from its complex with Bcl-2 (Figure 4D). Dual inhibition of Bcl-2 and Bcl-x_L are thus needed to target MCL cells located in both peripheral blood and protective niches. This was confirmed by the high efficiency of Bcl-2 (VNT) and BclxL (A131852) BH3 mimetics sequential combination, which overrode microenvironment drug resistance (Figure 4E).

Microenvironment/NF-κB-dependent Bcl-x_L upregulation is counteracted by the type II anti-CD20 monoclonal antibody obinutuzumab

BH3-mimetic targeting both Bcl-2 and Bcl-x_L (Navitoclax) could counteract the loss of priming observed, but its clinical use has been limited by induction of toxicity such as thrombocytopenia.³⁷ Novel approaches to impair microenvironment-dependent induction of Bcl-x_L selectively in tumor cells are thus needed. Previous studies have demonstrated that even if Bcl-x_L is regulated by multiple transcription factors, NF-κB preferentially controlled CD40L-dependent Bcl-x_L induction.³⁸ The NF-κB inhibitor Bay-11-7082, which inhibits both classical (p-IκBα) and alternative (p52) CD40L-dependent activation, also totally impaired Bcl-x_L induction in primary MCL cells (Figure 5A). BTZ has also been shown to rapidly impair NF-κB activity through proteasome inhibition and accumulation of p-IκBα in MCL cell lines.³⁹ As observed in Figure 5A, in addition to blocking p-IκBα degradation, BTZ counteracted the CD40L-dependent p52 increase, leading to a substantial decrease in Bcl-x_L protein level.

Previous studies have shown that anti-CD20 monoclonal antibody (mAb, rituximab [RTX]) was able to downregulate Bcl-x_L through NF-κB inhibition in a model of B-cell NHL cell lines.⁴⁰ We then further investigated whether of anti-CD20 RTX (type I mAb) or obinutuzumab (type II mAb, OBN) could overcome microenvironment dependent Bcl-x_L upregulation. We demonstrated that OBN directly impaired IκBα and p52 expression (Figure 5B) and inhibited expression of NF-κB target genes (Figure 5C) in CD20^{High} but not in CD20^{Low} primary samples (ratio MFI <3; Figure 5D). Accordingly, *BCLXL* expression decrease (both at the messenger RNA [mRNA] and protein level) was deeper in CD20^{High} primary MCL cells than CD20^{Low} samples (Figure 5E). As observed in primary MCL cells, pretreatment of Maver-1 and Z138 cells with OBN induced the downregulation of *BCLXL*, whereas it did not significantly modulate expression of *BCL-2* and *MCL-1*. OBN induced the downregulation of both constitutive and CD40L-induced *BCLXL* expression (Figure 5F-G), and we wondered whether it could prevent loss of priming. Indeed, OBN counteracted loss of priming as highlighted by the increased cytochrome c release using Bim peptide or different concentration of VNT (Figure 5H). Taken together, our results demonstrate that OBN overcome microenvironment-dependent Bcl-x_L upregulation and consequent loss of mitochondrial priming through inhibition of the NF-κB axis.

In good agreement with BH3 profiling, OBN sensitized MCL cells to VNT cytotoxicity (Figure 6A). In Maver-1 cells, pretreatment with OBN counteracted CD40L-dependent resistance to VNT. Similarly a

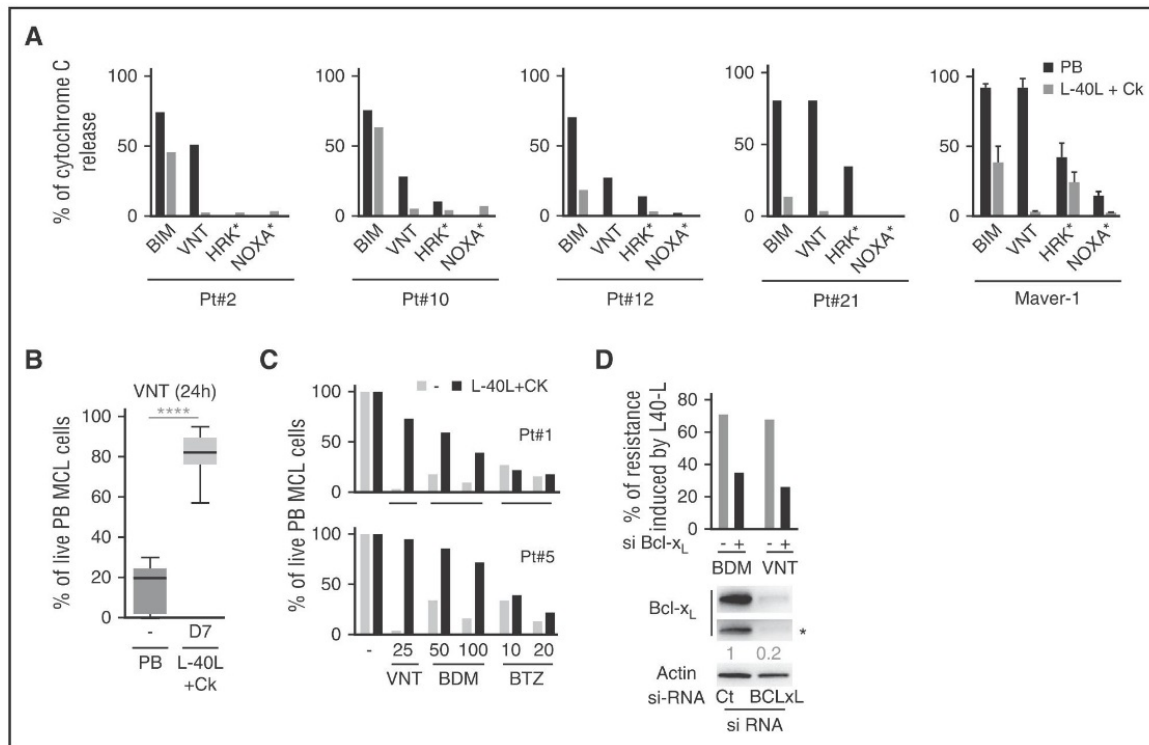


Figure 3. Microenvironment-dependent loss of mitochondrial priming and acquired drug resistance in primary MCL cells. (A) BH3 profiling of primary MCL cells from 4 patients and Maver-1 cells performed as described in "Methods." Values for Maver-1 cells are the mean of 3 independent experiments. (B-C) Primary MCL cells freshly isolated from PB (-) or after 7 days on an L-40L or hMSC layer in the presence of cytokines were cultured with VNT (25 nM), bendamustine (BDM; 50-100 μ M), or BTZ (10-20 nM) for 24 hours. Viability was then addressed by annexin-V staining, the % of live cells is represented as the % of control (without treatment). **** P < .0001; paired Student t test. (D) siRNA against *BCLXL* reduced Bcl-x_L protein expression and impaired L-40L-induced protection against BDM (24 hours, 100 μ M) or VNT (24 hours, 50 nM) cytotoxicity in Maver-1 cells. *Lower exposure. Representative western blot of 3 experiments.

supraadditive effect of the combination was also observed for intrinsically VNT-resistant JeKo-1 and Z138 cells (observed value > expected value, Figure 6A). OBN pretreatment also counteracted CD40L-dependent resistance to bendamustine and to AraC to a lesser extent (Figure 6B).

Although both RTX and OBN bind to CD20, OBN is a type II antibody described as displaying stronger direct cell death activity.⁴¹ In contrast, RTX (0.5-5 μ g/mL) neither induced direct cytotoxicity nor sensitized MCL cell lines to VNT (data not shown). Similarly, primary MCL cells were more sensitive to direct OBN than to RTX cytotoxicity (median cell death: OBN, 40%; RTX, 16%; Figure 6C).

Of interest, whereas low doses of single agent OBN (0.5 μ g/mL) did not induce cell death in cell lines, cocultured primary cells were sensitive (Figure 6D). Finally, VNT and OBN alone triggered 15% (range, 2-28) and 30% (9-54) cell death, respectively, and in combination induced 54% (18-71) (Figure 6E), CD20^{High} samples being more sensitive to the combination than CD20^{Low} samples (supplemental Table 2).

Discussion

Recently, considerable effort has been invested on the identification of intrinsic MCL abnormalities,³⁻⁵ but little attention has been paid to the importance of the microenvironment in this pathology. Herein, our

observations confirmed that well-known intrinsic abnormalities such as overexpression of cyclin-D1 and Bcl-2 are not sufficient to recapitulate the proliferation observed in situ or to protect malignant cells against spontaneous apoptosis ex vivo. To further understand the central role of extrinsic signaling in MCL cells, we established ex vivo models using stromal (hMSC) or lymphoid-like (L-40L) coculture and demonstrated that L-40L, associated with specific growth factors, not only promoted extended survival but also the progression into the cell cycle in primary MCL cells.

Cytokines play a critical role in hematological malignancies and receptors for IL-6, BAFF, IL-10, and IGF-1 have been previously identified as important survival factors in MCL.^{18,29-31} Because all MCL cells did not homogeneously express the 4 growth factor receptors, we did not investigate the individual role of each cytokine and decided to keep the same cocktail for all samples. Even though CD40L allows cells to go through G1 into S phase, we demonstrated that these specific cytokines potentiated cell-cycle progression and allow long-term expansion in all samples tested. In contrast, although hMSC similarly protected MCL cells against spontaneous apoptosis, they were unable to promote proliferation (Figure 1), which was consistent with the previously described cell-cycle arrest upon stromal interaction¹⁶ and the tissue-specific cell-cycle control observed in vivo.⁴²

A study recently highlighted activation of BCR/NF- κ B signaling as well as tumor proliferation in LO resident cells in situ.⁴³ Of interest, we demonstrated that modulations observed after L40L+Ck coculture

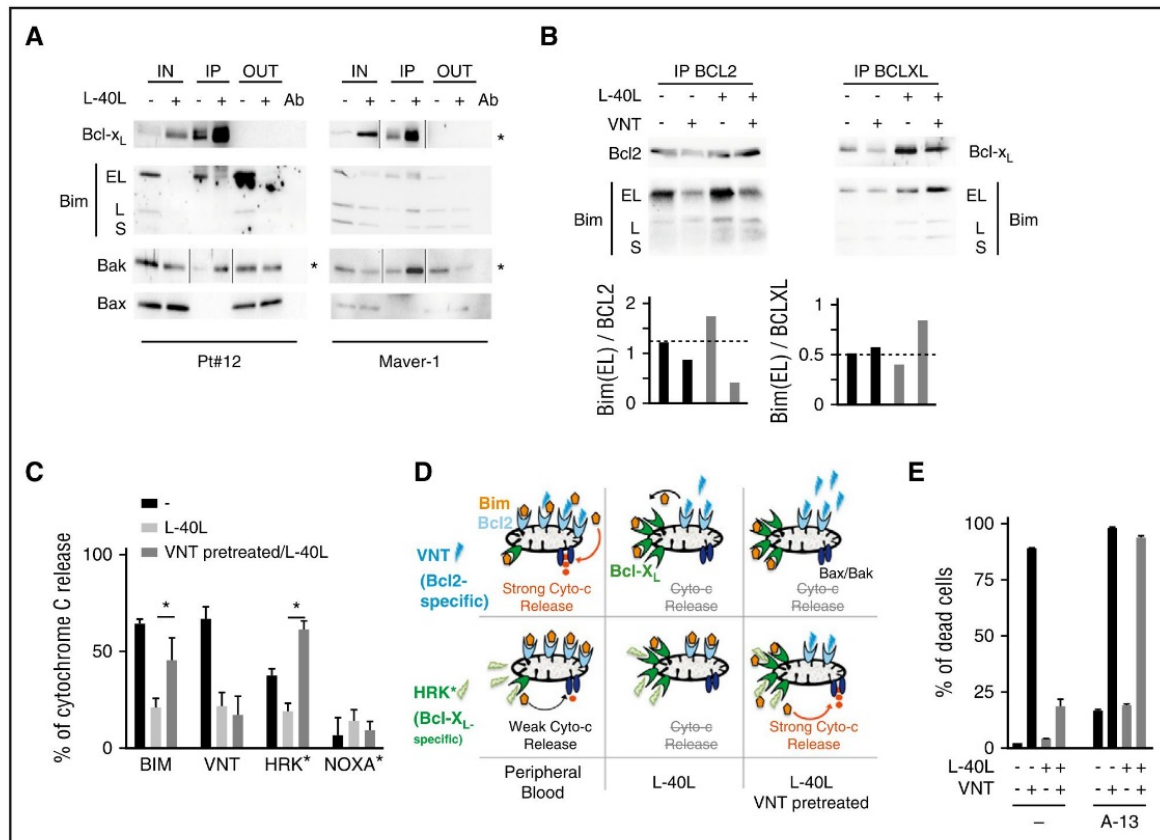


Figure 4. Microenvironment-dependent upregulation of Bcl-x_L mediates loss of priming. (A) Bcl-x_L immunoprecipitation in primary MCL cells (Pt 12) and Maver-1 cells cocultured or not on L-40L + Ck. The lysate (IN), immunoprecipitates (IP), and IP supernatants (OUT) were analyzed by immunoblotting for the indicated proteins. *Highlights different exposure for IP and IN/OUT. (B) Bcl-2 and Bcl-x_L immunoprecipitation in Maver-1 cells cocultured or not on L-40L with or without VNT (3 hours, 50 nM) pretreatment. Lower, Quantification of protein level. (C) BH3-profiling of Maver-1 cells cultured as in panel B and performed as described in "Methods." Values are the mean of 3 independent experiments. (D) Schematic representation of how microenvironment-dependent upregulation of Bcl-x_L mediates loss of priming. (E) Maver-1 cells cultured or not on L-40L with or without VNT (50 nM) and Bcl-x_L mimetic A1331852 (0.5 μM). Cell death was assessed using annexin-V staining. Values are the mean of 3 independent experiments.

mimicked the differential proliferation, NF-κB, and BCR signature observed in malignant cells from LO vs PB (Figure 2 and data not shown). This observation highly suggests that our ex vivo model is relevant and that CD40L-expressing T cells in situ might play a role in tumor maintenance. T cells are present in MCL LO,⁴⁴ and we showed the CD40L mRNA expression in tissue biopsies. In addition, colocalization of primary MCL cells with T cells were recently evidenced in a xenograft model of NSG mice.⁴⁵ By using peripheral circulating MCL cells, our model also offers a process not only for expanding primary MCL cells to perform genomic/cellular analyses, but also for establishing MCL cell lines.

In addition to inducing progression into the S-phase of the cell cycle, L-40L + Ck coculture also resulted in anti- and proapoptotic Bcl-2 family member modulation, leading to a decrease in mitochondrial priming and a consequent drug resistance. We observed that increase in the expression of the antiapoptotic Bcl-x_L protein was associated with a striking downregulation in the expression of the proapoptotic Bim, Bax, and Bak proteins in primary MCL cells. Of note, this unbalanced regulation seemed to be restricted to MCL cells because it did not occur in naïve CBBC (Figure 2) or normal memory B cells, as previously described.²² We demonstrated that CD40L-NF-κB-mediated Bcl-x_L upregulation was responsible for loss of mitochondrial priming and

drug resistance. Using BH3 profiling, we showed a dynamic sequestration of the BH3-only activator Bim by Bcl-x_L proteins at the mitochondrial level. Our results are consistent with previous studies showing microenvironment-dependent unpriming⁴⁶ and Bcl-x_L induction⁴⁷ in CLL primary cells, reinforcing the central role of microenvironment-dependent signaling in lymphoid malignancies drug resistance.

Although the dramatic Bcl-x_L increase was the direct consequence of CD40L-dependent NF-κB induction, mechanisms of the differential regulation of other BCL-2 family members are still unclear. Further investigation is now needed to decipher specific cytokine effects as well as potential indirect regulation resulting from cell-cycle progression or epigenetic regulations.

Given the central role of CD40-NF-κB-Bcl-x_L signaling in mitochondrial regulation, we investigated how to overcome this extrinsically induced drug resistance. As expected, CD40L-cocultured MCL cells remained sensitive to BTZ because it rapidly neutralizes NF-κB activity³⁹ and consequently impairs Bcl-x_L upregulation. Although BTZ recently received US Food and Drug Administration approval for first-line use in patients with MCL, its efficacy is limited by major side effects.⁴⁸ We further assessed the ability of anti-CD20 mAbs to inhibit the CD40-NF-κB-Bcl-x_L pathway because they were

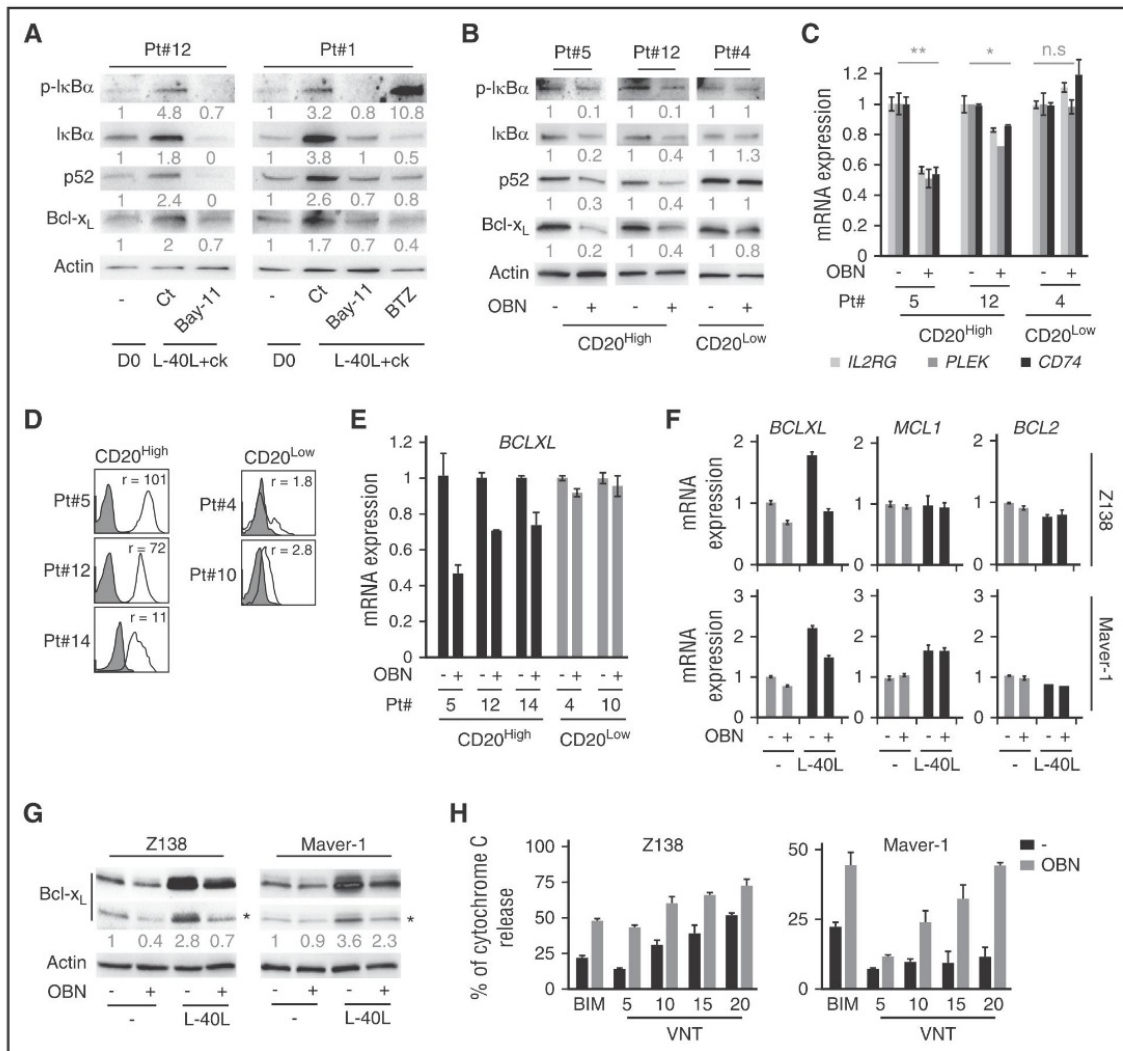


Figure 5. Obinutuzumab counteracts microenvironment-dependent loss of priming through NF-κB inhibition and Bcl-x_L downregulation in primary MCL cells. (A) Immunoblotting of indicated proteins in primary MCL cells cocultured on L-40L for 6 hours in the presence or absence of the NF-κB inhibitor Bay11-7082 (Bay11; 5 μM) or proteasome inhibitor BTZ (50 nM). (B) Immunoblotting analysis of the indicated proteins in CD20^{High} or CD20^{Low} primary MCL cells in the presence or absence of OBN (48 hours; 5 μg/mL). (C) qRT-PCR analysis of NF-κB targets (*IL2RG*, *PLEK*, and *CD74*)³⁵ in CD20^{High} or CD20^{Low} primary cells. (D) CD20 expression levels measured by fluorescence-activated cell sorting analysis on CD19⁺CD5⁺ primary MCL cells. (E) qRT-PCR analysis of *BCLXL* gene in CD20^{High} (black bars) or CD20^{Low} (gray bars). L-40L+Ck cocultured primary MCL cells in the presence or absence of OBN (24 hours; 5 μg/mL). (F-G) qRT-PCR analysis of *BCLXL*, *BCL2*, and *MCL1* (F) and immunoblotting of Bcl-x_L (G) in Z138 and Maver-1 cells cocultured or not on L-40L cells in the presence or absence of OBN (24 hours; 5 μg/mL). (H) BH3-profiling of Z138 and Maver-1 cells cocultured on L-40L+Ck in the presence or absence of OBN (24 hours; 0.5 μg/mL), was performed as described in "Methods."

reported to counteract microenvironment protection in CLL.⁴⁹ We demonstrated that the type II anti-CD20 antibody OBN, but not the type I RTX, was able to counteract NF-κB-induced overexpression of Bcl-x_L and the consequent loss of mitochondrial priming and drug sensitivity. This is consistent with previous works showing an increased direct cell death induction and superior B cell-depleting activity in lymph nodes and spleen treated with OBN in comparison with RTX.^{50,51} In contrast to BTZ, anti-CD20 mAb specifically targets B cells and thus induces limited in vivo adverse events.⁵² OBN has already demonstrated promising clinical activity as a single agent in MCL,⁵² and recent results from a phase 3 study in indolent NHL suggested an increased progression-free survival in combination with bendamustine.⁵³ In accordance, our preclinical data

highlighted that OBN significantly increased bendamustine cytotoxicity in CD40L-stimulated MCL cells. Our results also showed that OBN could be particularly efficient in combination with VNT. This Bcl-2-selective BH3 mimetic was highly cytotoxic for Bcl-2-dependent peripheral MCL cells, but became less efficient in CD40L-induced Bcl-x_L cells that displayed a similar profile to LO MCL cells. Although VNT shows encouraging results as a single agent, our results highly suggest that combinatorial therapy with OBN would improve patient response. Moreover, ibrutinib, which mediates indirect Bcl-x_L down-modulation upon BTK-dependent egress in the PB, could also increase in vivo VNT efficacy.¹¹ Our results predict that the combined use of these complementary and highly selective inhibitors may improve clinical responses with more

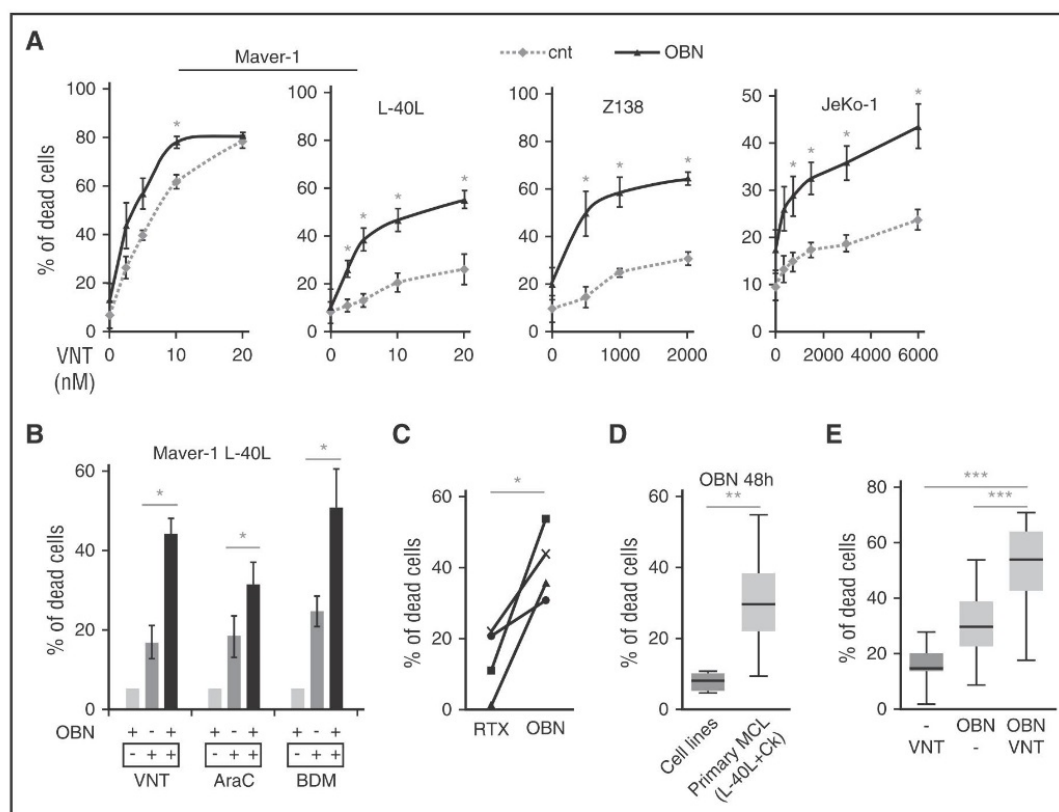


Figure 6. OBN counteracts microenvironment-dependent drug resistance in MCL cells. (A) Maver-1 cocultured or not on L-40L cells, and Z138 and JeKo-1 cell lines were treated with VNT for 48 hours at the indicated doses with or without OBN pretreatment (0.5 μ g/mL). *Observed value > expected value. (B) Maver-1 cells, in the presence of an L-40L coculture layer, were cultured with OBN (24 hours, 5 μ g/mL) alone or in sequential combination with OBN (24 hours, 5 μ g/mL) and then VNT (48 hours, 50 nM), cytarabine (AraC; 48 hours, 80 ng/mL) or BDM (48 hours, 100 μ M). (C) OBN (48 hours; 0.5 μ g/mL) but not RTX (48 hours; 0.5 μ g/mL) induced direct cell death in reactivated primary MCL cells (7 days on L-40L+Ck; $n = 4$); paired Student t test. (D) OBN (48 hours; 0.5 μ g/mL) induced direct cell death in L-40L+Ck cocultured primary MCL cells (7 days on L-40L+Ck; $n = 12$) but not in MCL cell lines ($n = 4$); Student t test. (E) L-40L+Ck cocultured primary MCL cells ($n = 11$) were cultured with VNT (24 hours; 25 nM), OBN (48 hours; 0.5 μ g/mL), or the sequential combination of OBN and then VNT, paired Wilcoxon test. Cell death was assessed using annexin-V staining. * $P < .05$, ** $P < .01$, paired Student t test.

efficiency and less toxicity than the current standard of care. Our ongoing Obinituzumab, GDC-0199 Plus Ibrutinib in Relapsed/Refractory Mantle Cell Lymphoma Patients (OAsIs) Trial for MCL patients (OBN, ibrutinib, and venetoclax, www.nationalclinicaltrials.gov, #NCT02558816) will rapidly determine in vivo efficacy.

In summary, we reported here the development of a reproducible ex vivo coculture model for primary MCL cells. This model has provided new insights into microenvironment-dependent proliferation and Bcl-2 family regulation, which are central components of survival and drug resistance. Our increased understanding of intrinsic abnormalities, the development of highly selective inhibitors and integration of the microenvironment offer new opportunities to design mechanism-based strategies that should overcome drug resistance in MCL and potentially other B-cell malignancies.

Acknowledgments

The authors thank the institut Régional du Cancer Nantes Atlantique tissue bank for providing samples and Roche for supporting in part this study.

This study was supported by Ligue Contre le Cancer Grand-Ouest and the Ligue Nationale Contre le Cancer and CHU de Nantes (D.C.).

Authorship

Contribution: D.C. designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the article. C.B. and A.P. performed experiments. B.T. participated in bioinformatics analysis. C.D. and S.M. performed experiments. A.M. provided biopsy samples. J.E. provided cord blood samples. V.T. provided human mesenchymal stem cells. S.C.-K. provided data and reviewed the article. P.M. participated in the design of the study and reviewed the article. C.T. participated in BH3 profiling assays. S.L.G. participated in the design of the study and data analysis and reviewed the article. M.A. and C.P.-D. participated in the design of the study and data analysis and in the writing of the article.

Conflict-of-interest disclosure: S.L.G. is a consultant/advisory board member and has received an honorarium from Roche. The remaining authors declare no competing financial interests.

Correspondence: David Chiron, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, INSERM, CNRS, Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, 44007 Nantes, France; e-mail: david.chiron@univ-nantes.fr.

References

- Campo E, Rule S. Mantle cell lymphoma: evolving management strategies. *Blood*. 2015;125(1):48-55.
- Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3416-3423.
- Meissner B, Kridel R, Lim RS, et al. The E3 ubiquitin ligase UBR5 is recurrently mutated in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2013;121(16):3161-3164.
- Rahal R, Frick M, Romero R, et al. Pharmacological and genomic profiling identifies NF- κ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nat Med*. 2014;20(1):87-92.
- Beà S, Valdés-Mas R, Navarro A, et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(45):18250-18255.
- Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol*. 2014;24:71-81.
- Amé-Thomas P, Tarte K. The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin Cancer Biol*. 2014;24:23-32.
- Burger JA, Ford RJ. The microenvironment in mantle cell lymphoma: cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(5):308-312.
- Chang BY, Francesco M, De Rooij MF, et al. Egress of CD19(+)CD5(+) cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients. *Blood*. 2013;122(14):2412-2424.
- Wang ML, Rule S, Martin P, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2013;369(6):507-516.
- Chiron D, Dousset C, Brosseau C, et al. Biological rationale for sequential targeting of Bruton tyrosine kinase and Bcl-2 to overcome CD40-induced ABT-199 resistance in mantle cell lymphoma. *Oncotarget*. 2015;6(11):8750-8759.
- Furtado M, Wang ML, Munneke B, McGreivoy J, Beaupre DM, Rule S. Ibrutinib-associated lymphocytosis corresponds to bone marrow involvement in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2015;170(1):131-134.
- Pham LV, Vang MT, Tamayo AT, et al. Involvement of tumor-associated macrophage activation in vitro during development of a novel mantle cell lymphoma cell line, PF-1, derived from a typical patient with relapsed disease. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(1):186-193.
- Lwin T, Lin J, Choi YS, et al. Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. *Blood*. 2010;116(24):5228-5236.
- Kurtova AV, Tamayo AT, Ford RJ, Burger JA. Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood*. 2009;113(19):4604-4613.
- Lwin T, Hazlehurst LA, Dessureault S, et al. Cell adhesion induces p27Kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulation of the SCFSkp2 ubiquitin ligase pathway in mantle-cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Blood*. 2007;110(5):1631-1638.
- Jin Z, Teramoto N, Hayashi K, et al. CD40 ligand stimulation inhibits the proliferation of mantle cell lymphoma lines. *Anticancer Res*. 2004;24(2B):691-697.
- Medina DJ, Goodell L, Glod J, Gélinas C, Rabson AB, Strair RK. Mesenchymal stromal cells protect mantle cell lymphoma cells from spontaneous and drug-induced apoptosis through secretion of B-cell activating factor and activation of the canonical and non-canonical nuclear factor κ B pathways. *Haematologica*. 2012;97(8):1255-1263.
- Castillo R, Mascarenhas J, Telford W, Chadburn A, Friedman SM, Schattner EJ. Proliferative response of mantle cell lymphoma cells stimulated by CD40 ligation and IL-4. *Leukemia*. 2000;14(2):292-298.
- Andersen NS, Larsen JK, Christiansen J, et al. Soluble CD40 ligand induces selective proliferation of lymphoma cells in primary mantle cell lymphoma cell cultures. *Blood*. 2000;96(6):2219-2225.
- Planken EV, Dijkstra NH, Willemze R, Kluij-Nelemans JC. Proliferation of B cell malignancies in all stages of differentiation upon stimulation in the 'CD40 system'. *Leukemia*. 1996;10(3):488-493.
- Geffroy-Luseau A, Chiron D, Descamps G, Jégo G, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. TLR9 ligand induces the generation of CD20+ plasmablasts and plasma cells from CD27+ memory B-cells. *Front Immunol*. 2011;2:83.
- Arpin C, Déchanet J, Van Kooten C, et al. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science*. 1995;268(5211):720-722.
- Brennan MA, Renaud A, Gambin AL, et al. 3D cell culture and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells plated onto jet-sprayed or electrosprayed micro-fiber scaffolds. *Biomed Mater*. 2015;10(4):045019.
- Maiga S, Brosseau C, Descamps G, et al. A simple flow cytometry-based barcode for routine authentication of multiple myeloma and mantle cell lymphoma cell lines. *Cytometry A*. 2015;87(4):285-288.
- Vignon C, Debeissat C, Georget MT, et al. Flow cytometric quantification of all phases of the cell cycle and apoptosis in a two-color fluorescence plot. *PLoS One*. 2013;8(7):e68425.
- Foight GW, Ryan JA, Gullá SV, Letai A, Keating AE. Designed BH3 peptides with high affinity and specificity for targeting Mcl-1 in cells. *ACS Chem Biol*. 2014;9(9):1962-1968.
- Dutta S, Ryan J, Chen TS, Kougantakis C, Letai A, Keating AE. Potent and specific peptide inhibitors of human pro-survival protein Bcl-xL. *J Mol Biol*. 2015;427(6 Pt B):1241-1253.
- Baran-Marszak F, Boukhar M, Harel S, et al. Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2010;95(11):1865-1872.
- Zhang L, Yang J, Qian J, et al. Role of the microenvironment in mantle cell lymphoma: IL-6 is an important survival factor for the tumor cells. *Blood*. 2012;120(18):3783-3792.
- Vishwamitra D, Shi P, Wilson D, et al. Expression and effects of inhibition of type I insulin-like growth factor receptor tyrosine kinase in mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2011;96(6):871-880.
- Guidoboni M, Zancai P, Carlati R, et al. Retinoic acid inhibits the proliferative response induced by CD40 activation and interleukin-4 in mantle cell lymphoma. *Cancer Res*. 2005;65(2):587-595.
- Dal Col J, Zancai P, Terrin L, et al. Distinct functional significance of Akt and mTOR constitutive activation in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;111(10):5142-5151.
- Dorfman DM, Pinkus GS. Distinction between small lymphocytic and mantle cell lymphoma by immunoreactivity for CD23. *Mod Pathol*. 1994;7(3):326-331.
- Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF- κ B pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007;12(2):115-130.
- Dousset C, Maiga S, Gomez-Bougie P, et al. BH3 profiling as a tool to identify acquired resistance to venetoclax in multiple myeloma [published online ahead of print 29 July 2016]. *Br J Haematol*. doi: 10.1111/bjh.14251.
- Vogler M, Hamali HA, Sun XM, et al. BCL2/BCL-X (L) inhibition induces apoptosis, disrupts cellular calcium homeostasis, and prevents platelet activation. *Blood*. 2011;117(26):7145-7154.
- Habens F, Lapham AS, Dallman CL, et al. Distinct promoters mediate constitutive and inducible Bcl-XL expression in malignant lymphocytes. *Oncogene*. 2007;26(13):1910-1919.
- Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Ford RJ. Inhibition of constitutive NF- κ B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Immunol*. 2003;171(1):88-95.
- Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Cheng G, Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- κ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2005;65(1):264-276.
- Illidge T, Klein C, Sehn LH, Davies A, Salles G, Cartron G. Obinutuzumab in hematologic malignancies: lessons learned to date. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(9):784-792.
- Chiron D, Di Liberto M, Martin P, et al. Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma. *Cancer Discov*. 2014;4(9):1022-1035.
- Saba NS, Liu D, Herman SE, et al. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF- κ B activation in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2016;128(1):82-92.
- Nygren L, Wasik AM, Baumgartner-Wennerholm S, et al. T-cell levels are prognostic in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(23):6096-6104.
- Iyengar S, Ariza-McNaughton L, Clear A, et al. Characteristics of human primary mantle cell lymphoma engraftment in NSG mice. *Br J Haematol*. 2016;173(1):165-169.
- Davids MS, Deng J, Wiestner A, et al. Decreased mitochondrial apoptotic priming underlies stroma-mediated treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(17):3501-3509.
- Vogler M, Butterworth M, Majid A, et al. Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;113(18):4403-4413.
- Robak T, Huang H, Jin J, et al; LYM-3002 Investigators. Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2015;372(10):944-953.
- Thijssen R, Slinger E, Weller K, et al. Resistance to ABT-199 induced by microenvironmental signals in chronic lymphocytic leukemia can be counteracted by CD20 antibodies or kinase inhibitors. *Haematologica*. 2015;100(8):e302-e306.
- Heinrich DA, Weinkauff M, Hutter G, et al. Differential regulation patterns of the anti-CD20

- antibodies obinutuzumab and rituximab in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2015;168(4):606-610.
51. Mössner E, Brünker P, Moser S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010;115(22):4393-4402.
52. Morschhauser FA, Cartron G, Thieblemont C, et al. Obinutuzumab (GA101) monotherapy in relapsed/refractory diffuse large b-cell lymphoma or mantle-cell lymphoma: results from the phase II GAUGUIN study. *J Clin Oncol*. 2013;31(23):2912-2919.
53. Sehn LH, Chua N, Mayer J, et al. Obinutuzumab plus bendamustine versus bendamustine monotherapy in patients with rituximab-refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (GADOLIN): a randomised, controlled, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):1081-1093.
54. Chiron D, Martin P, Di Liberto M, et al. Induction of prolonged early G1 arrest by CDK4/CDK6 inhibition reprograms lymphoma cells for durable PI3K δ inhibition through PIK3IP1. *Cell Cycle*. 2013;12(12):1892-1900.

Microenvironment-dependent proliferation and mitochondrial priming loss in mantle cell lymphoma is overcome by anti-CD20

The supplementary material includes 2 supplementary tables, 6 supplementary figures and supplementary figure legends.

Primary antibodies immunoblot			
Specificity	Clone	Source	Ref
Anti phospho Rb	D20B12 (ser 807/811)	Cell Signaling	9308S
Anti Rb	4H1	Cell Signaling	9309
Anti PCNA	PC10	BD Biosciences	555566
Anti BCL xL	54H6	Cell Signaling	2764S
Anti BCL2	124	Cell Signaling	M0887
Anti MCL1	S19	Santa Cruz Biotechnology	sc-819
Anti Bid	polyclonal	R&D Systems	AF860
Anti Bim	polyclonal	Merck Millipore	AB17003
Anti Bak	polyclonal	BD Biosciences	556396
Anti Bax	polyclonal	Cell Signaling	2772S
Anti Actin	C4	Merck Millipore	MAB1501
Anti phospho IKB α	5A5 (Ser 32/36)	Cell Signaling	9246S
Anti IKB α	polyclonal	Cell Signaling	9242S
Anti-NF-KB p52	polyclonal	Merck Millipore	05-361
Anti cyclin D1	M20	Cell Signaling	2922S

TaqMan gene expression assays		Source
MKI67	Hs01032443 m1	Applied Biosystems
BCL xL	BCL2L1; Hs00236329 m1	
BCL2	Hs00608023 m1	
MCL1	Hs00172036 m1	
Bid	Hs00609632 m1	
Bim	BCL2L1; Hs00708019 s1	
Bak	Hs00832876 g1	
Bax	Hs00280269 m1	
Noxa	Hs00560402 m1	
Hrk	Hs02621354 s1	
Il2Rg	Hs00953624 m1	
PLEK	Hs00950975 m1	
CD74	Hs00269961 m1	
CD40LG	Hs00163934 m1	
RPL37a	Hs01102345 m1	

Antibodies for flow cytometry analysis		Source
Phenotype	Beckman coulter	anti-CD5-FITC
		anti-CD19-APC
		anti-CD20-PE
		anti-CD23-PE
	BD Biosciences	anti-CD27-PE
		anti-CD38-PE
		anti-Kappa-PE
		anti-Lambda-PE
Cell cycle	BD Pharmingen	anti-IL10-R-PE
	eBioscience	anti-rBR3-PE
	BD Biosciences	FitC anti-BrdU
	Cell Signaling	anti-Ki67-RPE,
		Alexa fluor 488 anti-phospho(Ser10)-histone H3
		3465S
Viability	BD Biosciences	Apo2.7
	Beckman coulter	Annexin V-FITC
BH3 profiling	BD Pharmingen	Alexa fluor 647 mouse Cytochrome C, clone 6H2B4

Reagents		Source
Drugs	obinutuzumab (Ga-101), Rituximab	Roche
	Ibrutinib, Bortezomib, Bendamustine, cytarabine (Ara-c), Venetoclax (ABT-199), ABT-737, Palbociclib, Bay11-7082	Selleck Chemicals
Cytokines	IL10, BAFF, sCD40L	Tebu-Bio/Peptrotech
	IGF-1	Sigma-Aldrich
	IL6, IL4	R&D Systems

Cell lines		Source
#	Maver-1, JeKo-1	DSMZ
	Z138	ATCC

Table S1. Antibodies and reagents

Type	Name	cell death			Ratio
		VNT	OBN	OBN + VNT	CD20
Primary cells	Pt#12b	14	49	71	72
	Pt#5	28	28	69	101
	Pt#14	14	54	64	11
	Pt#6	18	28	54	31.6
	Pt#12a	19	39	54	59.9
	Pt#2	20	33	54	n.d
	Pt#3	8	32	49	n.d
	Pt#7	14	30	45	n.d
	Pt#8	20	23	43	n.d
	Pt#4	2	15	25	1.8
	Pt#10	15	9	18	2.8
Cell lines	Z138	33	10	55	7
	Maver-1 (L40-L)	18	2	48	9.7
	JeKo-1	14	7	35	19.5

Table S2. MCL primary cells and cell lines response to Obinutuzumab and Venetoclax

Cell death induced by Venetoclax (VNT 24h), Obinutuzumab (OBN; 0.5 µg/mL; 48h) or sequential combination of OBN followed by VNT in MCL primary cells and MCL cell lines (Maver-1, Z138 and JeKo-1) were assessed using Annexin-V staining. Venetoclax was used at 25 nM for all primary cells and at 10, 1000 and 3000 nM for Maver-1, Z138 and JeKo-1, respectively. CD20 MFI ratio (rCD20) was measured using flow cytometry.

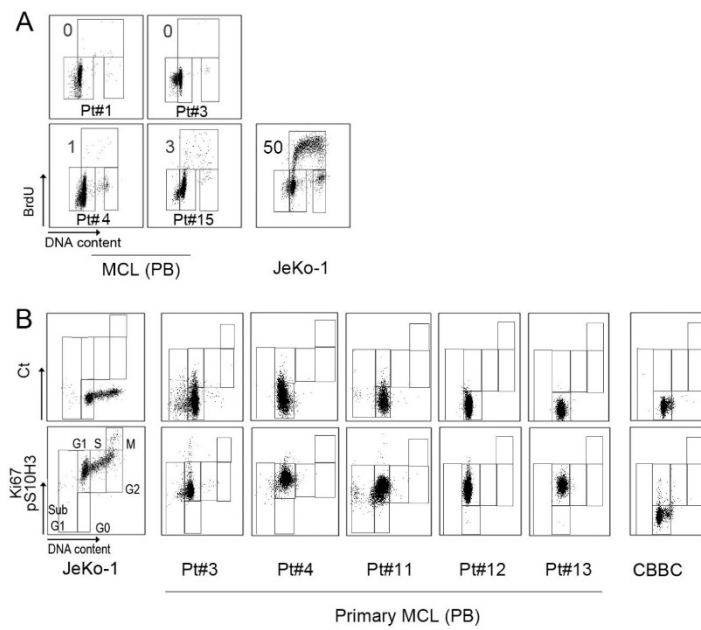


Figure S1. Primary MCL cells rarely proliferate in the peripheral blood. (A) BrdU/PI staining of purified (CD19+) primary MCL cells freshly isolated from the peripheral blood (PB) of 4 MCL patients. Number in the FACS profile indicates the percentage of gated cells in S cell cycle phase and JeKo-1 cell lines is used as a positive control. **(B)** As described by Vignon *et al.*¹, the cells were stained with 7-AAD and antibodies anti-Ki67 and anti-phospho(Ser10)-histone H3 (pS10H3) conjugated to Alexa Fluor®488. An isotype control staining with Alexa Fluor®488 mouse IgG1 (Ct) was performed. Freshly isolated MCL cells from PB were identified by CD19 staining. The staining was performed on five MCL patients, one cell line (Jeko-1) and cord blood B cells (CBBC, healthy donor).

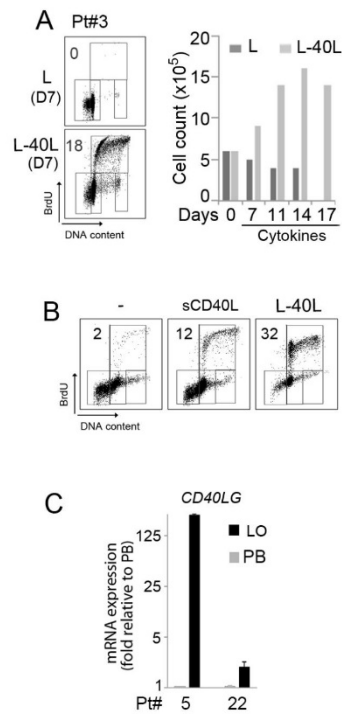


Figure S2. Primary MCL cell cycle progression is dependent on CD40 signaling (A) BrdU/PI staining (left panel) or cell count (right panel) of primary MCL cells cocultured on a pre-established layer of parental fibroblast L or CD40L-expressing fibroblasts L (L-40L) in the presence of cytokines for time indicated. **(B)** BrdU/PI staining of primary MCL cells cultured in medium alone or in the presence of L-40L or soluble CD40L (sCD40L 5 μ g/mL) for 5 days. **(C)** qRT-PCR analysis of the *CD40LG* gene in concomitant primary samples from lymphoid organ (LO) and peripheral blood (PB) for two MCL patients.

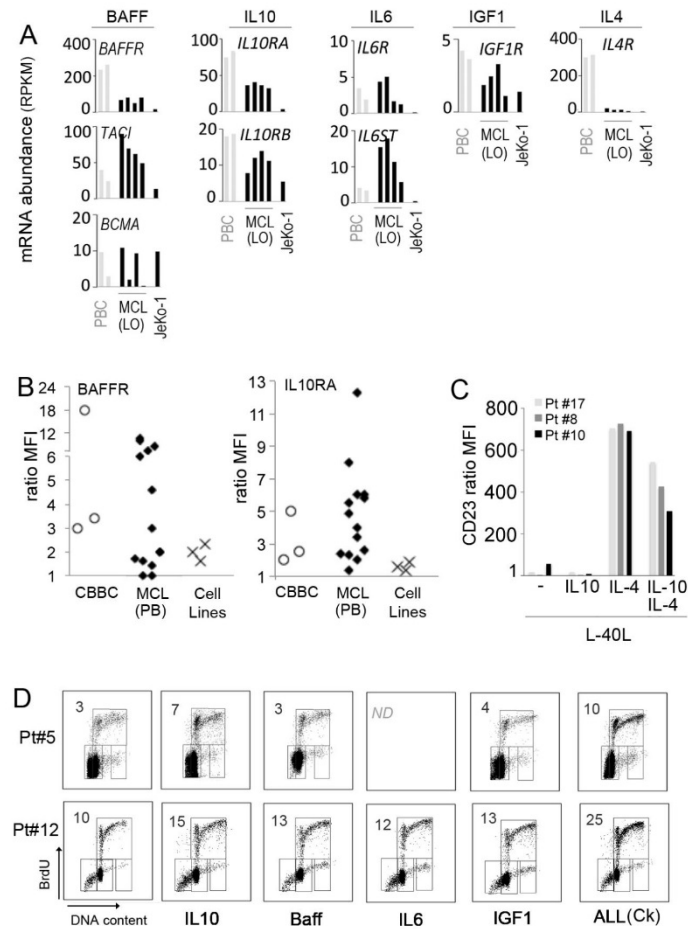


Figure S3. Cytokine Receptor expression in Primary MCL cells. (A) WTS analysis of mRNA abundance (RPKM) of indicated genes in CyclinD1+ primary MCL cells from lymphoid organ (MCL LO), CD19+ peripheral blood B-cells (PBC)s from two healthy volunteers and JEKO-1 as previously described². (B) IL10RA and BAFFR surface expression was determined in freshly isolated peripheral primary MCL cells (n=12), MCL cell lines (n=3) or CBBC (n=3) using flow cytometry. (C) Primary MCL cells from 3 patients were cultured 7 days on a pre-established layer of L-40L in the presence of IL-4, IL-10 or both before CD23 surface expression staining using flow cytometry. (D) BrdU/PI staining of primary MCL cells cocultured on a pre-established layer of L-40L in the presence or absence of IL6 (1ng/mL), IGF1 (1ng/mL), IL10 (50ng/mL), Baff (50ng/mL) or with the cytokine cocktail (All) for 7 days. Number in the FACS profile indicates the percentage of gated cells in S cell cycle phase.

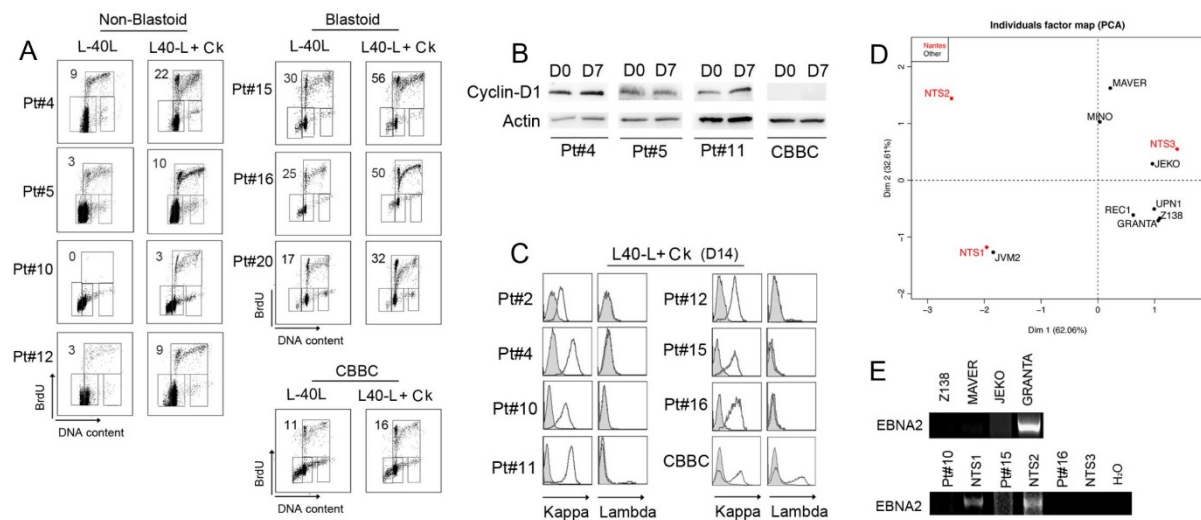


Figure S4. "L-40L+Ck" cocultures reproduce the aggressive behavior of MCL. (A) BrdU/PI staining of primary MCL cells (Non-blastoid and Blastoid) or cord blood B cells (CBBC, healthy donor) cocultured on a pre-established layer of L-40L in the presence or absence of cytokines for 7 days. (B) Immunoblotting of Cyclin-D1 in primary cells isolated from cord blood B cells (CBBC, healthy donor) or MCL patients after coculture on L-40L layer in the presence of cytokines (L-40L+Ck) at indicated times (D3, D7). (C) Histograms represent the overlay of specific Kappa or Lambda staining (empty histograms) over control staining (filled histograms) in cord blood B cells (CBBC, healthy donor) or primary cells isolated from MCL patients after 14 days of coculture on L-40L layer in the presence of cytokines (L-40L+Ck). (D) Principal Component Analysis (PCA) of MCL cell lines, commercial (JeKo-1, Maver-1, Z138, Mino, Rec1, UPN1, Granta-519, JVM2) or generated in our laboratory (NTS1, NTS2, NTS3), were characterized by GEP. (E) RT-PCR of EBNA2³ reveal that the 2 t(11;14)⁺ microenvironment independent cell lines (NTS-1, NTS-2) arose from the selection of an EBV⁺ sub-clones whereas the t(11;14)⁺ microenvironment independent cell line NTS-3 is EBV⁻.

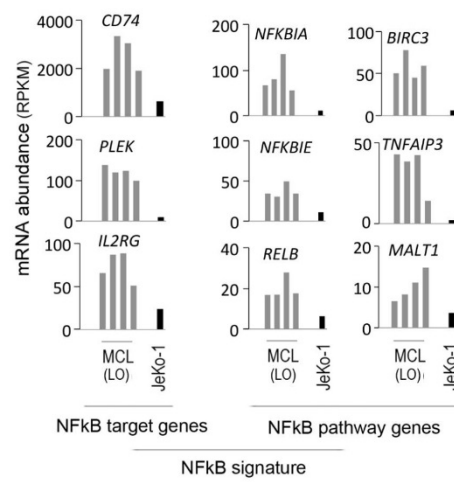


Figure S5. MCL primary cells from lymph nodes express NFkB targets. WTS analysis of mRNA abundance (RPKM) of NFkB signature genes, as previously defined by Annunziata et al.⁴, in CyclinD1+ primary MCL cells from lymphoid organs (MCL LO) and JEKO-1 as previously described².

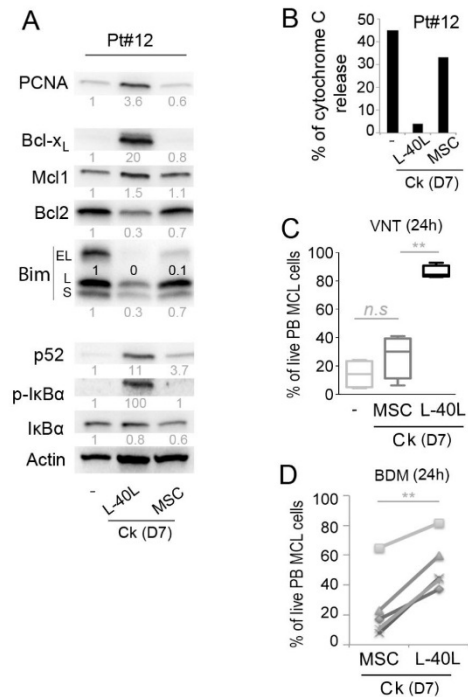


Figure S6. “L40L+Ck” and hMSCs trigger differential proliferation and drug resistance in primary MCL. (A) Immunoblotting of cell cycle-related (PCNA) or Bcl-2 family (Bcl-x_L, Bcl2, Mcl1, Bim) proteins and classical (p-IkBα) and alternative (p52) NFκB pathway proteins in primary cells from PB or after coculture on either hMSCs or L-40L layer in the presence of cytokines (D7). Quantification of protein level is normalized to Actin and indicated below each protein. **(B)** Mitochondrial priming was performed by intracellular BH3-profiling using BAD peptide (which targets both Bcl2 and BclxL) in primary MCL cells from PB and after seven days (D7) on a pre-established layer of L-40L or hMSCs in the presence of cytokines. **(C-D)** Primary MCL cells freshly isolated from PB or after 7 days on an L-40L or hMSC layer in the presence of cytokines were cultured with venetoclax (VNT: 25 nM) or bendamustine (BDM: 100 μM) for 24 h; paired t-test. Viability was then addressed by annexin-V staining; the % of live cells is represented as the % of control (without treatment). ** $p < 0.05$

References

1. Vignon C, Debeissat C, Georget MT, et al. Flow cytometric quantification of all phases of the cell cycle and apoptosis in a two-color fluorescence plot. *PLoS One*. 2013;8(7):e68425.
2. Chiron D, Martin P, Di Liberto M, et al. Induction of prolonged early G1 arrest by CDK4/CDK6 inhibition reprograms lymphoma cells for durable PI3Kdelta inhibition through PIK3IP1. *Cell Cycle*. 2013;12(12):1892-1900.
3. Pham LV, Vang MT, Tamayo AT, et al. Involvement of tumor-associated macrophage activation in vitro during development of a novel mantle cell lymphoma cell line, PF-1, derived from a typical patient with relapsed disease. *Leuk Lymphoma*. 2014.
4. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007;12(2):115-130.

III) Article : *BCL2-family dysregulation in B-cell malignancies. From gene expression regulation to a targeted therapy biomarker*

Lors de la différenciation lymphocytaire B, l'acquisition d'altérations génétiques peut aboutir à une transformation des lymphocytes B en cellules tumorales à différents stades de maturation. Plus de 40 entités d'hémopathies B matures sont recensées et partagent souvent des dérégulations des voies NF- κ B, BCR, Notch mais aussi un déséquilibre dans l'expression des gènes de la famille Bcl-2 impliqués dans l'apoptose. En effet, parmi d'autres exemples, la translocation t(14;18) impliquant le gène *BCL2* est caractéristique du lymphome folliculaire et des amplifications du fragment 1q portant le gène anti-apoptotique *MCL1* sont fréquentes dans les cellules de MM (Fonseca et al., 2009). De plus, les BH3 mimétiques et notamment le Venetoclax ciblant l'anti-apoptotique Bcl-2 ont montré leur efficacité dans le traitement de la LLC, du MM ou encore du LCM (Davids et al., 2017; Touzeau et al., 2018). Paradoxalement, les cellules de DLCL sont caractérisées par une forte expression de Bcl-2 mais sont peu sensibles au Venetoclax. Alors que de nombreux travaux discutent des régulations de la famille Bcl-2 dans une pathologie donnée, dans ce travail, l'objectif est d'analyser l'expression des gènes de la famille Bcl-2 dans l'ensemble des hémopathies B matures à partir des données publiques de puces à ADN Affymetrix.

Cette analyse a nécessité la veille bibliographique et le téléchargement de l'ensemble des bases de données de cellules primaires de lymphocytes B matures normaux et tumoraux issues de puces à ADN Affymetrix U133 Plus 2.0. La normalisation des données a été réalisée à l'aide de la librairie « *Affy* » et avec la méthode « *GCRMA* » intégrant une normalisation par quantile. Cette approche présente quelques limites notamment l'impossibilité d'intégrer l'ensemble des gènes de la famille Bcl-2. En effet, il n'existe pas de sonde spécifique pour *BBC3* codant la protéine Puma.

Ce travail confirme le déséquilibre de la famille Bcl-2 dans les hémopathies B matures par comparaison à leur équivalent normal avec notamment une augmentation de l'expression des gènes anti-apoptotiques et une baisse des gènes pro-apoptotiques dans les cellules tumorales. Les gènes *BCL2* et *BCL2A1* et *BCL2L11* sont les plus souvent dérégulés. L'intégration des données par analyse en composante principale (ACP) montre que la LLC et le MM sont deux entités très distinctes par leur profil d'expression de la famille Bcl-2.

Nous avons ensuite montré l'influence du microenvironnement sur les modulations de l'expression des gènes de la famille Bcl-2. Pour les pathologies qui présentent à la fois des cellules dans les OLS, dans le sang périphérique et dans la moelle osseuse, le microenvironnement des OLS augmente l'expression des gènes anti-apoptotiques et

diminue l'expression des gènes pro-apoptotiques *PMAIP1* et *BCL2L11*. L'analyse par ACP montre que la clusterisation des profils de la famille Bcl-2 des cellules tumorales dépend plus de leur niche que des histologies. Ainsi, les cellules de FL, LCM et MZL dans le sang périphérique se confondent et se distinguent de leur équivalent dans les OLS.

D'autre part, nous avons caractérisé l'expression des gènes de la famille Bcl-2 selon les différents sous-types des différentes hémopathies B. Concernant le LCM, il est à noter une surexpression des gènes *BIK* et *HRK* ainsi qu'une sous expression de *MCL1* dans les cellules tumorales SOX11⁺ comparées aux cellules SOX11⁻.

Dans notre laboratoire, nous avons pu montrer lors de précédents travaux que différents ratios d'expression des protéines de la famille Bcl-2 sont prédictifs de la sensibilité à différents BH3-mimétiques. Ainsi, le ratio *BCL2* / *MCL1* est prédictif de la sensibilité à l'ABT-737 qui cible à la fois Bcl-2 et Bcl-xL dans le MM (Bodet et al., 2011). Ce ratio est également prédictif de la réponse au Venetoclax dans le MM (Touzeau et al., 2014). Dans le LCM, le ratio *BCL2* / (*MCL1* + *BCL2L1*) est prédictif de la réponse au Venetoclax (Chiron et al., 2015). Notre nouvelle étude a mis en évidence avec l'analyse des corrélations entre les expressions des facteurs impliqués dans l'efficacité et la résistance au Venetoclax ainsi que des ORR chez les patients traités au Venetoclax en agent seule, que le ratio d'expression (*BCL2* + *BCL2L11* + *BAX*) / (*BCL2L1*) était le meilleur prédictif de la réponse au Venetoclax dans les hémopathies B matures.



BCL2-Family Dysregulation in B-Cell Malignancies: From Gene Expression Regulation to a Targeted Therapy Biomarker

Benoît Tessoulin^{1,2,3*}, Antonin Papin^{1,2,4†}, Patricia Gomez-Bougie^{1,2,4}, Celine Bellanger^{1,2,4}, Martine Amiot^{1,2,4}, Catherine Pellat-Deceunynck^{1,2,4} and David Chiron^{1,2,4*}

¹ CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France, ² L'Héma-NexT, i-Site NexT, Nantes, France, ³ Department of Hematology, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France, ⁴ CNRS GDR3697 Micronit, Tours, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Massimo Libra,
Università degli Studi di Catania, Italy

Reviewed by:

Apostolos Zaravinos,
European University Cyprus, Cyprus
Rehan Khan,
Mayo Clinic, United States

*Correspondence:

Benoît Tessoulin
benoit.tessoulin@chu-nantes.fr
David Chiron
david.chiron@univ-nantes.fr

[†] These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Hematologic Malignancies,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 09 October 2018

Accepted: 10 December 2018

Published: 07 January 2019

Citation:

Tessoulin B, Papin A,
Gomez-Bougie P, Bellanger C,
Amiot M, Pellat-Deceunynck C and
Chiron D (2019) BCL2-Family
Dysregulation in B-Cell Malignancies:
From Gene Expression Regulation to a
Targeted Therapy Biomarker.
Front. Oncol. 8:645.
doi: 10.3389/fonc.2018.00645

BCL2-family proteins have a central role in the mitochondrial apoptosis machinery and their expression is known to be deregulated in many cancer types. Effort in the development of small molecules that selectively target anti-apoptotic members of this family i.e., Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 recently opened novel therapeutic opportunities. Among these apoptosis-inducing agents, BH3-mimetics (i.e., venetoclax) led to promising preclinical and clinical activity in B cell malignancies. However, several mechanisms of intrinsic or acquired resistance have been described *ex vivo* therefore predictive markers of response as well as mechanism-based combinations have to be designed. In the present study, we analyzed the expression of the BCL2-family genes across 10 mature B cell malignancies through computational normalization of 21 publicly available Affimetrix datasets gathering 1,219 patient samples. To better understand the deregulation of anti- and pro-apoptotic members of the BCL2-family in hematological disorders, we first compared gene expression profiles of malignant B cells to their relative normal control (naïve B cell to plasma cells, $n = 37$). We further assessed BCL2-family expression according to tissue localization i.e., peripheral blood, bone marrow, and lymph node, molecular subgroups or disease status i.e., indolent to aggressive. Across all cancer types, we showed that anti-apoptotic genes are upregulated while pro-apoptotic genes are downregulated when compared to normal counterpart cells. Of interest, our analysis highlighted that, independently of the nature of malignant B cells, the pro-apoptotic BH3-only *BCL2L11* and *PMAIP1* are deeply repressed in tumor niches, suggesting a central role of the microenvironment in their regulation. In addition, we showed selective modulations across molecular subgroups and showed that the BCL2-family expression profile was related to tumor aggressiveness. Finally, by integrating recent data on venetoclax-monotherapy clinical activity with the expression of BCL2-family members involved in the venetoclax response, we determined that the ratio $(BCL2+BCL2L11+BAX)/BCL2L1$ was the strongest predictor of venetoclax response for mature B cell malignancies *in vivo*.

Keywords: BCL2, B-cell malignancy, lymphoma, cell death, microenvironment, data mining, predictive markers

INTRODUCTION

B cell differentiation is a tightly controlled process that leads to the generation and selection of memory B cells and antibody-secreting plasma cells (1, 2). B cells constitute an essential part of our adaptive immune system but the genomic instabilities necessary for the development of high affinity antibodies are also involved in the initiation of malignant B-cell neoplasms (3, 4). Thereby, hematological malignancies can arise from most steps of B cell differentiation and more than 40 types of mature B cell lymphomas are referenced in the latest World Health Organization classification. The most frequent types include diffuse large B cells lymphoma, DLBCL (25%), plasma cell neoplasms [including multiple myeloma, MM (23%)], chronic lymphocytic leukemia, CLL (19%), follicular lymphoma, FL (12%), splenic marginal zone lymphoma, SMZL (7%), mantle cell lymphoma, MCL (3%), hairy cell leukemia, HCL (2%), and Burkitt lymphoma, BL (1%) (5). All of these hematological malignancies are characterized by their own genetic hallmarks, even though most of them display deregulation of the B-cell receptors (BCR), NFkB, Notch (*see articles associated to this Frontiers topic*) or BCL2-family networks, leading to increased survival and enhanced chemoresistance.

BCL2-family proteins, which play a central role in the control of apoptosis, include multidomain anti-apoptotic members (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, Bfl-1), BH3-only sensitizers (Bad, Bik, Noxa, Hrk, Bmf), BH3-only activators (Bid, Puma, Bim), and pro-apoptotic effectors (Bax, Bak) (6). The deregulation of the “B-cell lymphoma-2” (BCL2) family in mature B cell malignancies has been first highlighted through a translocation between the chromosomes 14 and 18 that led to the overexpression of the Bcl-2 oncogene in follicular lymphoma (7). Additional deregulations were then described such as 1q amplification leading to Mcl-1 overexpression in MM (8), Bim deletion in lymphoma cell lines (9) or miRNA deregulation leading to Bcl-2 overexpression in CLL (10, 11).

Given the central role of the BCL2-family in the apoptosis machinery, several strategies have been developed to target this network in hematological malignancies, such as synthetic antisense, specific peptides or BH3-mimetics (12, 13). Up to day, BH3-mimetics displayed the best efficacy both *in vitro* and *in vivo* (14, 15). Indeed, BH3-mimetics selectively bind anti-apoptotic members of the BCL2-family with high affinity, leading to the release of pro-apoptotic members that consequently induce cell death (16). Several clinical trials are currently ongoing using the first in class orally bioavailable BCL2-selective BH3-mimetic venetoclax, demonstrating clinical efficacy as a single agent in several B cell malignancies such as CLL, MCL, and MM (17–21).

Nevertheless, mature B cell neoplasms do not harbor similar dependence to anti-apoptotic members of the BCL2-family. For example, whereas both CLL and DLBCL overexpress Bcl-2 protein (10, 22), the overall response rate (ORR) of patients to venetoclax-monotherapy strongly diverged with 79 and 18%, respectively. In addition to intrinsic resistance, acquired resistance to BH3-mimetics has also been recently described (23–25). The challenge

is now to set up markers and functional assays that predict responses to BCL2-family targeted strategies and to design mechanism-based combinations to overcome resistance.

To gain insight into BCL2-family expression and regulation across most frequent mature B cell malignancies, we analyzed the BCL2-family expression in ten different hematological disorders i.e., MCL, BL, DLBCL, FL, B-cell prolymphocytic leukemia (BPLL), CLL, HCL, mucosa-associated lymphoid tissue (MALT), SMZL, MM, through normalization of Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 public datasets. We analyzed: (1) the common modulations across all B-cell neoplasms in comparison with their respective normal counterpart, (2) the modulations associated to the microenvironment and molecular subtypes, and (3) established a ratio of expression involving Bcl-2, Bcl-xL, Bax, and Bim that is associated with the response rate to venetoclax.

MATERIALS AND METHODS

Gene expression profiling datasets were selected on Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/geo/>) and ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>), for all mature B-cell malignancies series and normal B-cell series (Table S1). In order to overcome data normalization biases, only Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 series with raw data were retained. Raw data (cel files) were acquired as a whole and normalized using Affy and gcRMA packages and outlier samples were removed and data were further quantile normalized (Figure S1A). Normalization quality and the absence of a remnant batch-effect were further assessed by the analysis of “anchoring genes” expression (*CD27*, *CCND1*, *SOX11*, *MKI67*, *BCL6*, *MME*, *CD200*, *ITGAE*, *CD38*, and *SDC1*), highlighting histological and/or B-cell differentiation specificities, independent of source series (Figure S1). Normal counterpart B-cell were associated to B cell malignancies according to cell-of-origin classification (26). For genes with multiple Affymetrix probes, probes were selected according to correlations between GEP and RNA-seq data for MM and MCL cell lines when available (<https://www.keatslab.org/data-repository>) ($n = 19$) (Table S2). Given that none of the *BAD* and *HRK* probes available gave a correlation with RNA-seq, these genes were excluded from our study. In addition, expression of *BBC3* (coding for Puma protein) has not been evaluated because of putative *MIR3191/MIR3190* cross-hybridization (Affymetrix HGU133plus2.0 Annotation, Revision 35).

Factor maps were constructed by FactoMiner and further represented by factoextra package. Data used in the Principal Component for each graph were a subset of the Bcl2-family dataset we firstly constructed.

For quantitative variables, statistical testing was performed using Wilcoxon-Mann-Whitney tests for two groups and Kruskal-Wallis for more than two groups. For qualitative variables, Fisher-test was performed. Statistical significance was retained under α -risk of 0.05. Random forest analysis was carried-out with 1,000 trees, using randomForest R-package.

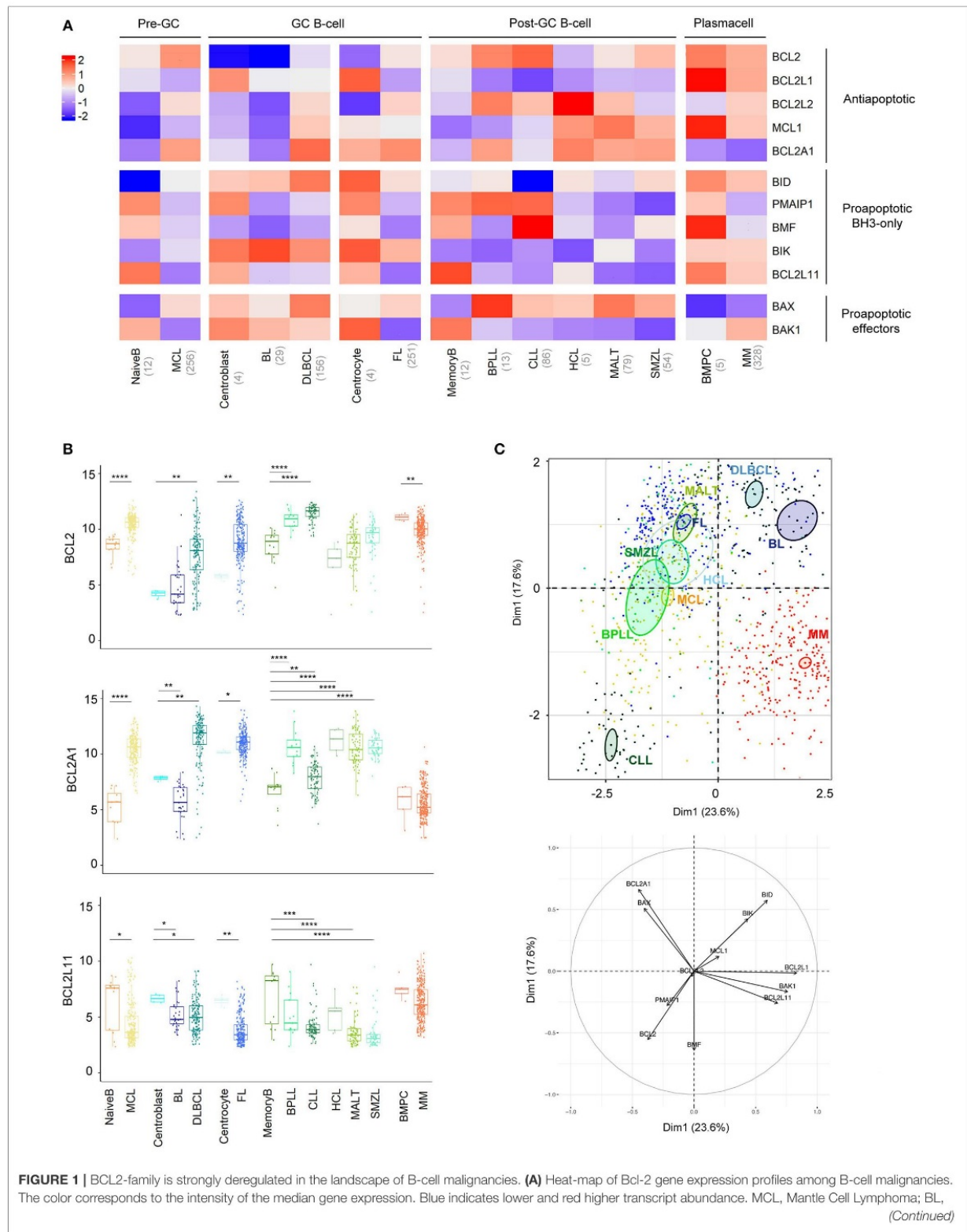


FIGURE 1 | Burkitt lymphoma; DLBCL, Diffuse Large B-cell Lymphoma; FL, Follicular Lymphoma; BPLL, B-cell Prolymphocytic Leukemia; CLL, Chronic lymphocytic leukemia; HCL, Hairy Cell Lymphoma; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma; SMZL, Splenic Marginal Zone Lymphoma; BMPC, Bone Marrow Plasma Cell, MM: multiple Myeloma. **(B)** Expression of *BCL2*, *BCL2A1*, and *BCL2L11* in the different B-cell malignancies compared to their respective control. Wilcoxon-Mann-Whitney tests. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. **(C)** Representation of the individual factor map of each sample for the PCA and according to the two first dimensions. Colored ellipses are drawn around the mean of the group (=barycenter), with the 95% confidence interval of the mean in the corresponding plan. *BCL2* is coding for Bcl-2 protein, *BCL2L1* for Bcl-xL, *MCL1* for Mcl-1, *BCL2L2* for Bcl-w, *BCL2A1* for Bfl1, *BIK* for Bik, *PMAIP1* for Noxa, *BMF* for Bmf, *BID* for Bid, *BCL2L11* for Bim, *BAX* for Bax, and *BAK1* for Bak.

RESULTS

B-cell Malignancies Display Unbalanced Regulations of their Anti- and Pro-apoptotic Genes

B cell malignancies were classified and compared to their normal B cell counterparts according to the latest WHO classification (26). Whereas, MCL was defined as a pre-GC (germinal-center) neoplasm, FL, BL, and DLBCL were defined as GC neoplasms and SMZL, MALT, BPLL, CLL, HCL, and MM as post-GC neoplasms (Figure 1A). Within GC neoplasms, we further compared highly proliferative BL and DLBCL to centroblasts and the mostly indolent FL to centrocytes.

Anti-apoptotic members of the BCL2-family have a tendency to be overexpressed in most malignancies compared to their relative normal control, with the striking exception of *BCL2L1*, coding for BCLxL protein (Figure 1A, Figure S2). *BCL2* was overexpressed in MCL, DLBCL, FL, BPLL, and CLL. Of note, *BCL2A1*, coding for Bfl1 protein, appeared to be the most frequently elevated genes (8 out of 10 malignancies, Figure 1B). As previously described, overexpression of *BCL2A1* was not observed in MM (27). Furthermore, in contrast to most mature B cell malignancies, MM and BL did not show major modulations of anti-apoptotic genes when compared to their normal counterparts (Figure 1A, Figure S2).

Pro-apoptotic BH3-only have a tendency to be downregulated in all mature B cell malignancies compared to their relative normal control, *BCL2L11*, coding for Bim protein, being the most frequently significantly deregulated gene (7 out of 10 malignancies, Figure 1B, Figure S2). Regarding pro-apoptotic effectors we observed a *BAX/BAK1* switch of expression in malignant B cells compared to their normal counterparts. Indeed, whereas *BAX* was elevated, *BAK1* appeared downregulated in all malignancies, excepted in MM and BL (Figure 1A, Figure S2).

To compare the 10 entities studied in regard to their BCL2-family profile, we performed a Principal Component Analysis (PCA, Figure 1C). We observed that CLL and MM displayed unique profiles. The variable plot highlighted that CLL profile was mostly carried by the expression of *BCL2*, *BMF*, *PMAIP1*, coding for Noxa protein, and the absence of *BID* whereas MM cells were characterized by the projection of *BCL2L1*, *BAK1*, and *BCL2L11* and the absence of *BCL2A1* (Figure 1C, lower panel).

BCL2-family Genes Display Differential Expression According to the Microenvironment

We, and others, previously demonstrated that microenvironment-dependent modulations of BCL2-family members were involved in the survival and chemoresistance of B

cell malignancies (23, 28, 29). To get insight into the role of the microenvironment in the BCL2-family regulation, we compared the expression profile of lymphoma cells from peripheral blood (PB) and tumoral niches i.e., lymph nodes (LN), bone marrow (BM) or spleen (SPL) for MCL, FL, CLL, and SMZL. MCL displayed the most frequent modulations with 11 out of 12 genes being significantly differently expressed between LN and PB with a general increase of all anti-apoptotic members within LN (Figure 2A, Figure S3). Although PB and LN samples were not paired, these data suggest that MCL cells have divergent BCL2 profiles depending on their microenvironment.

Of interest, our analysis highlighted that, independently of the nature of malignant B cells, the pro-apoptotic BH3-only *BCL2L11* and *PMAIP1* genes were deeply repressed in tumor niches (Figure 2B). In contrast, anti-apoptotic regulation seemed to be cell-type specific and only *BCL2L1* was commonly upregulated in the LN of both MCL and FL (Figures 2A,B).

PCA of these entities showed that tumor localization prevailed over entity intrinsic hallmarks (Figure 2C). Indeed, PB lymphoma cells from FL, MCL, and SMZL segregated together and apart from their relative LN cells. In contrast, CLL samples form a separated group independent of their tumor localization (PB, LN, and BM), confirming the specific profile of this malignancy as mentioned before (Figures 1C, 2C).

Intra-entities BCL2-family Heterogeneity Is Related to Molecular Subtypes and Aggressiveness

Molecular subgroups have been previously described in several B cell disorders (26). We thus compared the BCL2 profile according to molecular subtypes in DLBCL, MCL, and MM (Figure 3, Figures S4, S5).

Conventional MCL cells are characterized by a strong expression of the oncogene *SOX11*. A *SOX11*-negative (*SOX11*-) leukemic non-nodal minor MCL subtype is now well-characterized and displays a limited number of genomic alterations and a more indolent clinical course (30). The BCL2-family profile of conventional PB *SOX11*+ MCL was mostly similar to the one of leukemic non-nodal *SOX11*- MCL (Figure 3A). Nevertheless, *SOX11*- MCL cells displayed a moderate increase in *MCL1* expression and a dramatic decrease in *BIK* expression when compared to *SOX11*+.

We next compared the profile of 3 subtypes of DLBCL, GC-type (GCB), ABC-type (ABC), and primary mediastinal (PMBL, Figure 3B). Our analysis showed that ABC cells were characterized by a high level of *BCL2*, *BID*, and *BMF*, which is consistent with previous reports (31). In contrast, PMBL cells displayed a high expression of *BCL2L1* (Figure 3B).

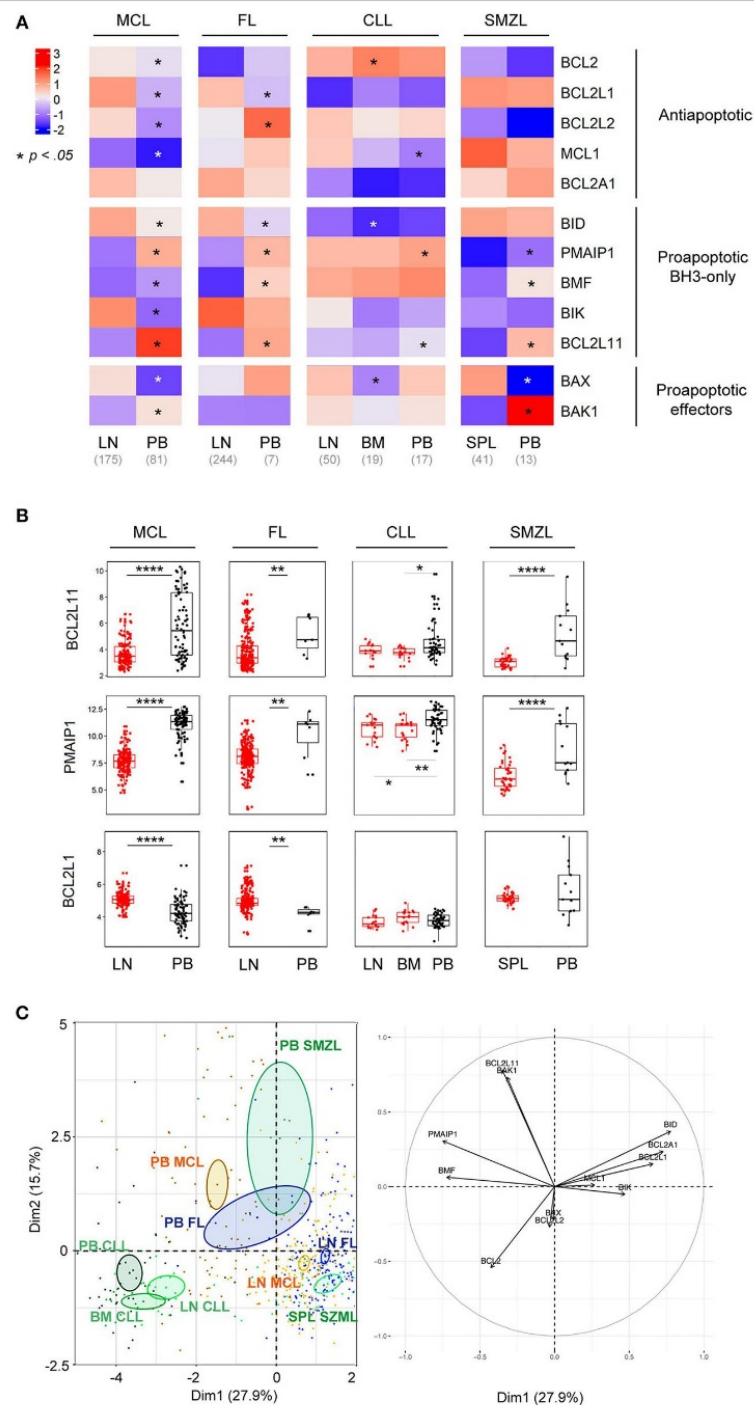
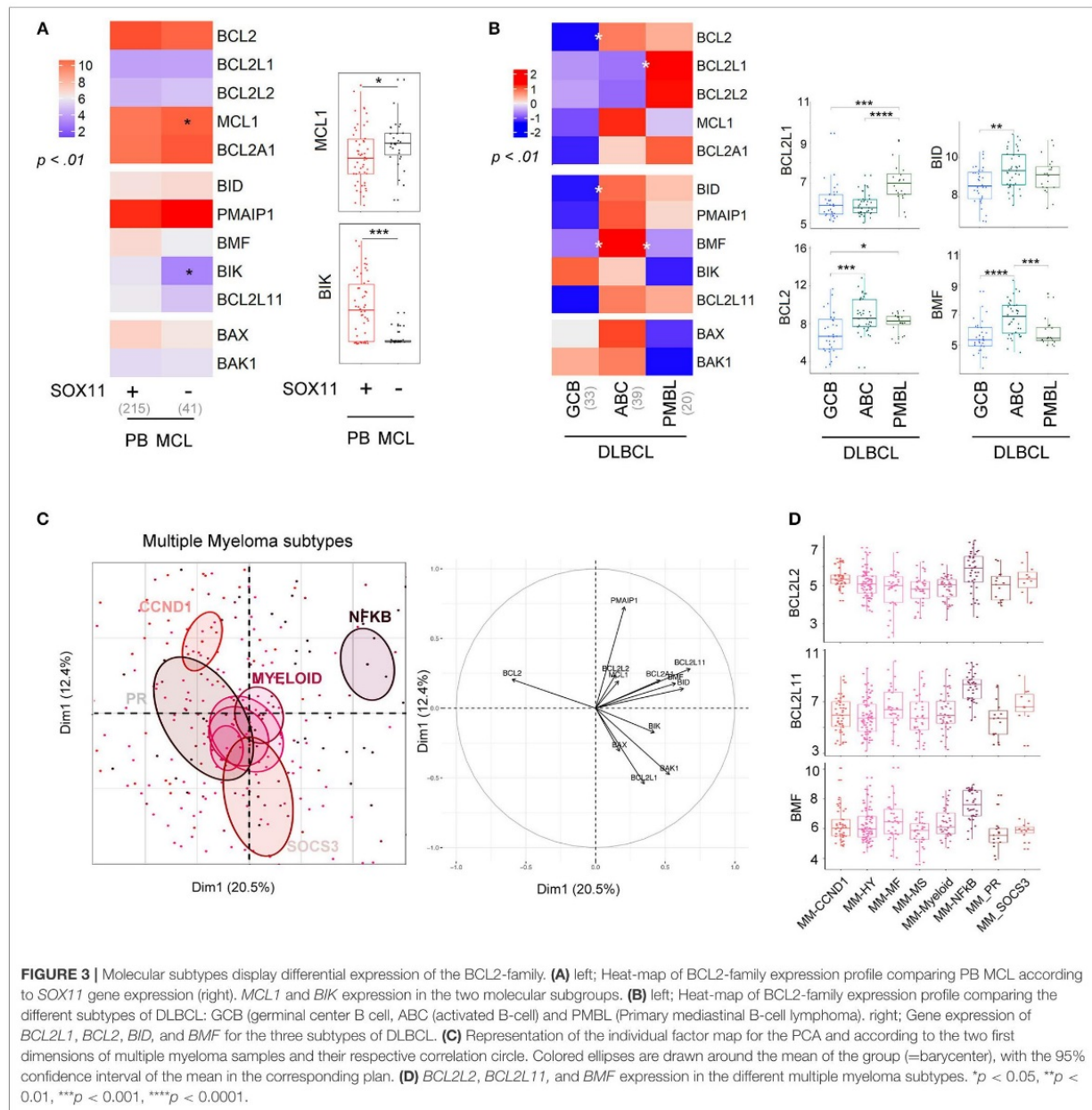


FIGURE 2 | BCL2-family is regulated by the tumor microenvironment. **(A)** Heat-map of Bcl-2 gene expression profiles for MCL, FL, CLL, and SMZL in function of their tissue localization. Wilcoxon-Mann-Whitney tests. $*p < 0.05$. **(B)** Comparison of *BCL2L11*, *PMAIP1*, and *BCL2L1* gene expression according to their localization. LN, lymph nodes; PB, peripheral blood; BM, bone marrow. Wilcoxon-Mann-Whitney tests. $**p < 0.01$, $****p < 0.0001$. **(C)** Representation of the individual factor map for the PCA according to the two first dimensions and their respective correlation circle. Colored ellipses are drawn around the mean of the group (=barycenter), with the 95% confidence interval of the mean in the corresponding plan.



Several gene-expression profiling analyses of primary MM cells have led to a molecular classification of MM subtypes (32–34). This classification now includes 8 subgroups characterized either by an IgH translocation with the CyclinD1 [$t(11;14)$; CCND1 group], the MMSET oncogene [$t(4;14)$; MS group], MAF oncogenes [$t(14;16)$ and $t(14;20)$], or by specific gene signatures (PR, HY, Myeloid, SOCS3, and NFKB) (35, 36). We previously reported the apoptotic machinery diversity in MM major subgroups (HY, CCND1, ME, and MS) (37). Here, we enlarged the analysis by taking into account the 8 molecular

subgroups (33). As represented by PCA, the NFKB subgroup displayed a specific BCL2-family profile and was characterized by an overexpression of *BCL2L2*, *BCL2L11*, and *BMF*, while the other groups overlapped without any exclusive signatures (Figures 3C,D).

Histologic transformation of indolent B cell lymphomas such as FL or MALT into an aggressive lymphoma (mostly DLBCL) is a well-described phenomenon (38). Our analysis highlighted that histologic transformation was associated with common deregulations of the BCL2-family in both FL and MALT

(Figure 4A, Figure S6). Indeed, we observed a downregulation of BCL2 as well as an increase of the pro-apoptotic *BCL2L11*, *BID*, and *BAX* and *BAK1* in both entities after transformation (Figure 4B). As observed in the PCA, the BCL2-family profile of the aggressive forms of both FL and MALT segregated apart from their respective indolent forms toward a profile close to the one of DLBCL (Figure 4C). Of note, we investigated whether BCL2-family expression patterns would differentiate the non-transformed FL/MALT from the transformed one. To do so, an ensemble machine-learning algorithm (random forest) was trained on BCL2-family expression dataset to predict the different B-cell malignancies. Using this trained algorithm on FL and MALT, it classified the transformed forms of the latter as DLBCL, thus efficiently predicting the aggressive transformation in both FL [Odds Ratio [OR] for transformation = 31, $p = 2 \times 10^{-14}$] and MALT (OR = 30, $p = 9 \times 10^{-5}$).

BCL2-family Expression Profile Predicts the Sensitivity to BCL2 Specific BH3-mimetics in Mature B Cell Malignancies

We previously demonstrated that a ratio of BCL2 expression with the resistance factors *MCL1* and *BCL2L1* could predict sensitivity to venetoclax in MCL and MM *ex vivo* and *in vivo* (20, 39, 40). Here, to determine the best predictive ratio across mature B cell malignancies, we analyzed the correlations between expression of previously described factors involved in venetoclax resistance (*MCL1*, *BCL2L1*, *BCL2A1*) (14, 23, 25, 39–41) as well as factors involved in venetoclax efficacy (*BCL2*, *BCL2L11*, *BAX*) (24, 25, 42) with overall response rate (ORR) in patients treated with venetoclax. Recent publications have shown an elevated ORR of venetoclax monotherapy in CLL and MCL (79 and 75%, respectively) (18, 20), intermediate for FL (38%) (17) and low for DLBCL and MM (18 and 21%, respectively) (17, 20). We showed that the ratio $(BCL2+BCL2L11+BAX)/(BCL2L1)$ was the best predictor of venetoclax response across all mature B cell malignancies ($r = 0.81$, $p = 7 \times 10^{-4}$, Figure S7). Of note, BPLL and HCL, entities for which venetoclax efficacy is unknown, were characterized by a high ratio whereas BL was characterized by a low ratio (Figure 5A).

We next analyzed whether subgroups of patients (genomic heterogeneity or transformation) displayed different ratios. In good agreement with the *in vivo* and *in vitro* sensitivity to venetoclax, we showed that the CCND1MM subgroup displayed the highest $(BCL2+BCL2L11+BAX)/(BCL2L1)$ ratio among MM subtypes (Figure 5B) (14, 20). Interestingly, subgroups of patients with MCL (*SOX11*+/-) harbored similar ratio, while ABC DLBCL cells were characterized by a higher ratio compared to GCB and PMBL. Histologic transformation only slightly influenced the ratio in FL but not in MALT lymphoma (Figures 5C,D).

Lastly, we compared the $(BCL2+BCL2L11+BAX)/(BCL2L1)$ ratio according to the microenvironment and showed that MCL within the LN are predicted to be more resistant to venetoclax than MCL cells in the PB, confirming our previous functional

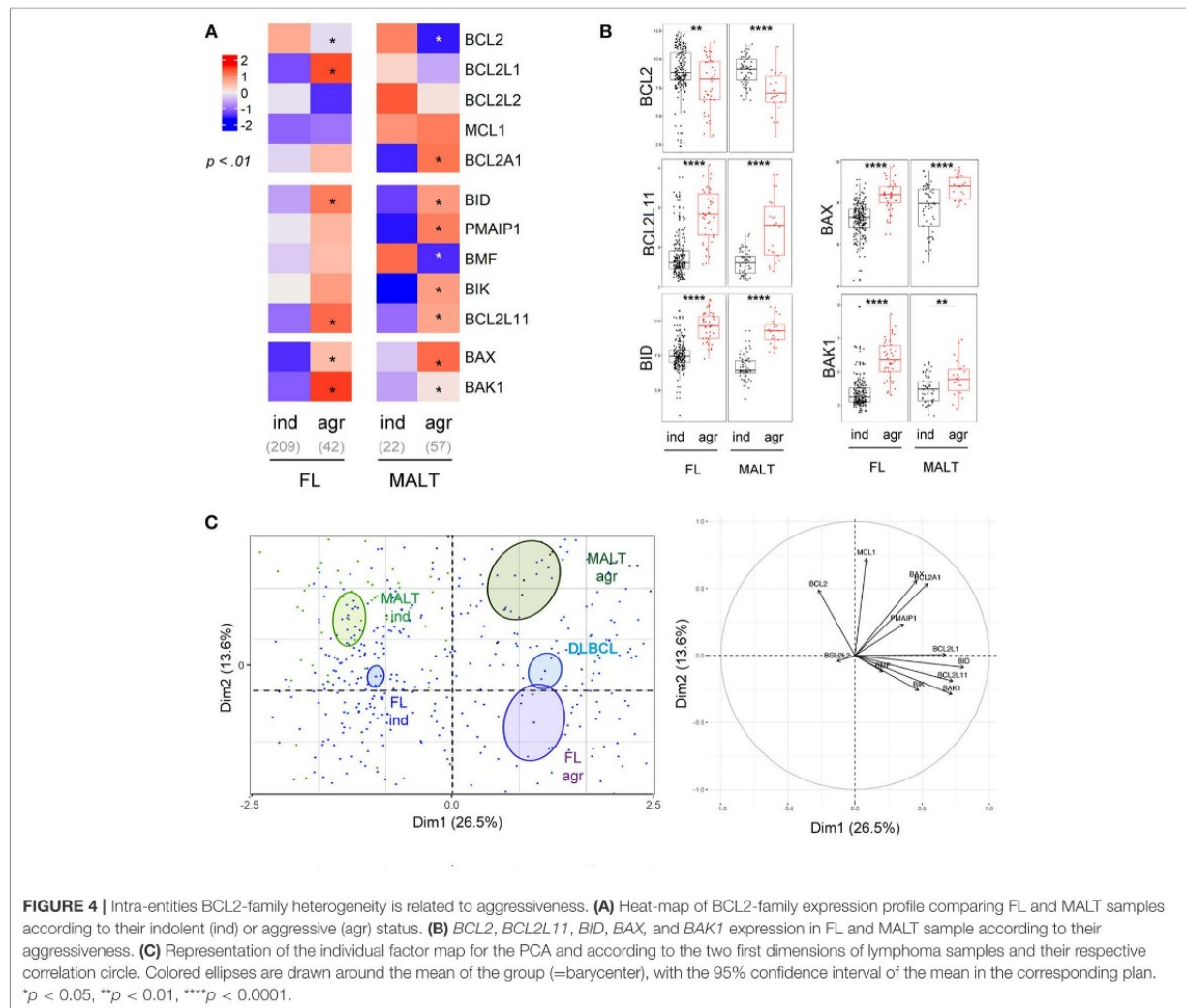
in vitro observations (23, 39). Similarly, our analysis predicted that CLL cells should be less sensitive to venetoclax in BM as compared to PB (Figure 5E).

DISCUSSION

The BCL2-family is known to be deregulated in cancer, including hematological malignancies (43). Whereas, most studies focused on the regulation of selective BCL2-family members within a specific pathology, here we provided a global RNA expression analysis of 12 members of the BCL2-family across 10 mature B-cell malignancies and their relative normal counterparts. To do so, we took advantage of the numerous Affymetrix HGU133Plus2.0 series datasets previously published for mature B cell malignancies and gathered in the GEO database. We controlled the normalization quality by addressing hallmarks expression such as *CCND1*, *SOX11*, *MKI67*, *MME*, *CD200*, *CD38*, or *SDC1*, confirming malignancies specificities, independently of source series (Figure S1). Using similar data mining strategy, Adams et al. recently highlighted an overexpression of *BCL2* and *BCL2L2* in Hodgkin Lymphomas and several NHL (BL, DLBCL, FL, MZL, and MCL) (44). This overexpression was confirmed in our study with the exception of BL, a discrepancy that might be due to the use of different normal counterparts. Nevertheless, this technology has limitations such as probes aspecificity (*HRK*, *BAD*) or cross-hybridization within some probes such as *BBC3* (45), impeding the integration of these critical member of the BCL2 network in the present study (see Material and Methods section). Although this drawback could be resolved using RNA-sequencing technologies, datasets availability was too limited for most of the cellular entities analyzed in the present work.

Having these limitations in mind, our analysis provided a global picture of the BCL2-family dysregulation in mature B-cell malignancies, from their transcriptional regulation to their potential use as targeted therapy biomarker. We first highlighted a global upregulation of anti-apoptotic genes as well as a global downregulation of pro-apoptotic genes in most B cell lymphomas compared to their normal control, confirming that the BCL2-family deregulation is a hallmark of most B cell malignancies. We did not observe upregulation of the anti-apoptotic genes in MM compared to BMPC. On the one hand, this might be due to the elevated level of anti-apoptotic genes in BMPC, which are necessary for the survival of these long-lived cells (46). On the other hand, we cannot exclude that posttranscriptional modifications could directly influence protein levels, particularly for Mcl-1 (47–49).

We also showed specific modulations in BCL2-family expression associated to molecular subgroups in MCL, DLBCL and MM. In the *SOX11*- MCL subtype, we highlighted a selective dramatic downregulation of *BIK*. Given that this BH3-only is tightly regulated by DNA methylation (50), its silencing might be the direct consequence of the specific epigenetic profile recently described in this MCL subtype (51). Further investigations are now needed to document the consequences of these modulations in the survival and chemoresistance of *SOX11*- MCL cells.

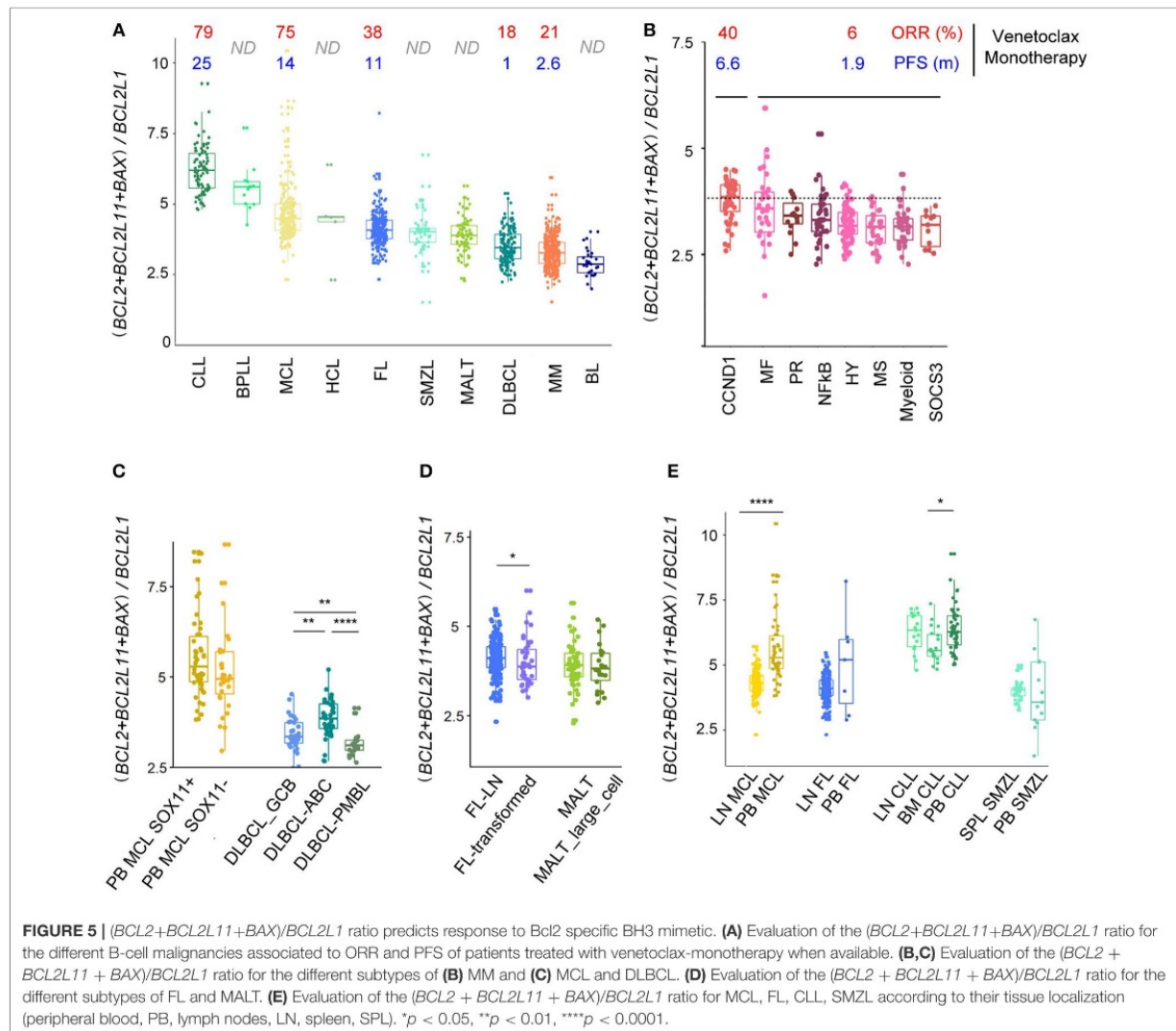


Similarly, the “NFkB” molecular subgroup displayed a unique BCL2-family profile within MM samples, highlighted by the overexpression of *BCL2L2*, *BMF*, and *BCL2L11*. Given that this subgroup is characterized by an elevated expression of NFkB targets, it is tempting to speculate that the NFkB pathway regulates these genes in MM, as it has been previously described for *BCL2L2* in B cell lymphoma (52). Nevertheless, the “NFkB” entity represents <10% of the disease and the lack of relevant *in vitro* models for this molecular subgroup makes its study challenging (53).

By evaluating BCL2-family expression according to tissue localization, we observed a strong microenvironment-dependent regulation, especially in MCL and FL. Several studies have demonstrated the critical role of the microenvironment in the expansion and the chemoresistance of these hematological malignancies (54–56). Furthermore, we recently showed that a microenvironment-dependent upregulation of *BCL2L1*

and downregulation of *BCL2L11* was involved in MCL chemoresistance (23). Of interest, a global pro- and anti-apoptotic imbalance was confirmed here in MCL. In addition, we showed that both *BCL2L11* and *PMAIP1* were downregulated by the tumor microenvironment in all the B-cell malignancies studied (MCL, FL, CLL, and SMZL), suggesting a fundamental role of these 2 specific BH3-only proteins in the microenvironment-dependent survival of lymphoma cells. Rational strategies to counteract their downregulation could then be critical to target lymphoma cells within the protective niches.

This global tissue-specific modulation in the BCL2 profile also directly impacted the predictive ratio to venetoclax sensitivity in MCL. Indeed, the $(BCL2+BCL2L11+BAX)/BCL2L1$ ratio was much lower in LN-MCL samples compared to PB-MCL. Even though clinical studies highlighted an encouraging



ORR in MCL patients treated by venetoclax monotherapy, the PFS observed appeared much lower than in CLL. Our study suggested that MCL cells in the LN could be more resistant to venetoclax than PB-MCL and consequently could be involved in the rapid relapse observed in this pathology. Strategies targeting the microenvironment in association with venetoclax could then increase treatment efficacy and delay relapse. We recently show that MCL primary cells egressing in the PB through BTK inhibition have a *BCL2* high/*BCL2L1* low profile and were highly sensitive to venetoclax (39). Similarly, we showed that microenvironment-dependent *BCL2L1* induction was counteracted with the anti-CD20 antibody obinutuzumab, leading to an increased venetoclax efficacy *ex vivo* (23). Similar results showing the benefit of targeting microenvironmental interactions to potentiate BH3-mimetics efficacy have been

published in other B cell malignancies such as CLL and MM (28, 29).

Of note, the above-mentioned predictive ratio highlighted that previously untested entities in venetoclax clinical trials, especially B-PLL and HCL, have sensitive-like *BCL2*-family profile, suggesting that they should be included in future clinical trials. Lastly, given the heterogeneity among entities (molecular subgroups, aggressiveness, tissue), this ratio could help predicting the B cell lymphoma patients who would benefit to *BCL2* specific BH3-mimetic based therapy.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BT and AP designed the project, performed bioinformatics analyses, and wrote the paper. CB participated in the

bioinformatics analyses. PG-B, MA, and CP-D participated in the design of the study and in the writing of the article. DC designed the project and wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from FFRMG, AF3M, Action Cancer 44, i-Site NexT (ANR-16-IDEX-0007) and the

SIRIC ILIAD (INCa-DGOS-Inserm_12558). BT was supported by INSERM (poste d'accueil) and Foundation ARC.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00645/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol.* (2015) 15:149–59. doi: 10.1038/nri3802
- Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.* (2015) 15:160–71. doi: 10.1038/nri3795
- Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol.* (2015) 15:172–84. doi: 10.1038/nri3814
- Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* (2005) 5:251–62. doi: 10.1038/nrc1589
- Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *CA Cancer J Clin.* (2016) 66:443–59. doi: 10.3322/caac.21357
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* (2005) 17:525–35. doi: 10.1016/j.molcel.2005.02.003
- McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, et al. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* (1989) 57:79–88. doi: 10.1016/0092-8674(89)90174-8
- Beroukhim R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* (2010) 463:899–905. doi: 10.1038/nature08822
- Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, Matsuo K, Zhang X, Ota A, et al. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* (2005) 24:1348–58. doi: 10.1038/sj.onc.1208300
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2005) 102:13944–9. doi: 10.1073/pnas.0506654102
- Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ, Manohar V, Abbasi F, Lin YC, et al. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood* (2007) 109:5079–86. doi: 10.1182/blood-2007-02-071225
- Huang J, Fairbrother W, Reed JC. Therapeutic targeting of Bcl-2 family for treatment of B-cell malignancies. *Exp Rev Hematol.* (2015) 8:283–97. doi: 10.1586/17474086.2015.1026321
- Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* (2008) 7:989–1000. doi: 10.1038/nrd2658
- Touzeau C, Dousset C, Le Gouill S, Sampath D, Levenson JD, Souers AJ, et al. The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia* (2014) 28:210–2. doi: 10.1038/leu.2013.216
- Touzeau C, Le Gouill S, Mahe B, Boudreaux JS, Gastinne T, Blin N, et al. Deep and sustained response after venetoclax therapy in a patient with very advanced refractory myeloma with translocation t(11;14). *Haematologica* (2017) 102:e112–14. doi: 10.3324/haematol.2016.160408
- Dai H, Meng XW, Kaufmann SH. Mitochondrial apoptosis and BH3 mimetics. *F1000Research* (2016) 5:2804. doi: 10.12688/f1000research.9629.1
- Davids MS, Roberts AW, Seymour JF, Pagel JM, Kahl BS, Wierda WG, et al. Phase I first-in-human study of venetoclax in patients with relapsed or refractory non-hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol.* (2017) 35:826–33. doi: 10.1200/JCO.2016.70.4320
- Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med.* (2016) 374:311–22. doi: 10.1056/NEJMoa1513257
- Levenson JD, Sampath D, Souers AJ, Rosenberg SH, Fairbrother WJ, Amiot M, et al. Found in translation: how preclinical research is guiding the clinical development of the BCL2-selective inhibitor venetoclax. *Cancer Discov.* (2017) 7:1376–93. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0797
- Kumar S, Kaufman JL, Gasparetto C, Mikhael J, Vij R, Pegourie B, et al. Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood* (2017) 130:2401–9. doi: 10.1182/blood-2017-06-788786
- Davids MS. Targeting BCL-2 in B-cell lymphomas. *Blood* (2017) 130:1081–8. doi: 10.1182/blood-2017-04-737338
- Tsuyama N, Sakata S, Baba S, Mishima Y, Nishimura N, Ueda K, et al. BCL2 expression in DLBCL: reappraisal of immunohistochemistry with new criteria for therapeutic biomarker evaluation. *Blood* (2017) 130:489–500. doi: 10.1182/blood-2016-12-759621
- Chiron D, Bellanger C, Papin A, Tessoulin B, Dousset C, Maiga S, et al. Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma. *Blood* (2016) 128:2808–18. doi: 10.1182/blood-2016-06-720490
- Dousset C, Maiga S, Gomez-Bougie P, Le Coq J, Touzeau C, Moreau P, et al. BH3 profiling as a tool to identify acquired resistance to venetoclax in multiple myeloma. *Br J Haematol.* (2017) 179:684–8. doi: 10.1111/bjh.14251
- Tahir SK, Smith ML, Hessler P, Rapp LR, Idler KB, Park CH, et al. Potential mechanisms of resistance to venetoclax and strategies to circumvent it. *BMC Cancer* (2017) 17:399. doi: 10.1186/s12885-017-3383-5
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* (2016) 127:2375–90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569
- Tarte K, Jourdan M, Veyrune JL, Berberich I, Fiol G, Redal N, et al. The Bcl-2 family member Bfl-1/A1 is strongly repressed in normal and malignant plasma cells but is a potent anti-apoptotic factor for myeloma cells. *Br J Haematol.* (2004) 125:373–82. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.04908.x
- Gupta VA, Matulis SM, Conage-Pough JE, Nooka AK, Kaufman JL, Lonial S, et al. Bone marrow microenvironment-derived signals induce Mcl-1 dependence in multiple myeloma. *Blood* (2017) 129:1969–79. doi: 10.1182/blood-2016-10-745059
- Thijssen R, Slinger E, Weller K, Geest CR, Beaumont T, van Oers MH, et al. Resistance to ABT-199 induced by microenvironmental signals in chronic lymphocytic leukemia can be counteracted by CD20 antibodies or kinase inhibitors. *Haematologica* (2015) 100:e302–6. doi: 10.3324/haematol.2015.124560
- Puente XS, Jares P, Campo E. Chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma: crossroads of genetic and microenvironment interactions. *Blood* (2018) 131:2283–96. doi: 10.1182/blood-2017-10-764373
- Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* (2006) 24:961–8. doi: 10.1200/JCO.2005.03.4264
- Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood* (2005) 106:296–303. doi: 10.1182/blood-2005-01-0034

33. Broyl A, Hose D, Lokhorst H, de Knecht Y, Peeters J, Jauch A, et al. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood* (2010) 116:2543–53. doi: 10.1182/blood-2009-12-261032
34. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* (2006) 108:2020–8. doi: 10.1182/blood-2005-11-013458
35. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol.* (2005) 23:6333–8. doi: 10.1200/JCO.2005.05.021
36. Szalat R, Avet-Loiseau H, Munshi NC. Gene expression profiles in myeloma: ready for the real world? *Clin Cancer Res.* (2016) 22:5434–42. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0867
37. Gomez-Bougie P, Amiot M. Apoptotic machinery diversity in multiple myeloma molecular subtypes. *Front Immunol.* (2013) 4:467. doi: 10.3389/fimmu.2013.00467
38. Montoto S, Fitzgibbon J. Transformation of indolent B-cell lymphomas. *J Clin Oncol.* (2011) 29:1827–34. doi: 10.1200/JCO.2010.32.7577
39. Chiron D, Dousset C, Brosseau C, Touzeau C, Maiga S, Moreau P, et al. Biological rationale for sequential targeting of Bruton tyrosine kinase and Bcl-2 to overcome CD40-induced ABT-199 resistance in mantle cell lymphoma. *Oncotarget* (2015) 6:8750–9. doi: 10.18632/oncotarget.3275
40. Gomez-Bougie P, Maiga S, Tessoulin B, Bourcier J, Bonnet A, Rodriguez MS, et al. BH3-mimetic toolkit guides the respective use of BCL2 and MCL1 BH3-mimetics in myeloma treatment. *Blood* (2018). doi: 10.1182/blood-2018-03-836718. [Epub ahead of print].
41. Vogler M, Butterworth M, Majid A, Walewska RJ, Sun XM, Dyer MJ, et al. Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* (2009) 113:4403–13. doi: 10.1182/blood-2008-08-173310
42. Bodo J, Zhao X, Durkin L, Souers AJ, Phillips DC, Smith MR, et al. Acquired resistance to venetoclax (ABT-199) in t(14;18) positive lymphoma cells. *Oncotarget* (2016) 7:70000–10. doi: 10.18632/oncotarget.12132
43. Vogler M, Walter HS, Dyer MJS. Targeting anti-apoptotic BCL2 family proteins in haematological malignancies - from pathogenesis to treatment. *Br J Haematol.* (2017) 178:364–79. doi: 10.1111/bjh.14684
44. Adams CM, Mitra R, Gong JZ, Eischen CM. Non-hodgkin and hodgkin lymphomas select for overexpression of BCLW. *Clin Cancer Res.* (2017) 23:7119–29. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1144
45. Chipuk JE, Green DR. PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Cell Cycle* (2009) 8:2692–6. doi: 10.4161/cc.8.17.9412
46. Papatriantafyllou M. B cells: secrets to plasma cell longevity. *Nat Rev Immunol.* (2013) 13:156–7. doi: 10.1038/nri3410
47. Wuilleme-Toumi S, Robillard N, Gomez P, Moreau P, Le Gouill S, Avet-Loiseau H, et al. Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* (2005) 19:1248–52. doi: 10.1038/sj.leu.2403784
48. Wertz IE, Kusam S, Lam C, Okamoto T, Sandoval W, Anderson DJ, et al. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* (2011) 471:110–4. doi: 10.1038/nature09779
49. Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X. Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* (2005) 121:1085–95. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.009
50. Brosseau C, Dousset C, Touzeau C, Maiga S, Moreau P, Amiot M, et al. Combination of lenalidomide with vitamin D3 induces apoptosis in mantle cell lymphoma via demethylation of BIK. *Cell Death Dis.* (2014) 5:e1389. doi: 10.1038/cddis.2014.346
51. Queiros AC, Beekman R, Vilarrasa-Blasi R, Duran-Ferrer M, Clot G, Merkel A, et al. Decoding the DNA methylome of mantle cell lymphoma in the light of the entire B cell lineage. *Cancer Cell* (2016) 30:806–21. doi: 10.1016/j.ccell.2016.09.014
52. Zhang M, Xu-Monette ZY, Li L, Manyam GC, Visco C, Tzankov A, et al. RelA NF-kappaB subunit activation as a therapeutic target in diffuse large B-cell lymphoma. *Aging* (2016) 8:3321–40. doi: 10.18632/aging.101121
53. Moreaux J, Klein B, Bataille R, Descamps G, Maiga S, Hose D, et al. A high-risk signature for patients with multiple myeloma established from the molecular classification of human myeloma cell lines. *Haematologica* (2011) 96:574–82. doi: 10.3324/haematol.2010.033456
54. Ame-Thomas P, Tarte K. The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin Cancer Biol.* (2014) 24:23–32. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.08.001
55. Balakrishnan K, Burger JA, Fu M, Doifode T, Wierda WG, Gandhi V. Regulation of Mcl-1 expression in context to bone marrow stromal microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasia* (2014) 16:1036–46. doi: 10.1016/j.neo.2014.10.002
56. Papin A, Le Gouill S, Chiron D. Rationale for targeting tumor cells in their microenvironment for mantle cell lymphoma treatment. *Leuk Lymph.* (2018) 59:1064–72. doi: 10.1080/10428194.2017.1357177

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

Copyright © 2019 Tessoulin, Papin, Gomez-Bougie, Bellanger, Amiot, Pellat-Deceunynck and Chiron. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Figure S1. Work-flow and quality control. A. Flow diagram representing the work flow used in the study. B.C. Expression of “anchoring genes” (CD27, CCND1, SOX11, MKI67, BCL6, CD10, CD200, CD38 and SDC1) differentially expressed among the cell types analyzed.

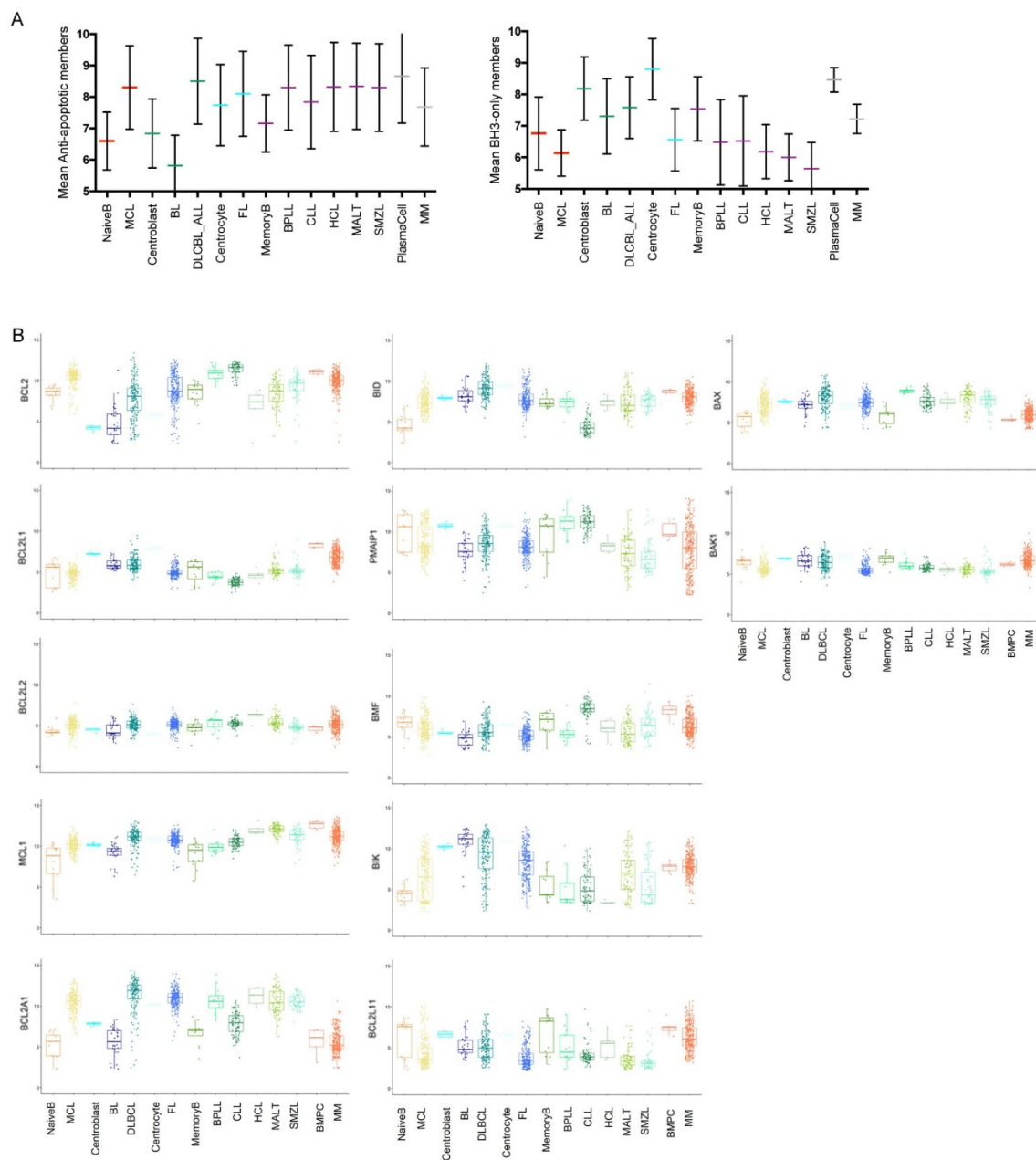


Figure S2. Expression of BCL2-genes family in the different B-cell malignancies compared to their respective control

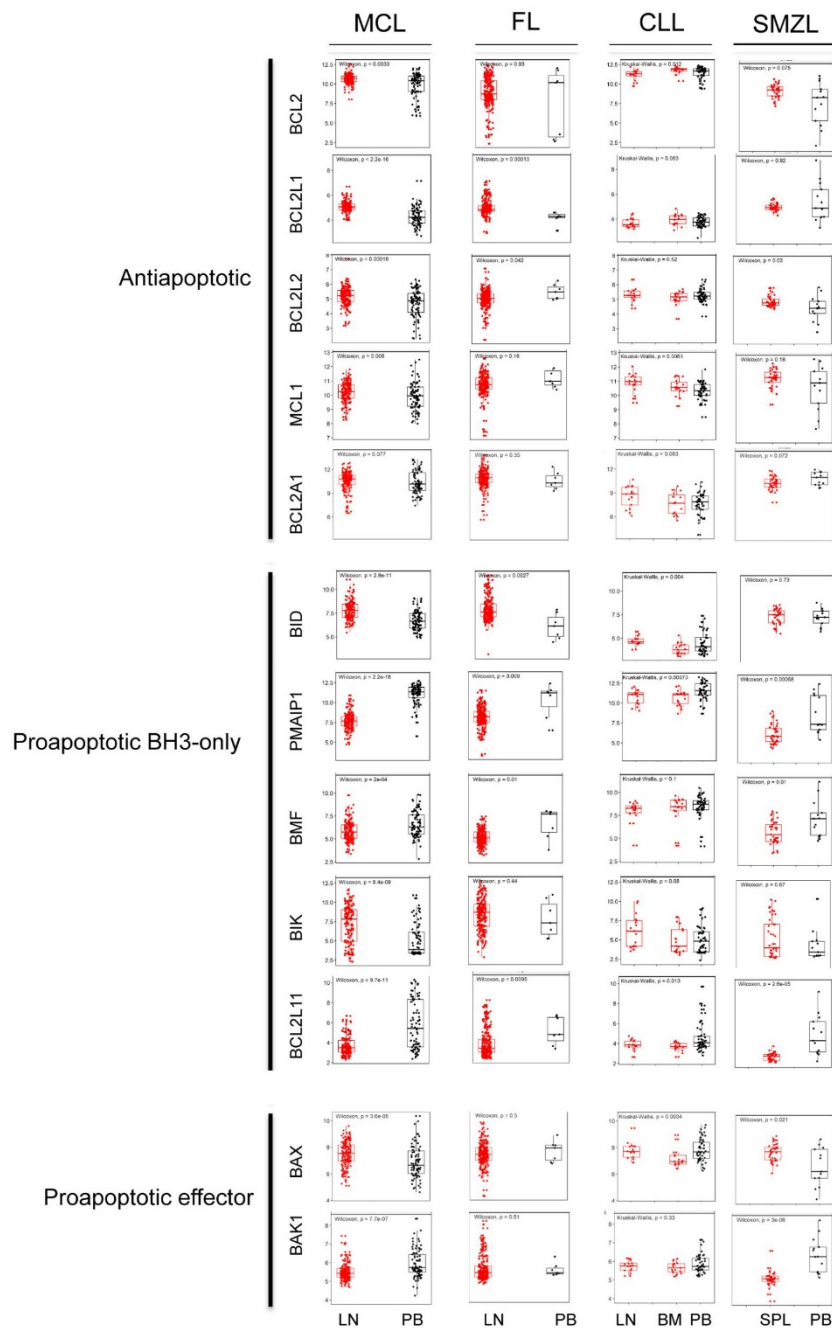


Figure S3. Expression of BCL2-genes family according to their localization. LN : lymph nodes, PB : peripheral blood, BM : bone marrow. Wilcoxon-Mann-Whitney tests or kruskal-Wallis tests.

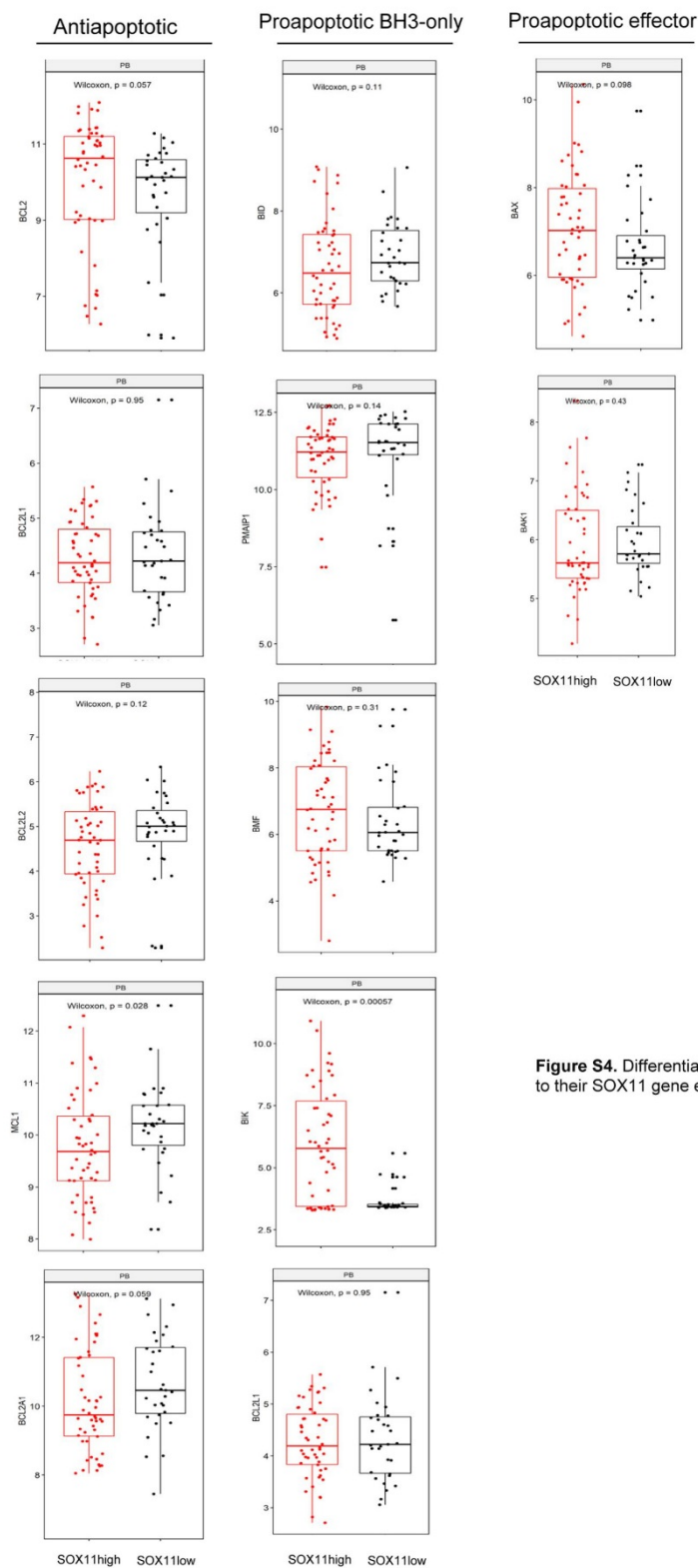


Figure S4. Differential expression of BCL2 family genes according to their SOX11 gene expression. Wilcoxon-Mann-Whitney tests.

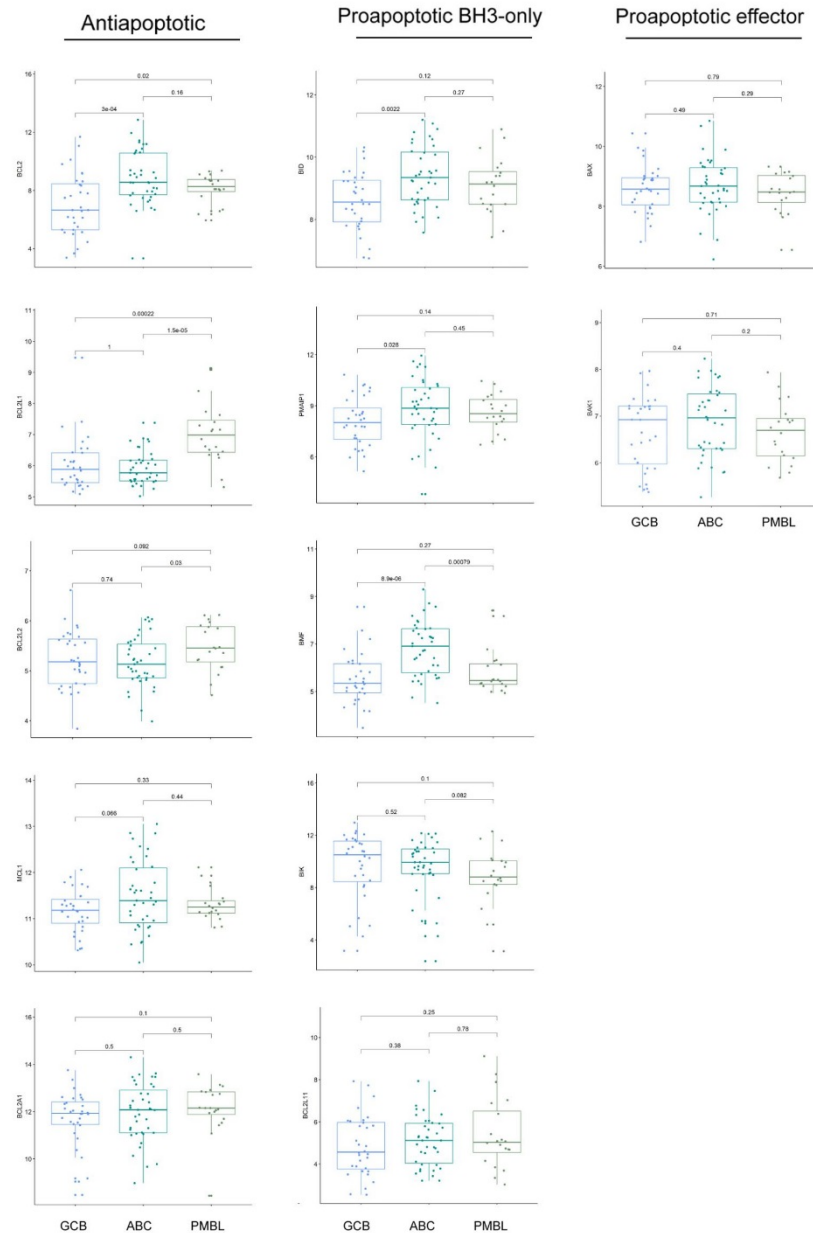


Figure S5. Gene expression of BCL2 family genes for the three subtypes of DLBCL: GCB (germinal center B cell), ABC (activated B-cell) and PMBL (Primary mediastinal B-cell lymphoma). kruskal-Wallis tests.

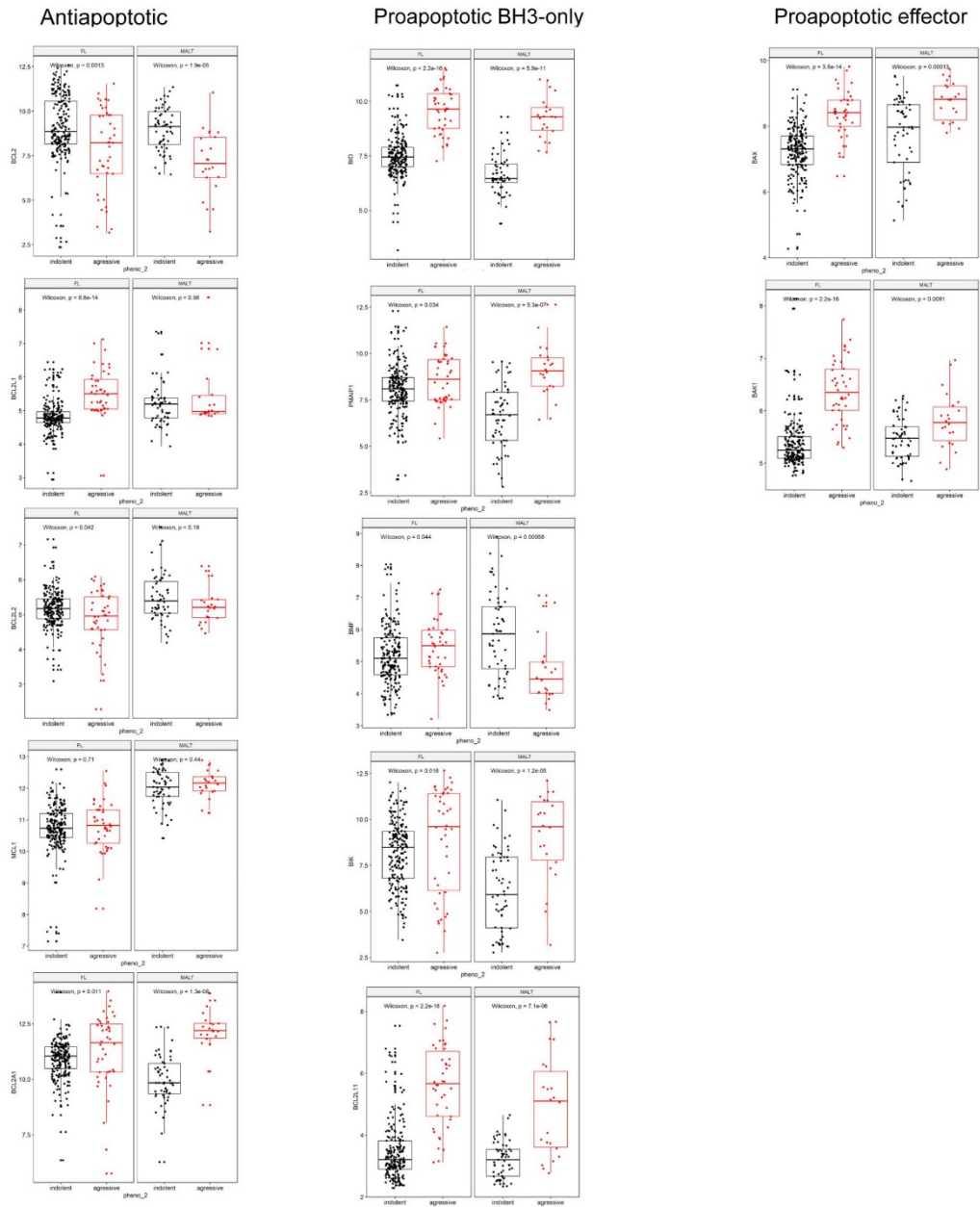


Figure S6. Gene expression of BCL2 family genes in FL (Follicular Lymphoma) and MALT (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma). Wilcoxon-Mann-Whitney tests.

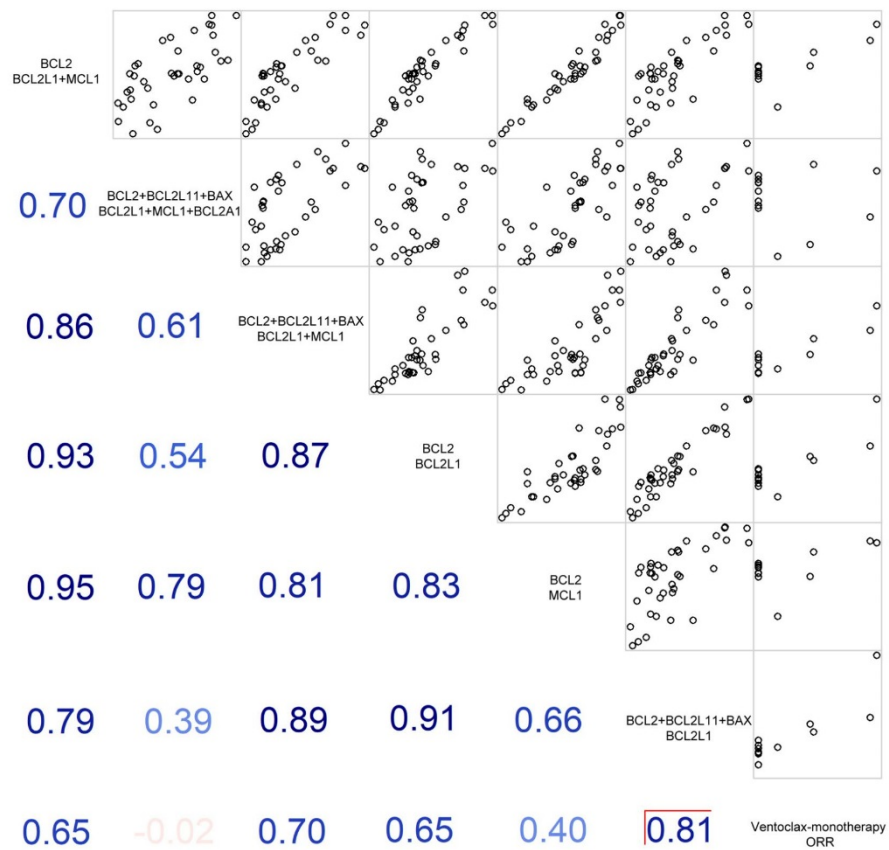


Figure S7. Correlations analysis between expression of factors involved in venetoclax resistance (MCL1, BCL2L1, BCL2A1) and factors involved in venetoclax efficacy (BCL2, BCL2L1, BAX) with venetoclax overall response rate (ORR).

IV) Article : CSF1R and BTK inhibitions as novel strategies to disrupt the dialog between mantle cell lymphoma and macrophages

IV-1) Les macrophages : généralités

Les monocytes sont des cellules mononuclées du sang périphérique et sont donc issus de la différenciation hématopoïétique. Ils représentent entre 2 et 10% des cellules du sang et peuvent se polariser en macrophages dans les tissus. Les macrophages sont des cellules myéloïdes qui possèdent une grande diversité phénotypique et fonctionnelle. En fonction des stimuli intégrés par les macrophages, ils joueront des fonctions d'inflammation, de remodelage tissulaire, de défense contre des pathogènes microbiens ou encore ils permettront une promotion tumorale (Mosser and Edwards, 2008).

La plasticité des macrophages permet une grande diversité phénotypique comprise entre deux extrêmes obtenus par polarisation de monocytes *in vitro* (Figure 21). L'activation classique avec GM-CSF (ou CSF2), de l'IFN γ et du LPS mène à un phénotype macrophagique M1 qui joue des fonctions pro-inflammatoires et anti-tumorales. En revanche, l'activation alternative par du M-CSF (ou CSF1), de l'IL-4 et de l'IL-13 mène à la polarisation des monocytes avec en macrophages de type M2 aux propriétés anti-inflammatoires et avec une augmentation de l'expression des récepteurs « *scavengers* » utile à la phagocytose pour des fonctions de remodelage tissulaire et de clairance (Murray et al., 2014). L'activation alternative est également permise par l'IL-10 pour un profil de macrophages M2 régulateurs. L'émergence des puces à ADN a mis en évidence les différences de transcriptome entre les différentes populations de macrophages. Ces études mettent principalement en évidence une différence de sécrétome entre les macrophages M1 et M2. Les macrophages de type M1 expriment fortement les gènes de chemokines *CXCL9* et *CXCL10* ainsi que les cytokines pro-inflammatoires *TNF*, *IL12*, *IL23* et *IL6* alors que les macrophages de type M2 expriment les gènes *CCL17*, *CCL18*, *CCL22* et *CCL24* et exprime le gène de la cytokine anti-inflammatoire *IL10* (Martinez et al., 2006).

Les macrophages sont des acteurs clés de l'inflammation qui est une caractéristique majeure des cancers (Mantovani et al., 2008; Hanahan and Weinberg, 2011). Le rôle protumoral des macrophages dans la survie et la prolifération des cellules cancéreuses émerge il y a plusieurs dizaines d'années. Ces macrophages sont désignés comme des macrophages associés à la tumeur (TAM). Les cellules myéloïdes sont des composants présents dans le microenvironnement tumoral et la fréquence élevée des macrophages corrèle avec un mauvais pronostic dans certains cancers notamment le lymphome de

Hodgkin (Steidl et al., 2010). Deux hypothèses non exclusives sont décrites concernant l'origine des TAM. Des macrophages résidents se polarisent selon le contexte tumoral dans lequel ils se trouvent et des monocytes du sang périphérique sont attirés par les cellules tumorales avant une polarisation en macrophages (Frankenberger et al., 2012).

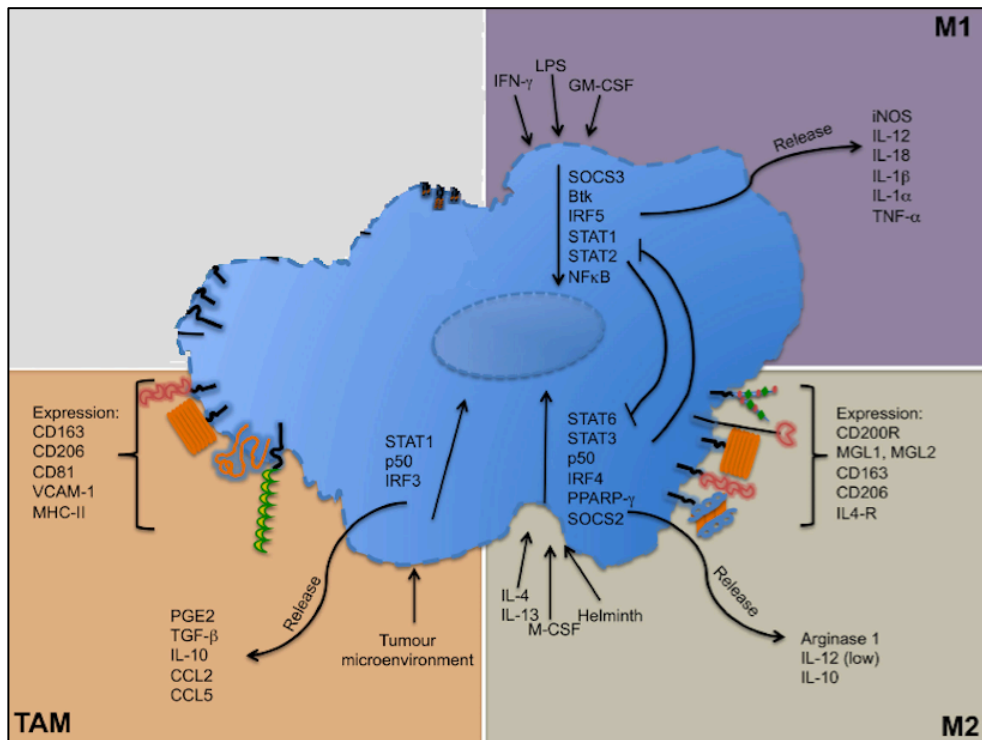


Figure 21 : Polarisation des macrophages en différentes populations. La plasticité des macrophages permet une grande diversité phénotypique et fonctionnelle. Les macrophages M1 polarisés par le GM-CSF, le LPS et l'IFN γ et surexpriment majoritairement des facteurs solubles pro-inflammatoires pour jouer des fonctions d'inflammation et de réponse immunitaire antimicrobienne. Les macrophages de type M2 surexpriment des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et jouent des rôles dans le remodelage tissulaire et la phagocytose. D'après Chávez-Galán et al., 2015.

IV-2) Les macrophages associés aux hémopathies B

Bien que le rôle des TAM a été principalement défini dans les cancers solides, leur présence est également décrite dans les niches tumorales des hémopathies B. Le rôle protumoral des TAM dans les lymphomes est argumenté par une fréquence élevée associée à un mauvais pronostic dans le lymphome de Hodgkin ou leur impact négatif dans la réponse à une chimiothérapie dans le FL (Steidl et al., 2010; Kridel et al., 2015). La présence des macrophages dans les niches tumorales telles que la moelle osseuse ou les ganglions est

documentée dans les différents lymphomes avec un phénotype proche des macrophages M2 comme en témoigne la présence de cellules CD163⁺. De plus, *in vitro*, la co-culture des macrophages avec les cellules tumorales de différents LNH ou de la LLC permet la survie des cellules tumorales qui ne survivent pas nécessairement sans support (Tsukada et al., 2002; Guilloton et al., 2012; Boissard et al., 2017). Les macrophages vont permettre la survie, la prolifération et la chemorésistance des cellules tumorales par l'intermédiaire de contacts directs ou de facteurs solubles.

Dans la LLC, la co-culture de cellules tumorales avec des monocytes autologues permet la génération de macrophages CD163⁺ qui en retour font survivre les cellules de LLC. Ces macrophages sont appelés les « nurse like cells » (NLC) et sont caractérisés par un phénotype proche des macrophages de type M2 (Ysebaert and Fournié, 2011). Les cellules de LLC sont capables de sécréter des facteurs polarisateurs des macrophages M2 tels que le CSF1, l'IL-4 ou l'IL-10 (Polk et al., 2016). En retour, les macrophages permettent la survie des cellules tumorales par la sécrétion de facteurs solubles tels que APRIL, BAFF ou encore le CXCL12 (Puente et al., 2018). De plus, des contacts directs par exemple par l'interaction entre la molécule LFA-3 sur les cellules de LLC et le CD2 exprimé par les NLC favorise la survie des cellules de LLC (Boissard et al., 2017).

Dans le FL, la lectine DC-SIGN exprimée par des macrophages du microenvironnement, est capable de lier des mannoses insérés sur le BCR des cellules tumorales suite à l'acquisition des hypermutations somatiques (Amin et al., 2015). Cette interaction permet l'activation de la signalisation BCR et promeut la survie de la cellule tumorale. Une autre étude montre l'existence d'une coopération entre les macrophages et les LyT du microenvironnement tumoral pour favoriser la croissance tumorale (Epron et al., 2012). En effet, en trans-présentant l'IL-15 aux cellules de FL, les macrophages potentialisent l'interaction CD40-CD40L entre les lymphocytes T et les cellules de lymphome et ainsi leur prolifération.

IV-3) Résumé

L'agressivité du LCM et les rechutes systématiques aux premières lignes de traitement nécessitent le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans la survie, la prolifération et la chemorésistance des cellules de LCM. Cependant la nature des interactions entre les cellules de LCM et les cellules du microenvironnement sont peu connues. Après l'étude du microenvironnement lymphoïde et de l'interaction CD40-CD40L, dans cette troisième étude, nous avons étudié le dialogue qui s'opère entre les cellules primaires de LCM et les

macrophages associés à la tumeur et développé des alternatives thérapeutiques ciblées pour altérer ces interactions.

Par l'élaboration d'un modèle de co-culture entre des cellules primaires de LCM et des monocytes autologues ou allogéniques, nous montrons que les monocytes supportent la survie des cellules de LCM. De plus, les monocytes supportent la prolifération de certains échantillons de cellules de LCM correspondant à des cas agressifs. Au cours des co-cultures, les cellules primaires de LCM polarisent les monocytes en « macrophages associés au LCM » (M ϕ LCM). Pour définir la nature des M ϕ LCM, nous avons étudié leur phénotype transcriptomique avec des puces à ADN et comparé à des macrophages de type M1 et de type M2. Les analyses montrent que les M ϕ LCM forment un groupe avec leurs caractéristiques spécifiques mais se rapprochent des macrophages de type M2 par rapport aux M1. Les M ϕ LCM se définissent comme des macrophages exprimant les marqueurs M2 CD163, *IL10* et *IGF1* mais également le gène pro-inflammatoire *IL6*. Pour déterminer comment les cellules de LCM polarisent les monocytes en M ϕ LCM CD163⁺, nous avons analysé l'expression des facteurs solubles décrits pour être impliqués dans la polarisation M2 par les cellules tumorales et observé que les gènes *CSF1* et *IL10* sont surexprimés par les cellules de LCM comparées à des lymphocytes B CD5⁺ normaux. De plus, les facteurs CSF1 et IL-10 sont également détectés à l'échelle protéique et la neutralisation du CSF1 mais pas de l'IL-10 bloque la polarisation des M ϕ -LCM *ex vivo*.

Des données préliminaires rapportent des modulations du sécrétome des cellules de LCM après une inhibition de la voie BCR par l'inhibiteur du BTK l'Ibrutinib. Dans notre étude, nous démontrons que l'expression du CSF1, tout comme l'IL-10, est dépendante de la voie BCR. Ainsi, ces facteurs solubles sont inhibés dans les cellules sensibles à l'Ibrutinib mais pas dans les cellules résistantes. Cette réduction de la sécrétion de CSF1 par les cellules de LCM par l'Ibrutinib a pour conséquence une inhibition de la polarisation des M ϕ LCM et ainsi, de la survie et de la prolifération tumorales dépendantes des M ϕ -LCM pour une majorité des échantillons testés. Cependant, 6 échantillons de cellules primaires de LCM semblent résistants à l'Ibrutinib. Pour tester si cibler le CSF1R peut être d'intérêt pour palier à cette résistance à l'Ibrutinib, les co-cultures entre les cellules primaires de LCM et les monocytes ont été traités avec l'inhibiteur spécifique du CSF1R, le GW2580. L'inhibition du CSF1R réduit efficacement la viabilité des cellules de LCM lors de co-culture avec les M ϕ LCM indépendamment de leur résistance à l'Ibrutinib. De plus, la combinaison de l'Ibrutinib et du GW2580 à des concentrations faibles induit un effet supra-additif pour les cellules de LCM sensibles à l'Ibrutinib lors des co-cultures.

In vivo, des concentrations élevées de CSF1 et d'IL-10 sont détectées dans le plasma de patients atteints de LCM au diagnostic comme à la rechute comparées à des donneurs sains. Nous montrons également que le marqueur M2 CD163 est surexprimé à la surface des monocytes circulants de patients de LCM comparés à des donneurs sains ce qui est cohérent avec les propriétés d'induction du CD163 par le CSF1 et l'IL-10. Pour les patients inclus dans un protocole clinique (NCT02558816), nous avons évalué les modulations d'IL-10 et de CSF1 dans le plasma ainsi que l'expression du CD163 sur les monocytes de 8 patients avant et après traitement avec l'anti-BTK, Ibrutinib. Nous observons une réduction des concentrations plasmatiques d'IL-10 et de CSF1 ainsi qu'une diminution de l'expression du CD163 sur les monocytes circulant pour 7/8 patients après 8 jours de traitement. Nous avons également réalisé un suivi longitudinal de 4 patients traités avec de l'Ibrutinib dont trois d'entre eux sont caractérisés par une baisse importante du CD163 après 8 jours de traitement. Cette baisse est durable dans le temps et associée à une réponse complète. En revanche, un patient dont le CD163 sur les monocytes circulants a augmenté après 8 jours de traitement a rapidement progressé sous traitement.

En conclusion, à travers une sécrétion de CSF1 et dans une moindre mesure d'IL-10, les cellules de LCM polarisent les monocytes en macrophages M ϕ LCM proches d'un phénotype de macrophages M2. En retour, les M ϕ LCM supportent la survie et la prolifération des cellules primaires de LCM. De plus, l'Ibrutinib altère le dialogue entre les deux types cellulaires en inhibant la production de CSF1 et donc la polarisation ainsi que la survie et la prolifération tumorales dépendantes des M ϕ LCM. Notre étude *in vivo* montrent que les modulations de l'IL-10, du CSF1 et du CD163 peuvent être des marqueurs précoces de réponse à l'Ibrutinib. Une plus large cohorte de patients est maintenant nécessaire pour confirmer ces observations préliminaires. De plus, cibler le CSF1R peut être une alternative à évaluer pour altérer le dialogue entre les cellules tumorales et son microenvironnement myéloïde particulièrement pour les patients résistants à l'Ibrutinib (**Figure 22**).

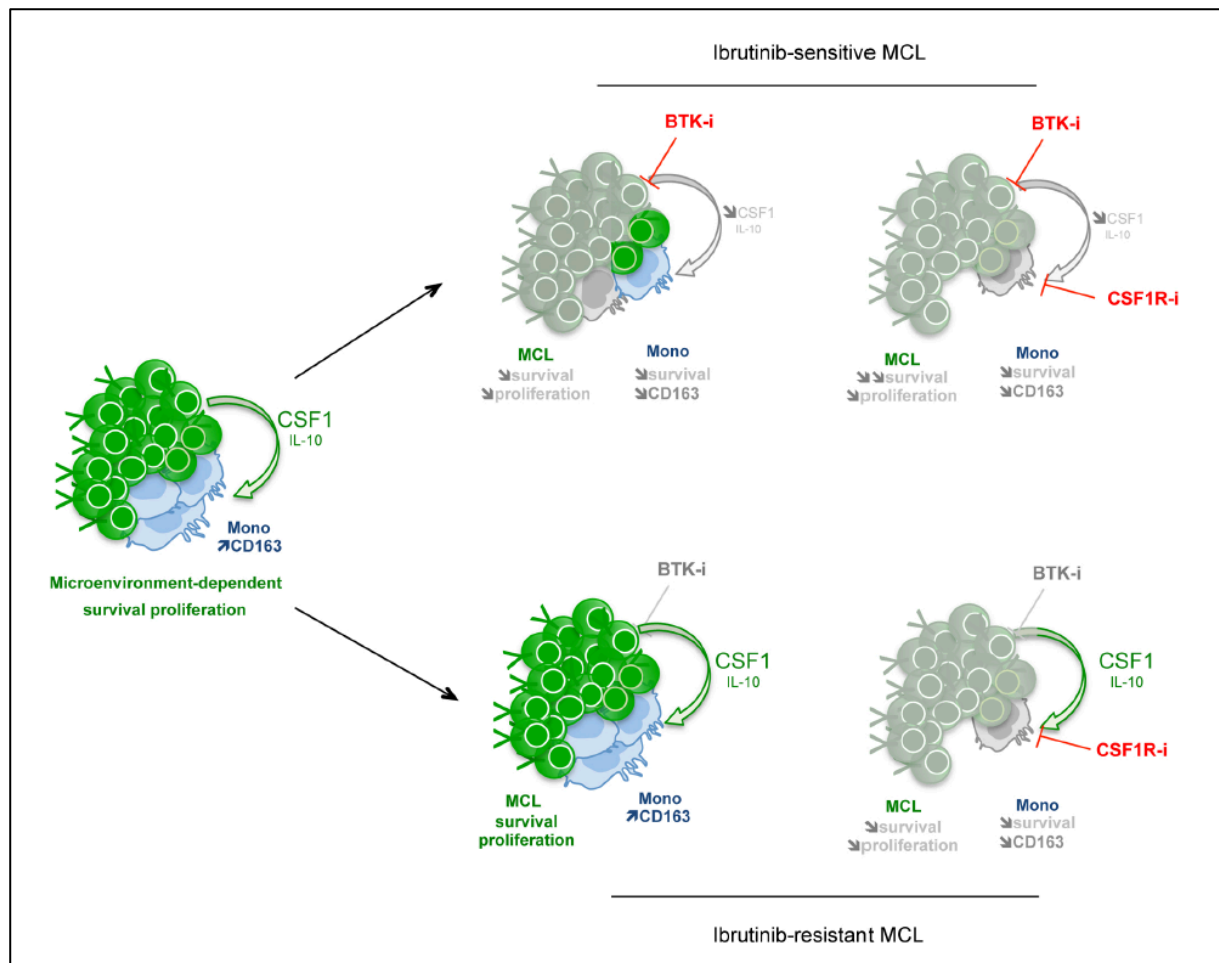


Figure 22 : Schéma bilan de l'étude. Les cellules de LCM produisent du CSF1 et de l'IL-10 qui polarisent les monocytes en macrophages CD163⁺. Chez les patients sensibles, l'ibrutinib inhibe les productions de CSF1 et d'IL-10 et en conséquence la polarisation des monocytes et la survie Mφ-LCM-dépendante des cellules tumorales. Chez les patients résistants, l'ibrutinib ne fait pas son effet mais le traitement avec un inhibiteur du CSF1R (GW2580) altère le dialogue entre les Mφ-LCM et les cellules tumorales et contrecarre la résistance à l'ibrutinib.

ARTICLE



Lymphoma

CSF1R and BTK inhibitions as novel strategies to disrupt the dialog between mantle cell lymphoma and macrophages

Antonin Papin^{1,2,3} · Benoit Tessoulin^{1,3,4} · Céline Bellanger^{1,2,3} · Anne Moreau^{3,5} · Yannick Le Bris^{1,3,6} · Hervé Maisonneuve^{3,7} · Philippe Moreau^{1,3,4} · Cyrille Touzeau^{1,3,4} · Martine Amiot^{1,2,3} · Catherine Pellat-Deceunynck^{1,2,3} · Steven Le Gouill^{1,3,4} · David Chiron^{1,2,3}

Received: 26 October 2018 / Revised: 18 March 2019 / Accepted: 19 March 2019
© Springer Nature Limited 2019

Abstract

The microenvironment strongly influences mantle cell lymphoma (MCL) survival, proliferation, and chemoresistance. However, little is known regarding the molecular characterization of lymphoma niches. Here, we focused on the interplay between MCL cells and the associated monocytes/macrophages. Using circulating MCL cells ($n = 58$), we showed that, through the secretion of CSF1 and, to a lesser extent, IL-10, MCL polarized monocytes into specific CD163⁺ M2-like macrophages (M ϕ MCL). In turn, M ϕ MCL favored lymphoma survival and proliferation *ex vivo*. We next demonstrated that BTK inhibition abrogated CSF1 and IL-10 production in MCL cells, leading to the inhibition of macrophage polarization and consequently resulting in the suppression of microenvironment-dependent MCL expansion. In vivo, we showed that CSF1 and IL-10 plasma concentrations were higher in MCL patients than in healthy donors, and that monocytes from MCL patients overexpressed CD163. Further analyses of serial samples from ibrutinib-treated patients ($n = 8$) highlighted a rapid decrease of CSF1, IL-10, and CD163 in responsive patients. Finally, we showed that targeting the CSF1R abrogated M ϕ MCL-dependent MCL survival, irrespective of their sensitivity to ibrutinib. These data reinforced the role of the microenvironment in lymphoma and suggested that macrophages are a potential target for developing novel therapeutic strategies in MCL.

These authors contributed equally: Benoit Tessoulin, Céline Bellanger, Steven Le Gouill, David Chiron

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41375-019-0463-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ David Chiron
david.chiron@univ-nantes.fr

¹ CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France

² GDR3697 Micronit, CNRS, Nantes, France

³ L'Héma-NexT, i-Site NexT, Nantes, France

⁴ Service d'Hématologie Clinique, Unité d'Investigation Clinique, CHU, Nantes, France

⁵ Service d'Anatomie Pathologique, CHU, Nantes, France

⁶ Service d'Hématologie Biologique, CHU, Nantes, France

⁷ Centre Hospitalier de la Roche sur Yon, La Roche sur Yon, France

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a rare and incurable B-cell malignancy, representing 3–10% of non-Hodgkin lymphomas (NHLs) [1, 2]. MCL cells are naive CD19⁺ IgM⁺ B cells characterized by the expression of the B1-cell marker CD5 and the absence of CD23 [3]. Conventional MCL cells initially accumulate in the lymph nodes (LN) and disseminate early on into the peripheral blood (PB) or the bone marrow [4]. In addition to the translocation t(11;14)(q13;q32), leading to the overexpression of cyclin D1, conventional MCL cells are characterized by the overexpression of the oncogene SOX11. A SOX11-negative leukemic non-nodal MCL subtype is now well characterized and displays a limited number of genomic alterations, indolent clinical course, spleen involvement, and a high percentage of circulating tumoral cells [5]. Both subtypes can evolve into more aggressive forms (blastoid/pleomorphic) characterized by increased genomic instability and a high proliferation index [5]. Several studies have described the nature of MCL genomic secondary alterations, such as frequent *ATM* or

TP53 mutations, as well as recurrent copy-number abnormalities and the deletion of *CDKN2A* or *TP53*, those being associated with a bad prognosis [6–8].

In addition to intrinsic tumoral abnormalities, the major role of the immune and stromal microenvironments in the expansion and chemoresistance of B-cell lymphomas is now widely accepted [9, 10]. MCL, one of the most aggressive B-cell lymphomas, does not escape this logic, and several studies have recently confirmed the role of the microenvironment in the survival, proliferation, and chemoresistance of this NHL [11–16]. Nevertheless, the composition of the MCL microenvironment and the resulting interactions that occur in the tumor niches remain largely unknown.

Among accessory cells, tumor-associated macrophages (TAM) are known to play a critical role in solid tumor progression [17, 18] and have also been described in several B-cell malignancies [19–22]. Previous studies suggested the presence of macrophages in MCL LN [23, 24], but their phenotype and the molecular dialog that occurs between MCL cells and the associated macrophages remain unknown.

In this work, we have studied the dynamic interactions between MCL and its myeloid microenvironment. Using primary coculture models *ex vivo*, we have demonstrated that primary MCL cells polarize monocytes into specific associated macrophages (M ϕ MCL), which support MCL growth and survival. Furthermore, we identified mechanism-based targeted strategies that disrupt the dialog between MCL and M ϕ MCL *ex vivo* and *in vivo*.

Methods

Culture and coculture of primary cells

Primary MCL cells were obtained after informed consent from patients according to protocols approved by local institutional review boards (REFRACT-LYMA cohort; ethical approval GNEGS-2015-09-13 [25]) and in accordance with the Declaration of Helsinki. Patients' characteristics are summarized in supplemental Table S1. Briefly, samples from 58 patients (69% male; median age, 70 years) were used in this study, 61% at diagnosis and representing the different subtypes of the disease (37 conventional, 10 blastoid/pleomorphic, and 9 leukemic non-nodal). PB MCL cells were isolated after Ficoll–Hypaque separation and stored in liquid nitrogen. PB MCL cells (median of circulating cells, 50%) were separated from other mononuclear cells using antihuman CD19-conjugated magnetic beads (Miltenyi, Paris, France) with purity >90%. For autologous cocultures, monocytes from patients were isolated using anti-CD14-conjugated magnetic beads

(Miltenyi, Paris, France). For allogeneic coculture experiments, PB primary monocytes from healthy donors (HD) were obtained by elutriation (CIC Biotherapy 0503, Nantes, France). For IL-10, CSF1 plasma concentrations, and CD163 expression on monocytes, PB was obtained from age-matched (>60 years) HD. Samples used for *in vitro* cocultures or molecular characterizations were listed in Table S1.

For *in vitro* generation of classically activated M1 and alternatively activated M2 macrophages, monocytes were differentiated with CSF2 (GM-CSF, 20 ng/mL, 5 days) or CSF1 (M-CSF, 50 ng/mL, 5 days) before activation with IFN γ (10 ng/mL, 2 days) or IL-10 (25 ng/mL, 2 days), respectively [26, 27].

CD19⁺ primary MCL cells were cultured at 10⁶ cells/mL alone or with monocytes or *in vitro* pre-differentiated macrophages at 2 × 10⁵ cells/mL (5:1 ratio). Transwell assays were realized with a 0.4- μ m pore polycarbonate membrane and 6.5 mm inserts (Corning, NY, USA). After cocultures, MCL cells were separated from macrophages by removal of non-adherent cells and identified using B-cell markers by flow cytometry (CD19, CD20). Adherent macrophages were detached using PBS–EDTA 0.02% (15 min at 4 °C). All cells were maintained in RPMI-1640 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum and 2 mM glutamine.

MCL cell lines

JeKo-1, MINO, REC-1, MAVER-1, and GRANTA-519 were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany) and Z138 from ATCC (Manassas, USA). UPN1 and SP53 were kindly provided by Dr. V. Ribrag (Institut Gustave Roussy Villejuif, France) and Pr. S. Chen-Kiang (Cornell University, NY), respectively. NTS-3 and NTS-4 have been generated in our laboratory (CRCINA) [12]. Cell lines are routinely identified using a flow cytometry-based barcode as previously described [28], as well as MHC class I sequencing and are tested for mycoplasma contamination. Values for MCL cell lines are the mean of at least three independent experiments.

Bioinformatics analysis

For mRNA relative expression level, CD19⁺ PB B cells from HD (normal B cell, NBC, *n* = 15), MCL cells (*n* = 183), and myeloid cells (monocytes, *n* = 6; M ϕ MCL, *n* = 4; M1, *n* = 3; M2, *n* = 5) datasets were collected from the GEO database (GSE50006, GSE19243, GSE35426, GSE16455, GSE36000, GSE21452, GSE70910, GSE76803, GSE28490, GSE124931, GSE95405, and GSE20484). In order to overcome data normalization biases, only Affimetrix Human Genome U133 Plus 2.0 series

with raw data were retained. Briefly, raw .CEL files were downloaded and processed in R-3.5.1 using the affy package, optical noise/background correction was performed by MAS5.0 or gcRMA with standard options, and expression batches were finally normalized by quantiles using the limma package [29, 30]. Principal component analysis (PCA) was performed by FactoMineR and factoextra packages. A hierarchical ascendant clustering was performed using Euclidean distances and Ward.D2 method. Heatmap and radarchart were carried out with the ComplexHeatmap and fmsb package, respectively.

For deconvolution analysis of tumor bulk gene expression data (LN MCL, $n = 161$, GSE16455, GSE93291, GSE16024, GSE36000, and GSE70910) we used the Cibersort program [31]. CD19⁺ sorted MCL cells from four LN (GSE70910) were used as an internal control for the deconvolution analysis.

Other methods

Cell cycle and viability assays as well as real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR, control gene *RPL37A*) and Immunoblot protocols have been previously described [15]. Antibodies and reagents are detailed in supplemental Table S2. Statistical analyses were performed using two-sided Mann–Whitney, Wilcoxon-matched pairs signed-rank, or *t*-tests as stated in the figure legends. Analyses were performed using GraphPad Prism and R statistical software and all tests were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Monocyte-derived macrophages support primary MCL cell survival and proliferation

Using a deconvolution algorithm for tumor bulk gene expression data [31], we first observed that MCL LN were characterized by macrophage infiltration (median, 12%, $n = 161$, Fig. S1A). CD68⁺ macrophages were also highlighted in MCL LN by IHC ($n = 10$), arguing for a potential dialog between MCL and its myeloid microenvironment in vivo (Fig. S1B).

To understand the potential role of this interplay, we first set up an ex vivo coculture of PB primary MCL cells (PB MCL cells) and monocytes isolated from HD. After 7 days of coculture, we observed that monocytes differentiated into adherent macrophages (Fig. S1C), which we called MCL-associated macrophages (M ϕ MCL) throughout this study. PB MCL cells poorly survived when cultured alone. In contrast, the presence of monocytes greatly improved their survival after 7 days ex vivo (median Annexin-V^{neg}, alone,

6.5%; coculture, 85.9%; $n = 17$; $p < 0.001$; Fig. 1a). The pro-survival advantage of the coculture, observed as early as 48 h, was maintained for several weeks and after several months of culture, the t(11;14) EBV^{neg} MCL cell line NTS-4 (from sample 2b) remained dependent on M ϕ MCL for survival (data not shown). Using culture inserts to avoid contact between the two cell types, we determined that the pro-survival impact of monocytes was partly dependent on soluble factors (median survival alone, 5%; coculture, 32.9%; $p < 0.001$; Fig. 1a). Indeed, whereas direct contact with monocytes induced a 13-fold increase of PB MCL cell survival, soluble factors supported a 6.5-fold survival increase (Fig. 1a).

We have previously shown that in contrast to lymph node MCL cells, circulating MCL cells rarely proliferate (Fig. S2A) [12]. Here, we have demonstrated that monocyte coculture supported the proliferation of primary MCL cells in 8/16 samples tested (median BrdU⁺ cells in coculture, 14.75%; Fig. 1b, S2B), confirming the microenvironment-dependent expansion of MCL cells. Of note, monocyte-dependent proliferation was significantly lower in leukemic non-nodal (light gray bars, $n = 5$) compared with conventional (dark gray bars, $n = 7$) or aggressive (black bars; $n = 4$) MCL subtypes ($p < 0.05$, Fig. 1b). This monocyte-dependent increase in proliferation was confirmed at the molecular level by the induction of *MKI67* expression and the inhibition of the tumor suppressor Rb (ratio phospho (p) Rb/Rb) (Fig. S2C, D). As observed for survival, cell cycle induction was, at least, partly dependent on soluble factors (Fig. S2E). Of note, autologous monocytes/MCL cocultures displayed similar results ($n = 4$, autologous vs. allogeneic coculture, $p > 0.35$, Fig. 1c).

M ϕ MCL are M2-like macrophages

In order to better characterize the interplay between MCL and its myeloid microenvironment, cocultures of PB MCL cells in contact with in vitro pre-differentiated, classically activated (M1), or alternatively activated (M2) macrophages were set up. Even though M1 macrophages display anti-tumoral activities in several models, both M1 and M2 macrophages provided a similar pro-survival benefit to PB MCL cells (Fig. S3A). As observed for monocytes, this protumoral effect was, at least, partly due to soluble factors (Fig. S3B), suggesting that both M1 and M2 macrophages secrete MCL pro-survival factors. Of note, M2 macrophages induced significantly more proliferation in PB MCL cells compared with M1 macrophages (median with M1 = 3%, with M2 = 9%, $p < 0.01$; Fig. S3C).

To define the precise nature of MCL-associated macrophages (M ϕ MCL), we analyzed their transcriptome along with the one of undifferentiated monocytes, M1 and M2 macrophages. To compare the different groups, we

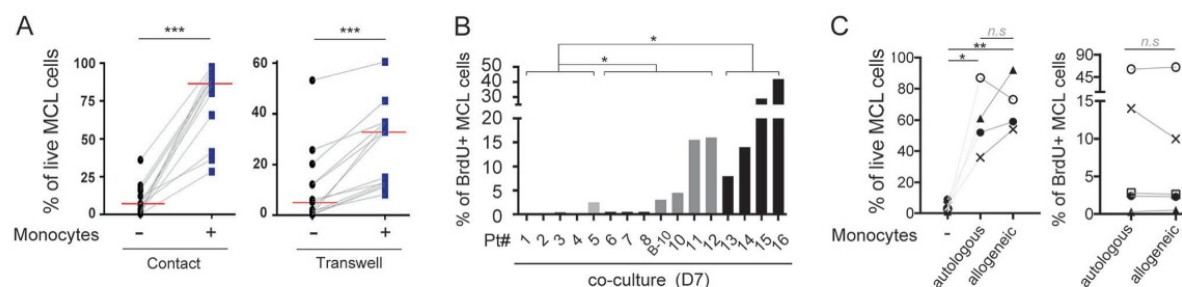


Fig. 1 Allogeneic and autologous monocytes support MCL cell survival and promote cell proliferation. **a** The percentage of PB MCL live cells was assessed by Annexin-V staining after 7 days of culture alone (–) or with allogeneic monocytes, either in contact ($n = 17$, left panel) or separated by transwell inserts ($n = 13$, right panel). Wilcoxon-matched pairs sign-rank test. *** $p < .001$. Red lines represent medians. **b** Cell cycle analysis (BrdU/PI) of PB MCL cells ($n = 16$) after 7 days

of cocultures with monocytes according to their molecular subtypes (light gray: leukemic non-nodal ($n = 5$), dark gray: conventional ($n = 7$), and black: aggressive ($n = 4$)). Mann–Whitney test. * $p < 0.05$. **c** Percentage of live cells (Annexin-V staining, $n = 4$, left panel) and cell cycle analysis (BrdU/PI, $n = 5$, right panel) of PB MCL cells cultured alone or in contact with autologous or allogeneic monocytes for 7 days. Paired t -test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

performed a PCA and observed that M ϕ MCL segregated with M2 macrophages (Fig. S4A). Accordingly, hierarchical clustering based on 17,256 genes highlighted greater similarities of M ϕ MCL with alternatively activated M2 macrophages (Fig. 2a).

Previously defined gene signatures allowed the robust prediction of monocytes, M1-like or M2-like phenotypes (Fig. S4B) [31]. It is noteworthy that ex vivo-generated M ϕ MCL and macrophages infiltrated in MCL LN in vivo displayed a similar CSF1-differentiated M2-like macrophage signature (Fig. 2b). In line with an M2-like profile, M ϕ MCL were characterized by the expression of the M2-like marker CD163, even though at a lower level than in vitro pre-differentiated M2 macrophages (Fig. 2c, S4C). M ϕ MCL arising from allogeneic or autologous CD14⁺ monocytes displayed a similar phenotype (Fig. S4C) and the presence of CD163⁺ cells was confirmed in MCL LN by IHC or cytometry (Fig. S4D–E).

Given the key role of soluble factors in M ϕ MCL/MCL interplay (Fig. 1), we analyzed the expression profile of genes coding for cytokines ($n = 24$) and chemokines ($n = 28$) in M ϕ MCL (Fig. S4F). Even though hierarchical clustering based on these 52 genes highlighted greater similarities with M2 macrophages (Fig. S4G), PCA demonstrated that M ϕ MCL formed a specific subtype of macrophages, producing both M2 and M1-associated factors (Fig. S4H). Among them, the expression of known pro-tumoral cytokines in MCL, such as IGF1, IL-10, and IL6 [32–34], were confirmed in additional M ϕ MCL samples ($n = 5$, Fig. 2c).

MCL cells secrete the M2-polarizing factors IL-10 and CSF1

To determine how primary MCL cells polarized monocytes into specific CD163⁺ M2-like M ϕ MCL, the expression of

known macrophage-polarizing factors [35] was analyzed. We first interrogated publicly available gene expression datasets and observed that *CSF1* and *IL-10* transcripts, in contrast to *CSF2*, *IL4*, *IL34*, or *IL13* (data not shown), were significantly overexpressed in MCL samples in vivo, when compared with normal B cells (NBC) (Fig. 3a). Of note, *CSF1* but not *IL-10* expression was significantly higher in MCL LN compared with MCL PB (Fig. S5A). To confirm that these soluble factors were indeed produced by MCL cells, we assessed their expression in MCL cell lines ($n = 9$) and purified PB MCL cells ($n = 20$) by RT-qPCR (Fig. 3b, c). Whereas only 3/9 cell lines (JeKo, Mino, Granta) co-expressed *CSF1* and *IL-10*, transcripts for both factors were detected in 19 out of 20 primary MCL samples. *CSF1*, but not *IL-10* mRNA, was significantly overexpressed in aggressive (blastoid/pleomorphic) MCL subtypes and correlated with proliferation in coculture ex vivo (BrdU⁺ cells in coculture) and in tissues in vivo (*MKI67*) (Fig. S5B–D). *IL-10* (7/10) and *CSF1* (7/10) expressions were then confirmed at the protein level in the MCL/M ϕ MCL coculture supernatant (D7), with all samples tested, secreting detectable amounts of at least one of both the factors (median CSF1, 4.35 pg/mL; median IL-10, 5.67 pg/mL) (Fig. 3d).

To understand the role of the CSF1 and IL-10 in the initiation of MCL/monocyte interplay, we cultured monocytes with previously generated MCL/monocyte coculture supernatants (7 days) in the presence of inhibitors of the CSF1R (GW2580 [36–38], blocking antibodies) or IL-10R (blocking antibodies). We demonstrated that inhibition of the CSF1R significantly reduced monocyte survival (median viability reduction of 80% with GW2580, of 44% with anti-CSF1R, $n = 6$, Fig. 3e). Inhibition of CSF1R with GW2580 significantly reduced the M2-like marker CD163 on the remaining viable monocytes (median CD163 reduction of 45%, $n = 5$) (Fig. 3e). Significant inhibition was also observed with anti-CSF1R monoclonal antibodies

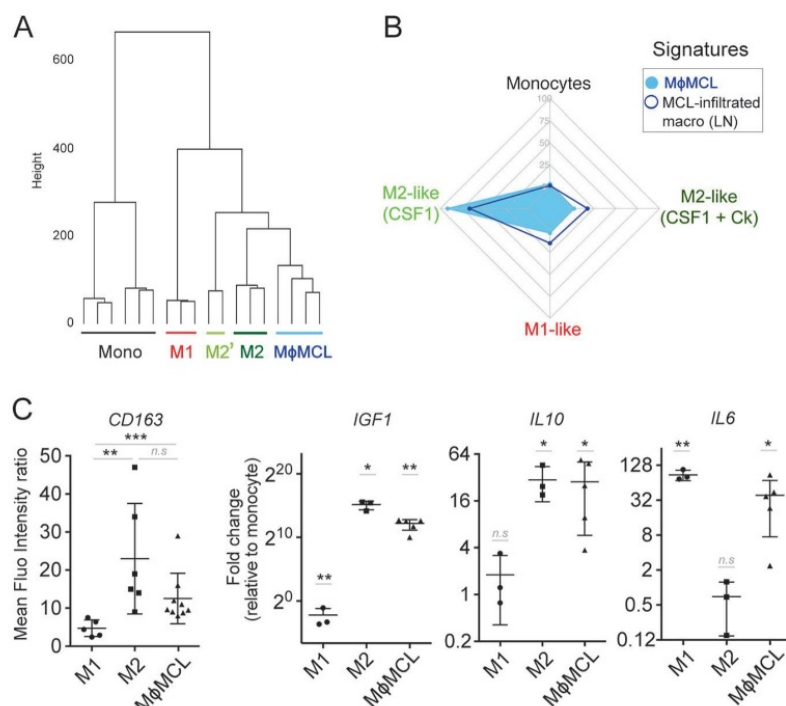


Fig. 2 MCL cells polarize monocytes into specific MφMCL with M2-like features. **a** An ascending hierarchical clustering was constructed with ward.D2 method of Euclidian distance. M2 macrophages were generated from human monocytes cultured with CSF1/IL-10 (see the section Methods), M2' with CSF1 alone (GSE20484), and M1 with LPS/IFN γ (GSE95405). **b** Radarchart representation of the cibersort signature for MφMCL and MCL-infiltrated macrophages in lymph

nodes. **c** (left panel) CD163 mean fluorescence intensity ratio assessed by flow cytometry for M1 ($n = 6$), M2 ($n = 6$), and MφMCL ($n = 9$) macrophages. Mann–Whitney test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (right panel) *IGF1*, *IL-10*, and *IL6* induction measured by qRT-PCR (relative to undifferentiated human monocytes) for M1 ($n = 3$), M2 ($n = 3$), and MφMCL ($n = 5$) macrophages. *t*-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

(median reduction of 28%, $n = 5$). Inhibition of IL-10R resulted in a slight, but not significant, reduction of the CD163 level on MφMCL (median reduction of 16%, $n = 5$, Fig. 3e). These data showed that MCL-secreted CSF1, but not IL-10, was essential for initiating the dialog between MCL and monocytes.

In addition to inhibiting monocyte survival and polarization, CSF1R neutralization resulted in the inhibition of monocyte-dependent survival in all primary MCL samples tested (Fig. 3f) (median monocyte-dependent survival reduction by GW2580 of 91%). Besides, we observed that CSF1R inhibition also resulted in an inhibition of primary MCL cells viability, as well as a downregulation of macrophage CD163 expression in coculture experiments with pre-differentiated MφMCL and M2, but not M1, macrophages (Fig. S6A).

In accordance with the absence of CSF1R expression on MCL cells (data not shown), GW2580 did not display any direct cytotoxicity on primary MCL cells (Fig. S6B), confirming that the loss of viability was the consequence of the inhibition of MCL/MφMCL interplay. In addition, CSF1R inhibition with other inhibitors such as BLZ945 [37], the

clinically available PLX3397 or anti-CSF1R mAb confirmed the results obtained with GW2580 (Fig. S6C).

Taken together, the results showed that MCL cells secrete the M2-polarizing factors IL-10 and CSF1, the latter being essential for the initiation of the pro-tumoral dialog between malignant B cells and the associated macrophages.

Ibrutinib disrupts the dialog with MφMCL by inhibiting MCL-specific CSF1 and IL-10 secretion

Previous studies reported modulations of the MCL secretome, including IL-10, upon BTK inhibition with ibrutinib, both in vitro [39] and in vivo [40]. To study the modulation of IL-10 and CSF1 upon ibrutinib treatment, Mino and Granta cell lines, which produce both factors, were first used (Fig. 3b). As previously reported [41], it was confirmed that, in contrast to Mino cells, Granta was resistant to both cytotoxic and cytostatic ibrutinib effects in vitro (0.5 μ M; data not shown). Both *CSF1* and *IL-10* mRNA were dramatically reduced after 72 h of ibrutinib treatment (0.5 μ M) in the ibrutinib-sensitive Mino cells, whereas no modulation was observed in the ibrutinib-resistant Granta

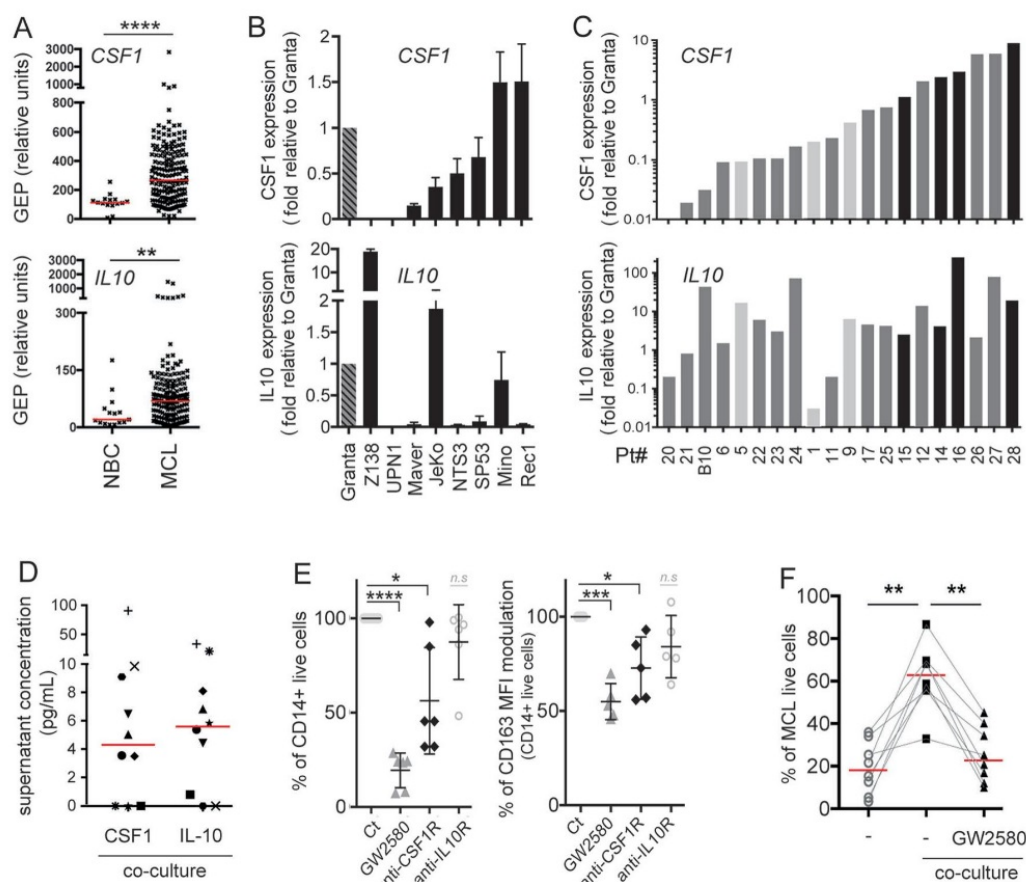


Fig. 3 MCL cells express the M2-polarizing factors CSF1 and IL-10. **a** Expression of *CSF1* and *IL-10* in MCL cells ($n = 183$) compared with normal B cells (NBC, $n = 15$) according to GEP public databases (see Methods). Mann–Whitney test. **** $p < 0.0001$; ** $p < 0.01$. **b** qRT-PCR analysis of *CSF1* and *IL-10* gene expression in nine MCL cell lines (realized in triplicate) and **c** 20 CD19⁺ MCL samples purified from PB. Expression was normalized to Granta cell line. **d** Concentration of CSF1 and IL-10 proteins evaluated by ELISA in the supernatant of M ϕ MCL/MCL coculture (7 days, $n = 10$). **e** Percentage

of live CD14 cells (left panel) and CD163 MFI modulation (on CD14 live cells) (right panel) after 3 days of culture with previously generated MCL/M ϕ MCL coculture supernatants ($n = 5$) in the presence of CSF1R inhibitors (GW2580 1 μ M, anti-CSF1R antibodies 5 μ g/mL), or of anti-IL-10R antibodies (5 μ g/mL). Paired t -test. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. **f** Percentage of primary MCL live cells in coculture with monocytes with or without GW2580 treatment (1 μ M) ($n = 8$). Cell death was assessed by Annexin-V staining. Wilcoxon-matched pairs sign-rank test. ** $p < .01$. Red lines represent medians

cells (Fig. 4a). These modulations were confirmed at the protein level using ELISA (Fig. 4b). Of note, we observed an induction of the CSF1 expression in cell lines with a low baseline level (UPN1, JeKo) after BCR activation upon anti-IgM stimulation, confirming that CSF1 is a direct target of the BCR signaling network (Fig. S7A).

In accordance with production of M2-polarizing factors, the coculture of both cell lines induced CD163 expression on PB primary monocytes from HD (Fig. 4c). As expected, ibrutinib inhibited the M2-like polarization exclusively with the ibrutinib-sensitive Mino cells (mean reduction of 43%, $n = 3$, Fig. 4c). Taken together, the results suggested that ibrutinib treatment counteracted CD163⁺ M ϕ MCL

polarization through inhibition of MCL-specific IL-10 and CSF1 secretion.

In addition to impairing M ϕ MCL polarization, ibrutinib treatment resulted in the inhibition of M ϕ MCL-dependent pro-survival and proliferative effects in 8 out of 14 and 4 out of 4 samples, respectively ($p < 0.01$) (Fig. 4d, e). Even though BCR signaling was constitutively activated, independently of monocyte coculture (Fig. S7B), ibrutinib did not induce any cytotoxicity in primary MCL cells cultured alone ex vivo (Fig. S7C). Besides, ibrutinib did not induce any cytotoxicity in monocytes/macrophages alone (data not shown). Thus, given that BCR inhibition abrogated MCL survival in coculture, it appears that ibrutinib acted mainly

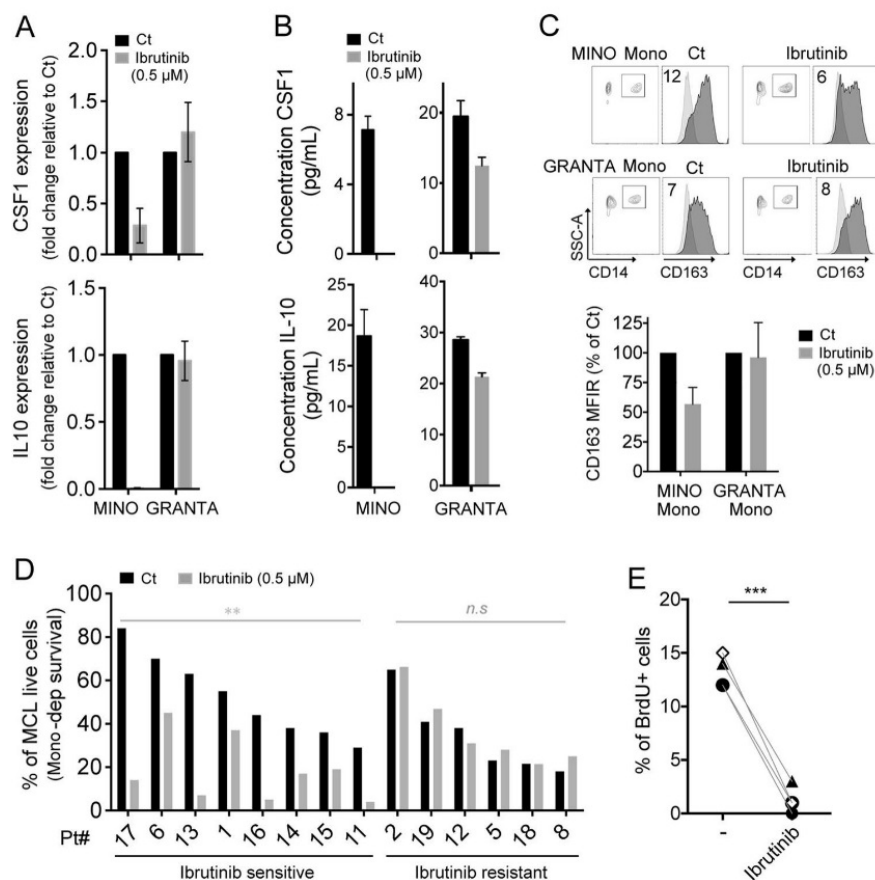


Fig. 4 Ibrutinib counteracts MCL/M ϕ MCL dialog through inhibition of CSF1. **a** qRT-PCR analysis of *CSF1* and *IL-10* expression in ibrutinib-sensitive Mino cells and ibrutinib-resistant Granta cells with or without ibrutinib treatment (72 h; 0.5 μ M). Gene expression has been normalized to the non-treated control condition of each cell line (realized in triplicate). **b** Concentration of CSF1 and IL-10 proteins evaluated by ELISA in the supernatant of Mino and Granta cells with or without ibrutinib treatment (72 h; 0.5 μ M; triplicate). **c** (upper panel) Gating strategy to evaluate the CD163 expression on CD14⁺ after

3 days of coculture between monocytes and Mino or Granta cells with or without ibrutinib treatment (72 h; 0.5 μ M). (lower panel) CD163 MFI modulation on CD14⁺ cells representing three independent experiments. **d** Percentage of primary MCL live cells in coculture with monocytes (Annexin-V staining) with or without ibrutinib treatment (72 h; 0.5 μ M; $n = 14$). Wilcoxon-matched pairs sign-rank test. ** $p < 0.01$, n.s. not significant. **e** Cell cycle analysis (BrdU/PI) of primary MCL cells after 5 days of cocultures with monocytes with or without ibrutinib treatment (72 h; 0.5 μ M; $n = 4$). Paired t -test. *** $p < 0.001$

through the disruption of the interplay between tumoral cells and M ϕ MCL.

Early in vivo CD163 modulation on PB monocytes is observed upon ibrutinib treatment of MCL patients

In accordance with the ability of primary MCL cells to produce CSF1 and IL-10, a significantly higher level of these M2-polarizing factors was detected in the plasma of MCL patients compared with age-matched HD (median HD IL-10, 0 pg/mL; CSF1, 0 pg/mL; $n = 9$; median MCL IL-10, 1.2 pg/mL; CSF1, 5.6 pg/mL; $n = 28$, Fig. 5a). Likewise, CD163 was overexpressed at the surface of CD14⁺ PB monocytes in several MCL samples compared with

HD (median CD163 MFIr HD = 4.3, $n = 8$; MCL = 7.5, $n = 32$, Fig. 5a), which was consistent with the CD163-inducing properties of CSF1 and IL-10. There was no significant correlation between the level of IL-10, CSF1 nor CD163 and the status of the disease (Diagnosis/Relapse).

We next evaluated IL-10 and CSF1 plasma concentrations, as well as CD163 expression on CD14⁺ PB monocytes in eight patients treated with anti-CD20 monoclonal antibody (Obinutuzumab) in combination with ibrutinib (protocol detailed in Fig. S8A). PB samples were collected before (D0) and after 8 days of treatment (D8). IL-10 or CSF1 concentration was decreased at D8 in 8/8 and 2/3 evaluable plasma samples, respectively (IL-10, $n = 8$, $p < 0.01$) (Fig. 5b). In addition, CD163 expression on

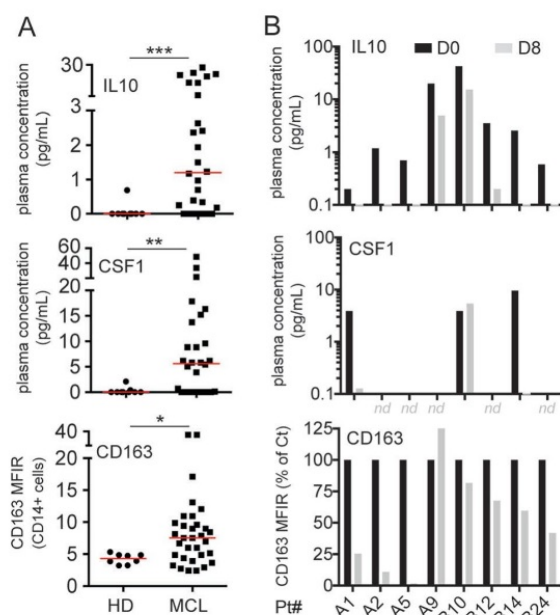


Fig. 5 CD163 modulation on circulating monocytes in vivo might be an early marker of ibrutinib response. **a** Plasma concentration of CSF1 and IL-10 proteins in MCL patients ($n = 28$) and age-matched healthy donors (HD, $n = 9$) by ELISA. (lower panel) Mean fluorescence intensity ratio (MFIR) of CD163 on circulating monocytes (CD14⁺ cells) in MCL patients ($n = 32$) compared with age-matched HD ($n = 8$). Mann–Whitney test. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. **b** Plasma concentration of CSF1 and IL-10 and CD163 MFIR modulation on monocytes (CD14⁺) of patients treated with anti-CD20 and ibrutinib (Clinical trial: NTC02558816). Biological parameters have been evaluated before treatment with ibrutinib and obinutuzumab (D0, black bars) and after 8 days of treatment (D8, gray bars). Variation of CD163 expression is normalized to D0 (% of D0)

CD14⁺ PB monocytes was decreased in seven out of eight patients at D8 (median CD163⁺ reduction of 58%, $n = 7$, $p < 0.05$, Fig. 5b). In contrast to ibrutinib (Fig. 4a), the anti-CD20 mAb Obinutuzumab did not directly modulate *IL-10* or *CSF1* in vitro (Fig. S8B).

The follow-up of patients treated with anti-CD20 mAb and ibrutinib for several cycles (Pt# A1, A2, A5, and A9) revealed that CD163 inhibition was durable and associated with a clinical response (>2 years) (Fig. S8C). In fact, whereas the three patients characterized by a dramatic reduction in CD163 at D8 (Pt# A1, A2, and A5) achieved a durable complete response, Pt# A9, who displayed an increase in CD163 expression and a limited decrease of IL-10 plasma concentration, progressed under treatment. Taken together, our retrospective analysis suggested that CD163 modulation upon ibrutinib treatment is associated with a clinical response. These results warrant further investigation with a larger cohort of ibrutinib-treated patients.

CSF1R inhibition as an alternative for disrupting MCL/M ϕ MCL dialog in ibrutinib-resistant patients

Ibrutinib did not efficiently counteract M ϕ MCL-dependent MCL survival in 6 out of 14 samples (Fig. 4d), including two patients who previously demonstrated ibrutinib resistance in vivo (Pt#2 and #12). To assess whether alternative strategies targeting the MCL/M ϕ MCL dialog could bypass ibrutinib resistance, the CSF1R inhibitor GW2580 was tested in both ibrutinib-sensitive (Pt#7, 11, 15, and 16) and resistant (Pt#2, 5, 18, and 19) primary cells. We showed that GW2580 reduced MCL cell viability in all samples tested, irrespective of their sensitivity to ibrutinib (Fig. 6a), suggesting that targeting the CSF1/CSF1R axis could be of major interest in ibrutinib-resistant patients. To assess whether the association of BTK and CSF1R inhibitors could also be beneficial for ibrutinib-sensitive patients, the efficacy of ibrutinib/GW2580 combination was tested at lower concentrations (125 nM). We showed additive (Pt#11 and #47) or supra-additive (Pt#7 and #15) effects of the combination in ibrutinib-sensitive samples ($n = 4$, $p < 0.05$, Fig. 6b, left) but not in ibrutinib-resistant samples ($n = 4$, Fig. 6b, right).

Discussion

Several studies have highlighted the central role of the microenvironment in the expansion and chemoresistance of B-cell lymphomas, including MCL [11–16, 42]. The few works that have examined the role of macrophages in MCL suggested a pro-tumoral function [23, 24], especially through the induction of a VEGF-dependent lymphangiogenesis [24]. However, little was known about the molecular interplay between MCL cells and the associated monocytes/macrophages. Here we showed that, through secretion of IL-10 and CSF1, MCL polarizes monocytes into M2-like macrophages, which in turn favor tumor survival and proliferation.

IL-10 production by MCL cells has been previously reported in vitro and in vivo [39, 40]. In contrast, this is, to our knowledge, the first study reporting a CSF1 paracrine loop in MCL. CSF1 and IL-10 are involved in monocyte polarization into alternatively activated M2-like TAM [43]. In addition, CSF1 and its receptor CSF1R are central to myeloid cell biology and promote migration, survival, and proliferation of monocytes [44]. It is noteworthy that both ex vivo-generated M ϕ MCL and in vivo MCL-infiltrated macrophages displayed a M2-like signature close to macrophages differentiated by the CSF1 (Fig. 2b, S4B), highlighting the relevance of our ex vivo coculture model and reinforcing the key role of the CSF1 in MCL/monocyte interplay.

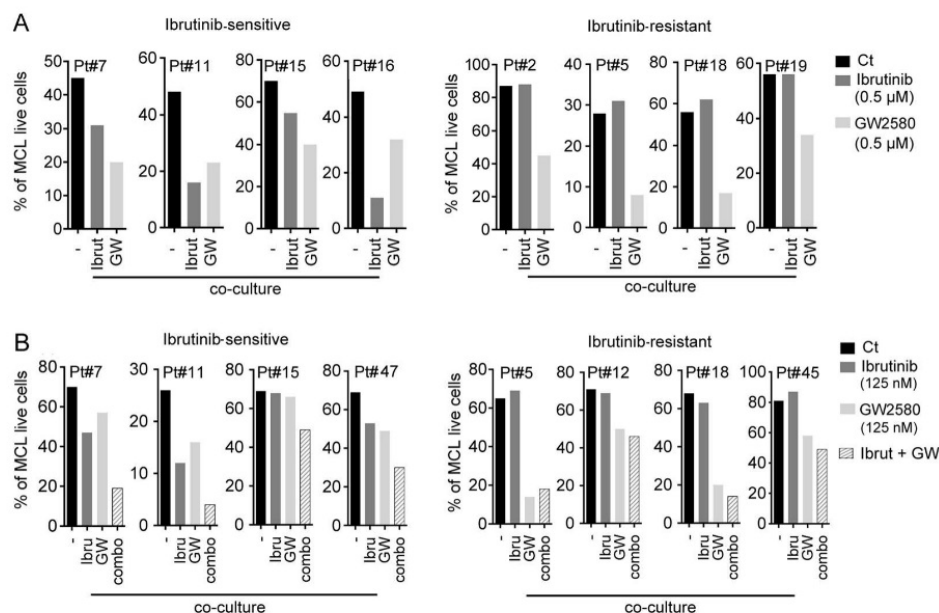


Fig. 6 CSF1R as a potential therapeutic target for ibuprofen-resistant patients. **a** Ibuprofen-sensitive (Pt#7, 11, 15, and 16) and ibuprofen-resistant (Pt#2, 5, 18, and 19) primary MCL cells were cocultured with monocytes and treated with ibuprofen (0.5 μM) or GW2580 (0.5 μM) for 72 h. **b** Ibuprofen-sensitive (Pt#7, 11, 15 and 47) and

ibuprofen-resistant (Pt#5, 12, 18 and 45) primary MCL cells were cocultured with monocytes and treated with low doses of ibuprofen (125 nM) or GW2580 (125 nM) or both for 72 h. Cell death was assessed by Annexin-V staining

CSF1 production has been reported in several solid tumor models and has been associated with a poor prognosis [45, 46]. Regarding B-cell malignancies, *CSF1* transcript overexpression correlated with chronic lymphocytic leukemia (CLL) progression; however, CSF1 protein was not detected in the plasma of CLL patients [47]. In our study, and using the same technology (ELISA), we detected a significant amount of CSF1 protein in 17 out of 28 MCL plasmas studied, highlighting a high production in MCL (Fig. 5). In addition, we showed that *CSF1* was more expressed in the most aggressive forms of MCL and was associated with primary MCL cells proliferation (BrdU⁺) ex vivo. This was reinforced by a positive correlation between *CSF1* and *MKI67* (proliferation index) expression in vivo (GEP analysis, $n = 183$) and suggested an association between MCL/MφMCL interplay and tumor aggressiveness (Fig. S5).

Even though transcriptome analysis showed that MCL-associated macrophages (MφMCL) shared more similarities with M2 macrophages (Fig. 2), MφMCL expressed both M1 and M2-associated soluble factors (Fig. S4F–H). This reflected the phenotypic and functional plasticity of macrophage polarization and suggested that additional factors to IL-10 and CSF-1 might be involved in MφMCL polarization. Besides soluble factors, cellular contacts might also play a role in MCL/MφMCL interplay. We observed that

MφMCL displayed a specific immune checkpoint profile and expressed both PD1 and PDL1 (Fig. S4F), suggesting that immune checkpoint inhibitors could be of interest as another therapeutic avenue in MCL.

Given the central role of the myeloid microenvironment in numerous solid and hematological malignancies, several targeted strategies are under investigation. Among them, the CSF2-dependent re-education of M2-like TAM into classically activated antitumoral M1 macrophages has been proposed in several models such as glioblastoma or multiple myeloma [48, 49]. However, based on our ex vivo data, M1 macrophages could also provide a pro-survival signal in MCL. The depletion of TAM using targeted therapies has therefore appeared to be more attractive in MCL. Accordingly, we demonstrated that targeting the CSF1R using the small molecule GW2580 efficiently counteracted MφMCL pro-tumoral effects ex vivo (Figs. 3 and 6). GW2580 is an orally bioavailable and selective CSF1R kinase inhibitor whose efficacy and selectivity have been previously demonstrated in different models [36–38, 50, 51]. In addition, potential off-target effects have been ruled out using other well-described selective small molecules, such as PLX3397 or BLZ945 as well as anti-CSF1R mAb. Success of such a strategy has been recently confirmed in vivo using clodrolip or anti-CSF1R mAb in a CLL mouse model [22]. In humans, several anti-CSF1R mAb

(LY3022855, Emaxtuzumab, AMG820) and CSF1R inhibitors (PLX3397, Pexidartinib) are currently being evaluated in phase I/II clinical studies that will soon document the efficacy of these targeted therapies [36].

In this study, we demonstrated that ibrutinib also directly counteracted the MCL/M ϕ MCL dialog through the modulation of the malignant B-cell secretome. We showed that BTK inhibition resulted in a dramatic decrease of CSF1 and IL-10 *ex vivo* and *in vivo*. Indeed, whereas higher levels of CSF1 and IL-10 were detected in the plasma of MCL compared with HD, ibrutinib treatment rapidly decreased the concentrations of both cytokines. Furthermore, CD163 was overexpressed at the surface of circulating monocytes in MCL compared with HD, which was consistent with the CD163-inducing properties of CSF1 and IL-10. Of interest, the longitudinal follow-up of four patients treated with ibrutinib highlighted a downregulation of CD163 on PB monocytes in three responsive patients *in vivo*. In contrast, only a limited modulation was observed in the resistant patient (Pt #A9). Taken together, our results are in favor of monitoring of CSF1, IL-10, and CD163 for the follow-up of patients' response to ibrutinib-based treatment. Even though a larger cohort of MCL patients treated with ibrutinib is now necessary to confirm the strength of this soluble and cellular signature, it is noteworthy that modulation of PB cytokines has also been associated with *in vivo* ibrutinib response in other B-cell malignancies [52].

Single-agent ibrutinib displayed an unprecedented clinical efficacy in MCL and is now approved for use in several B-cell malignancies. Nevertheless, several mechanisms of resistance such as mutation acquisition [53], compensatory pathway activation, *i.e.*, NF κ B [41], or kinome-adaptive reprogramming [42] have been described and retrospective studies revealed poor outcomes for ibrutinib relapsed/refractory MCL patients [54]. Here we showed that targeting the CSF1R could be an alternative for disrupting the MCL/M ϕ MCL pro-tumoral dialog, especially for ibrutinib-refractory patients for whom poor therapeutic alternatives are available. In addition, we observed (supra)additive cytotoxicity when BTK and CSF1R inhibitors were combined at low doses *ex vivo*, suggesting that this strategy could also be beneficial for ibrutinib-sensitive patients.

In conclusion, by modeling the dialog between MCL cells and their protective immune niches, we uncovered a novel rational combination that could overcome drug resistance. Our data reinforce the central role of the microenvironment in MCL and show that monocytes/macrophages are a potential target for developing novel therapeutic strategies in MCL.

Acknowledgements This study was supported by la Ligue Contre le Cancer Grand-Ouest, i-Site NexT (ANR-16-IDEX-0007), and the SIRIC ILIAD (INCa-DGOS-Inserm_12558). We thank Janssen-Cilag

and Roche for supporting in part this study. The authors thank Elise Douillard (CRCINA) for excellent technical expertise. BT is the recipient for a fellowship from Fondation ARC.

Author contributions AP designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the article. BT participated in bioinformatics analysis. CB performed experiments and participated in bioinformatics analysis. AM provided biopsy samples and analyzed data. YLB provided samples. HM provided samples. PM participated in the design of the study. CT provided samples. MA participated in the design of the study and reviewed the article. CPD participated in the design of the study, in the data analysis, and in the writing of the article. SLG participated in the design of the study, in the data analysis, and in the writing of the article. DC designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the article.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest SLG is a consultant/advisory board member and has received an honorarium from Roche and Janssen-Cilag. The remaining authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Campo E, Rule S. Mantle cell lymphoma: evolving management strategies. *Blood*. 2015;125:48–55.
2. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122:3416–23.
3. Weisenburger DD, Armitage JO. Mantle cell lymphoma—an entity comes of age. *Blood*. 1996;87:4483–94.
4. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127:2375–90.
5. Puente XS, Jares P, Campo E. Chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma: crossroads of genetic and microenvironment interactions. *Blood*. 2018;131:2283–96.
6. Delfau-Larue M-H, Klapper W, Berger F, Jardin F, Briere J, Salles G, et al. High-dose cytarabine does not overcome the adverse prognostic value of CDKN2A and TP53 deletions in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2015;126:604–11.
7. Beà S, Valdés-Mas R, Navarro A, Salaverria I, Martín-García D, Jares P, et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:18250–5.
8. Queirós AC, Beekman R, Vilarrosa-Blasi R, Duran-Ferrer M, Clot G, Merkel A, et al. Decoding the DNA methylome of mantle cell lymphoma in the light of the entire B cell lineage. *Cancer Cell*. 2016;30:806–21.
9. Burger JA, Gribben JG. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin Cancer Biol*. 2014;24:71–81.
10. Amé-Thomas P, Tarte K. The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin Cancer Biol*. 2014;24:23–32.
11. Papin A, Le Gouill S, Chiron D. Rationale for targeting tumor cells in their microenvironment for mantle cell lymphoma treatment. *Leuk Lymphoma*. 2017;59:1064–72.

12. Chiron D, Bellanger C, Papin A, Tessoulin B, Dousset C, Maiga S. Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma. *Blood*. 2016;128:2808–18.
13. Saba NS, Liu D, Herman SEM, Underbayev C, Tian X, Behrend D, et al. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF- κ B activation in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2016;128:82–92.
14. Chen Z, Teo AE, McCarty N. ROS-induced CXCR4 signaling regulates mantle cell lymphoma (MCL) cell survival and drug resistance in the bone marrow microenvironment via autophagy. *Clin Cancer Res*. 2016;22:187–99.
15. Chiron D, Dousset C, Brosseau C, Touzeau C, Maïga S, Moreau P, et al. Biological rationale for sequential targeting of Bruton tyrosine kinase and Bcl-2 to overcome CD40-induced ABT-199 resistance in mantle cell lymphoma. *Oncotarget*. 2015;6:8750–9.
16. Kurtova AV, Tamayo AT, Ford RJ, Burger JA. Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood*. 2009;113:4604–13.
17. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014;41:49–61.
18. Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141:39–51.
19. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010;362:875–85.
20. Amin R, Mourcin F, Uhel F, Pangault C, Ruminy P, Dupré L, et al. DC-SIGN-expressing macrophages trigger activation of mannoseylated IgM B-cell receptor in follicular lymphoma. *Blood*. 2015;126:1911–20.
21. Nguyen P-H, Fedorchenko O, Rosen N, Koch M, Barthel R, Winarski T, et al. LYN kinase in the tumor microenvironment is essential for the progression of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2016;30:610–22.
22. Galletti G, Scielzo C, Barbaglio F, Rodriguez TV, Riba M, Lazarevic D, et al. Targeting macrophages sensitizes chronic lymphocytic leukemia to apoptosis and inhibits disease progression. *Cell Rep*. 2016;14:1748–60.
23. Song K, Herzog BH, Sheng M, Fu J, McDaniel JM, Chen H, et al. Lenalidomide inhibits lymphangiogenesis in preclinical models of mantle cell lymphoma. *Cancer Res*. 2013;73:7254–64.
24. Pham LV, Vang MT, Tamayo AT, Lu G, Challagundla P, Jorgensen JL, et al. Involvement of tumor-associated macrophage activation in vitro during development of a novel mantle cell lymphoma cell line, PF-1, derived from a typical patient with relapsed disease. *Leuk Lymphoma*. 2015;56:186–93.
25. Hanf M, Chiron D, de Visme S, Touzeau C, Maisonneuve H, Jardel H, et al. The REFRACT-LYMA cohort study: a French observational prospective cohort study of patients with mantle cell lymphoma. *BMC Cancer* [Internet]. 2016;16:802. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5064959/>
26. Derlindati E, Dei Cas A, Montanini B, Spigoni V, Curella V, Aldigeri R, et al. Transcriptomic analysis of human polarized macrophages: more than one role of alternative activation? *PLoS One*. 2015;10:e0119751.
27. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41:14–20.
28. Maïga S, Brosseau C, Descamps G, Dousset C, Gomez-Bougie P, Chiron D, et al. A simple flow cytometry-based barcode for routine authentication of multiple myeloma and mantle cell lymphoma cell lines. *Cytometry A*. 2015;87:285–8.
29. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e47.
30. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy—analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*. 2004;20:307–15.
31. Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods*. 2015;12:453–7.
32. Vishwamitra D, Shi P, Wilson D, Manshoury R, Vega F, Schlette EJ, et al. Expression and effects of inhibition of type I insulin-like growth factor receptor tyrosine kinase in mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2011;96:871–80.
33. Baran-Marszak F, Boukhari M, Harel S, Laguillier C, Roger C, Gressin R, et al. Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2010;95:1865–72.
34. Zhang L, Yang J, Qian J, Li H, Romaguera JE, Kwak LW, et al. Role of the microenvironment in mantle cell lymphoma: IL-6 is an important survival factor for the tumor cells. *Blood*. 2012;120:3783–92.
35. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaili S-A, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233:6425–40.
36. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:399–416.
37. Yeh Y-M, Hsu S-J, Lin P-C, Hsu K-F, Wu P-Y, Su W-C, et al. The c.1085A>G genetic variant of CSF1R gene regulates tumor immunity by altering the proliferation, polarization, and function of macrophages. *Clin Cancer Res*. 2017;23:6021–30.
38. Edwards DK, Watanabe-Smith K, Rofelt A, Damernsawad A, Laderas T, Lamble A, et al. CSF1R inhibitors exhibit anti-tumor activity in acute myeloid leukemia by blocking paracrine signals from support cells. *Blood*. 2018;133:588–99.
39. Bernard S, Danglade D, Gardano L, Laguillier C, Lazarian G, Roger C, et al. Inhibitors of BCR signalling interrupt the survival signal mediated by the micro-environment in mantle cell lymphoma. *Int J Cancer*. 2015;136:2761–74.
40. Chang BY, Francesco M, De Rooij MFM, Magadala P, Steggerda SM, Huang MM, et al. Egress of CD19(+)CD5(+) cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients. *Blood*. 2013;122:2412–24.
41. Rahal R, Frick M, Romero R, Korn JM, Kridel R, Chan FC, et al. Pharmacological and genomic profiling identifies NF- κ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nat Med*. 2014;20:87–92.
42. Zhao X, Lwin T, Silva A, Shah B, Tao J, Fang B, et al. Unification of de novo and acquired ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. *Nat Commun*. 2017;8:14920.
43. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol*. 2012;33:119–26.
44. Hamilton JA, Cook AD, Tak PP. Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;16:53–70.
45. Ries CH, Cannarile MA, Hoves S, Benz J, Wartha K, Runza V, et al. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell*. 2014;25:846–59.
46. Zhu X-D, Zhang J-B, Zhuang P-Y, Zhu H-G, Zhang W, Xiong Y-Q, et al. High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008;26:2707–16.

47. Polk A, Lu Y, Wang T, Seymour E, Bailey NG, Singer JW, et al. Colony-stimulating factor-1 receptor is required for nurse-like cell survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2016;22:6118–28.
48. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med*. 2013;19:1264–72.
49. Gutiérrez-González A, Martínez-Moreno M, Samaniego R, Arellano-Sánchez N, Salinas-Muñoz L, Relloso M, et al. Evaluation of the potential therapeutic benefits of macrophage reprogramming in multiple myeloma. *Blood*. 2016;128:2241–52.
50. Moughon DL, He H, Schokrpur S, Jiang ZK, Yaqoob M, David J, et al. Macrophage blockade using CSF1R inhibitors reverses the vascular leakage underlying malignant ascites in late-stage epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*. 2015;75:4742–52.
51. Priceman SJ, Sung JL, Shaposhnik Z, Burton JB, Torres-Collado AX, Moughon DL, et al. Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood*. 2010;115:1461–71.
52. Chen JG, Liu X, Munshi M, Xu L, Tsakmaklis N, Demos MG, et al. BTKCys481Ser drives ibrutinib resistance via ERK1/2 and protects BTKwild-type MYD88-mutated cells by a paracrine mechanism. *Blood*. 2018;131:2047–59.
53. Chiron D, Di Liberto M, Martin P, Huang X, Sharman J, Bleuca P, et al. Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma. *Cancer Discov*. 2014;4:1022–35.
54. Martin P, Maddocks K, Leonard JP, Ruan J, Goy A, Wagner-Johnston N, et al. Postibrutinib outcomes in patients with mantle cell lymphoma. *Blood*. 2016;127:1559–63.

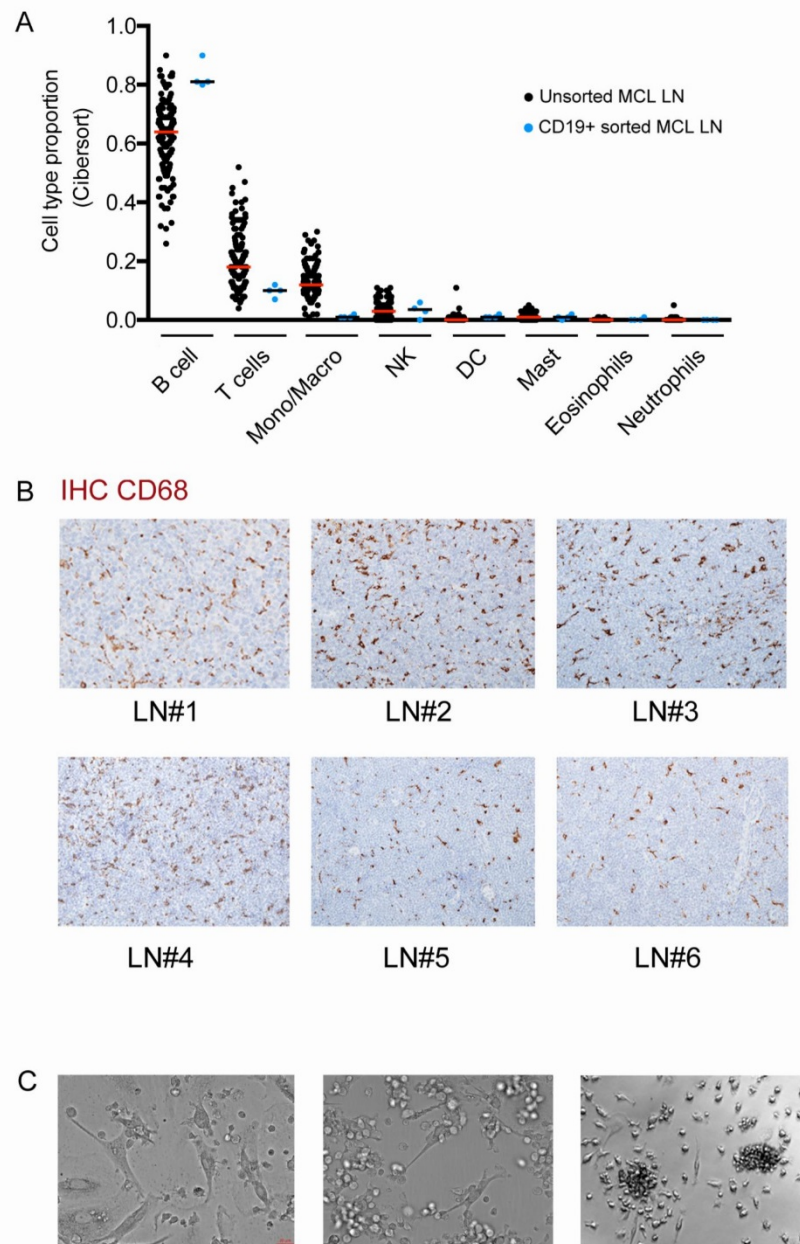


Figure S1. Macrophages associated to MCL in vivo and ex vivo.

(A) Deconvolution analysis of GEP data using the Cibersort algorithm to estimate the proportions of immune cells in lymph node biopsies of MCL patients (LN). CD19+ sorted MCL cells from 4 lymph nodes (LN) were used as an internal control for the deconvolution analysis. (B) Immunohistochemistry (IHC) CD68 of 6 lymph node biopsies from MCL patients at diagnosis. (C) Phase contrast microphotograph of allogeneic monocytes polarized into MφMCL after 7 days co-culture with primary MCL cells ex vivo.

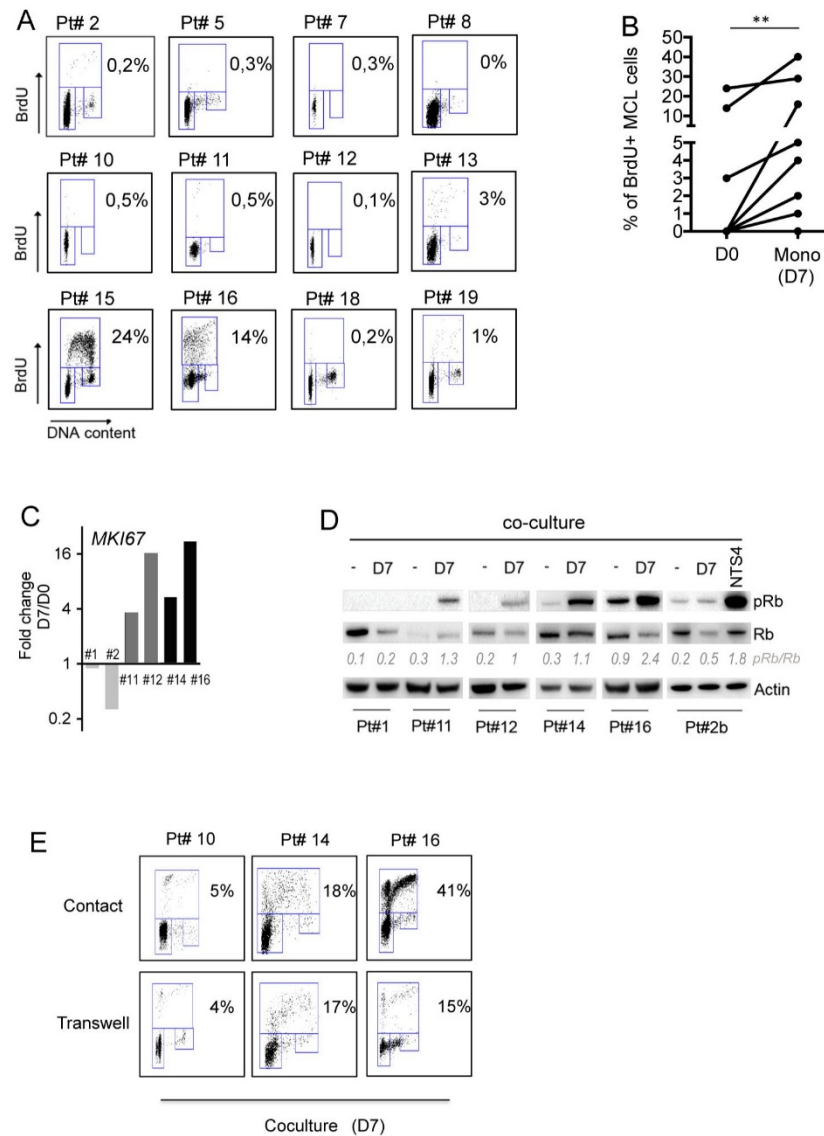


Figure S2. Monocytes promote MCL cell proliferation. (A) Cell cycle analysis (BrdU/PI) of primary MCL cells freshly isolated from the PB (n = 12). (B) Cell cycle analysis (BrdU/PI) of PB MCL cells before and after 7 days of co-culture with allogeneic monocytes (n = 8). Wilcoxon matched-pairs test. ** p < .01. (C) qRT-PCR analysis of MKI67 gene in PB MCL cells before (D0) and after 7 days (D7) of co-culture with monocytes (n = 6) (light grey: leukemic non-nodal, dark grey: conventional, black: aggressive). (D) Immunoblotting of phospho (p)Rb, Rb and Actin proteins in PB MCL cells (n = 6) before (-) and after (D7) co-culture with monocytes. NTS4 cell line arose from sample #2b after several months of ex vivo coculture. pRb/Rb ratio has been quantified using ImageJ. (E) Cell cycle Analysis (BrdU/PI) of PB MCL cells co-cultured with allogeneic monocytes for 7 days and separated or not by transwell inserts (n = 3).

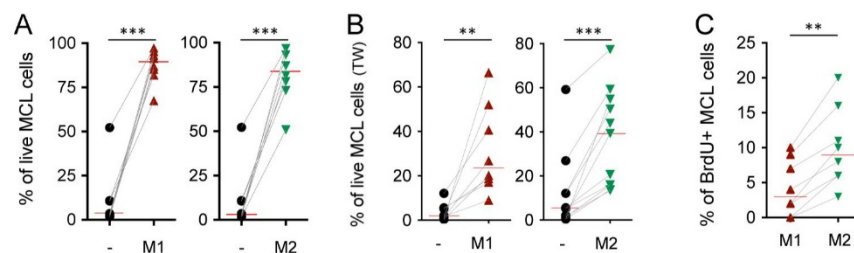


Figure S3. M1 and M2 macrophages secrete MCL pro-survival factors. (A) Percentage of viable PB MCL cells evaluated by Annexin-V staining after 7 days cultured alone (-) or in contact with M1 or M2 macrophages previously generated in vitro from healthy donor's monocytes as described in the Methods section (n = 8). (B) Percentage of viable PB MCL cells after 4 days of culture alone, with M1 (n = 8) or with M2 (n = 9) macrophages, using transwell inserts. (C) Cell cycle analysis (BrdU/PI) of PB MCL cells (n = 8) after 7 days of co-cultures with M1 or M2 macrophages. Wilcoxon matched pairs sign rank test. **p < .01 ***p < .001.

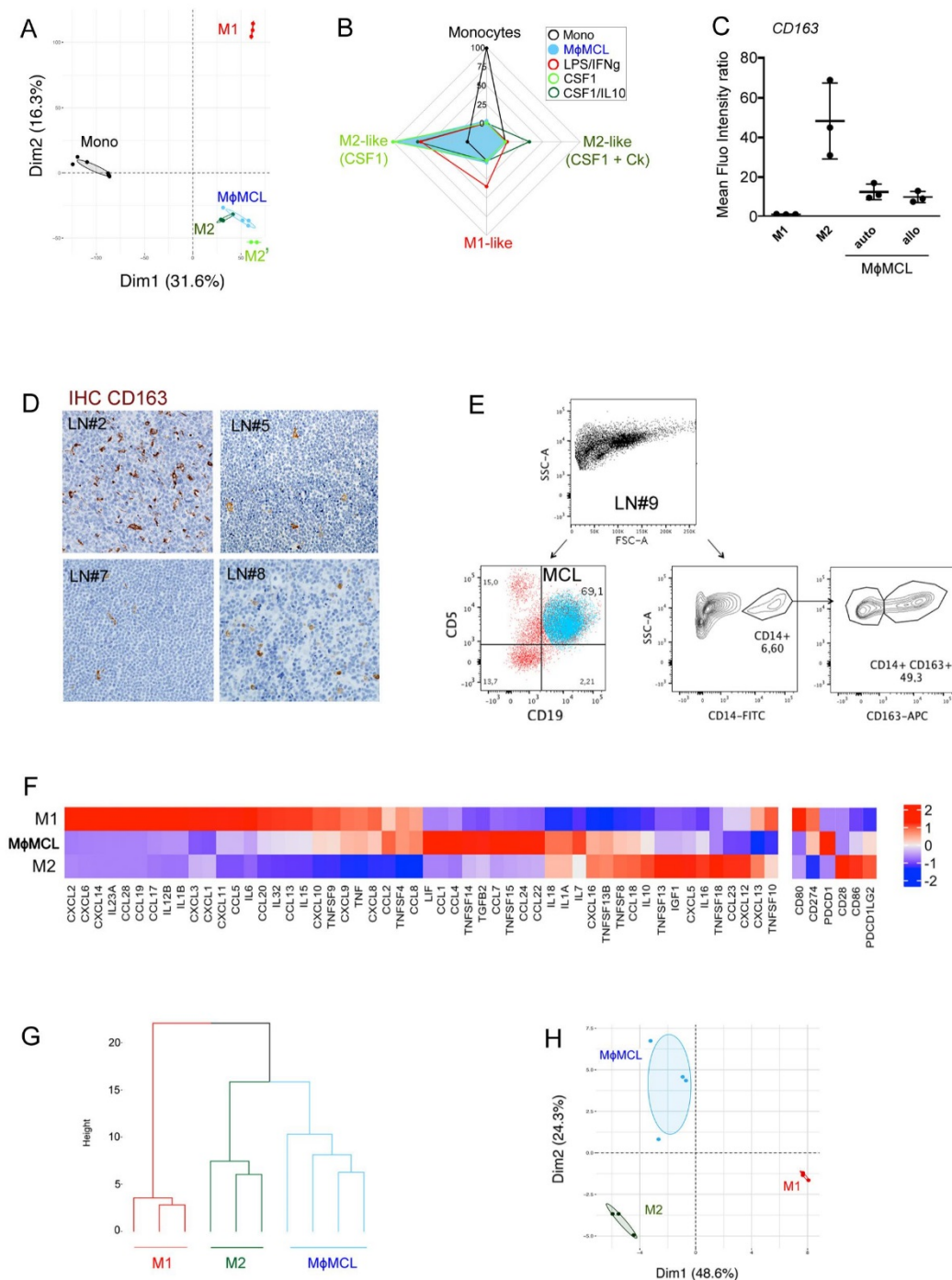


Figure S4. Ex vivo and in vivo characterization of MφMCL. (A) Representation of the corresponding individual factor map on plan of the 2 first principal dimensions (Dim 1 and Dim 2) of the Principal Component Analysis (PCA) on whole transcriptome (GEP, see methods). (B) Previously defined genes signatures allowed the robust prediction of monocytes (Mono), M1 (LPS/IFN γ) or M2 (CSF1 +/- IL-10) phenotypes. MφMCL profile is represented in a radar chart along with the different macrophages subtypes. (C) CD163 Mean Fluorescence Intensity ratio assessed by flow cytometry in M1, M2 and autologous or allogenic MφMCL. (D) Immunohistochemistry (IHC) CD163 of 4 lymph nodes biopsies from MCL patients at diagnosis. (E) Analysis of a freshly processed MCL lymph node biopsy at diagnosis by flow cytometry. MCL cells were identified with both CD19 and CD5 markers whereas MφMCL were identified according to CD14 and CD163 expressions. (F) Heat-map of soluble factors and immune checkpoints gene expression for M1 (n=3), M2 (n=3) and MφMCL (n=4). The colors indicate the intensity of the median gene expression as indicated. (G) An ascendant hierarchical clustering was constructed with ward.D2 method of Euclidian distance. (H) Representation of the corresponding individual factor map on plan of the 2 first principal dimensions (Dim 1 and Dim 2) of the PCA on selected genes coding for soluble factors.

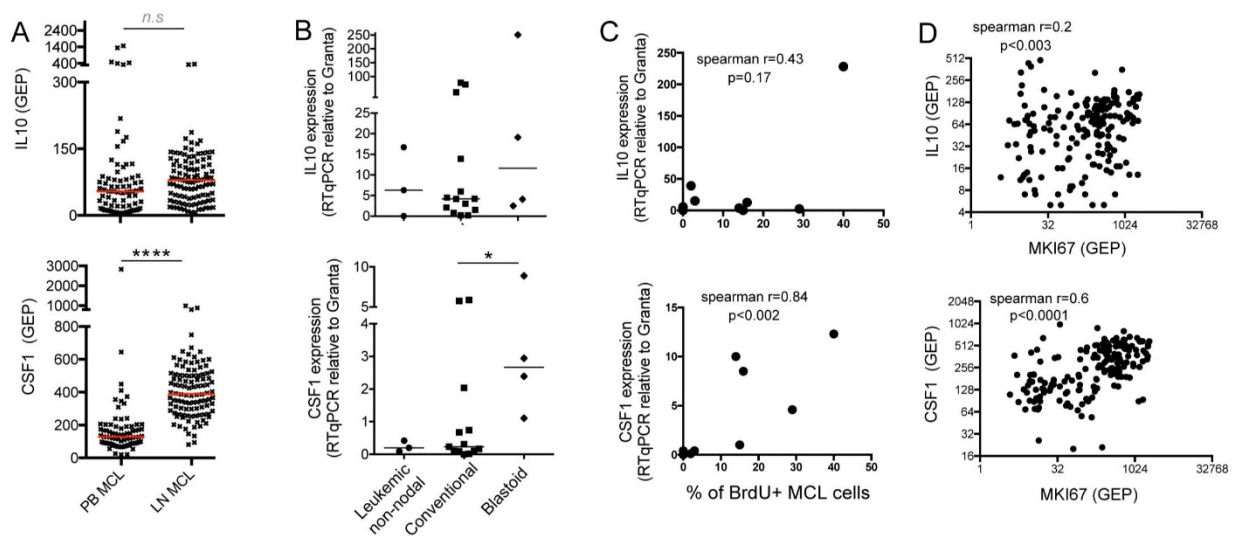


Figure S5. CSF1 expression is associated to MCL cell proliferation. (A) Expression of CSF1 and IL10 in PB MCL samples (n = 77) compared to LN MCL samples (n = 106) according to GEP public databases. t-test; **** p < .0001. (B) qRT-PCR analysis of CSF1 and IL10 gene expression of 19 PB MCL samples according to their subtype (leukemic non-nodal (n = 3), conventional (n = 12), blastoid (n = 4)). (C) Spearman correlations of CSF1 or IL10 expression assessed by qRT PCR and the percentage of BrdU+ MCL cells after 7 days of co-culture with allogeneic monocytes. (D) Spearman correlations of CSF1 or IL10 expression and MKI67 expression interrogated within GEP public database.

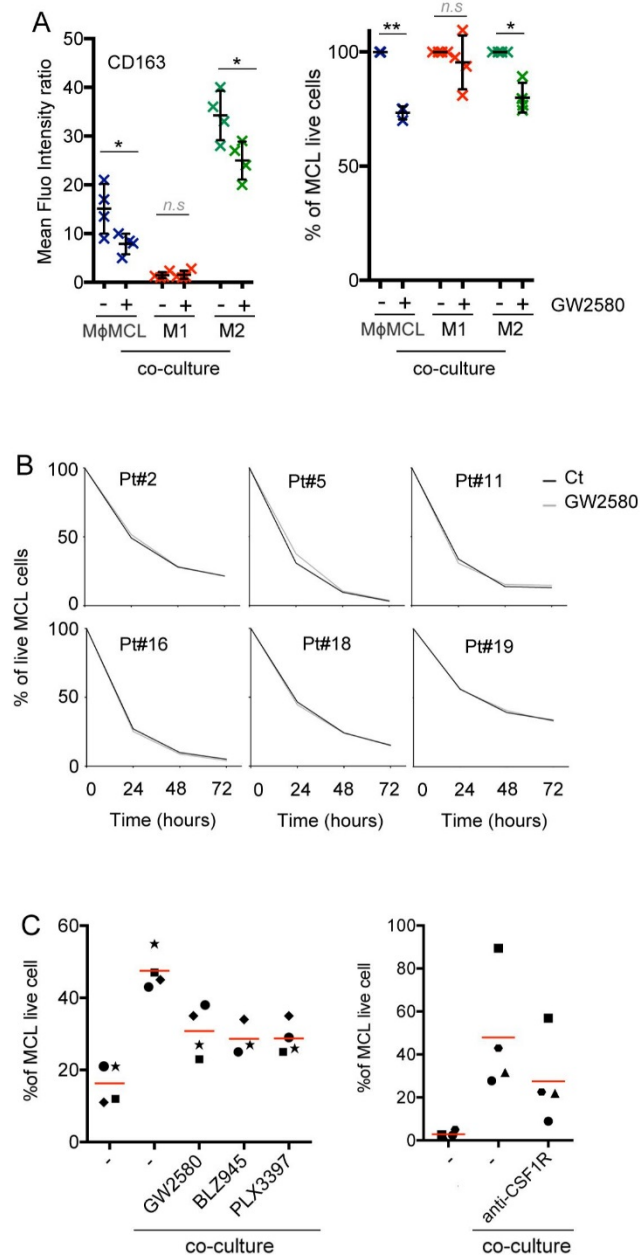


Figure S6. CSF1R inhibition is not directly cytotoxic for MCL but counteract MφMCL protection. (A) Flow cytometry analyses of (left panel) CD163 Mean Fluorescent Intensity ratio on MφMCL, M1 and M2 and (right panel) percentage of PB primary MCL live cells (Annexin V staining) after 10 days of co-culture, with or without the CSF1 inhibitor GW2580 for the last 3 days (0,5μM; n = 4). (B) Percentage of primary MCL live cells cultured with or without the CSF1 inhibitor GW2580 (1μM) for the indicated time (n = 6). (C) Percentage of primary MCL live cells cocultured with monocytes and with or without 0,5 μM of CSF1R-i (GW2580, BLZ945 or PLX3397) or anti-CSF1R antibodies (5μg/mL). Cell death was assessed by Annexin-V staining. Red lines represent medians.

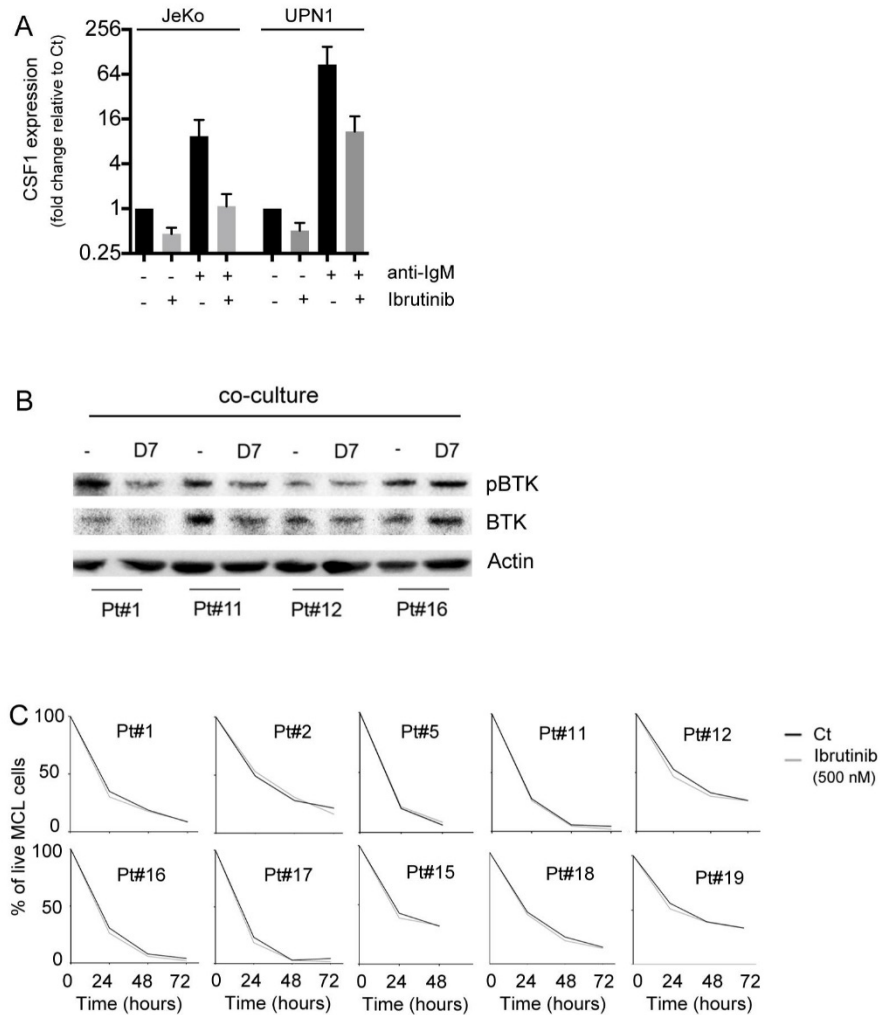


Figure S7. BTK inhibition is not directly cytotoxic for MCL primary cells but suppresses CSF1 expression. (A) CSF1 expression was measured by RT-qPCR in JeKo and UPN1 MCL cell lines cultured with anti-IgM (5 μ g/mL), ibrutinib (0.5 μ M) or both for 24h (B) Immunoblotting of phospho (p)BTK, BTK and Actin proteins in MCL primary cells freshly isolated from the PB (n = 4) or after 7 days (D7) of coculture with monocytes. (C) Percentage of viable primary MCL cells with or without ibrutinib treatment (0.5 μ M) for the time indicated (n = 10).

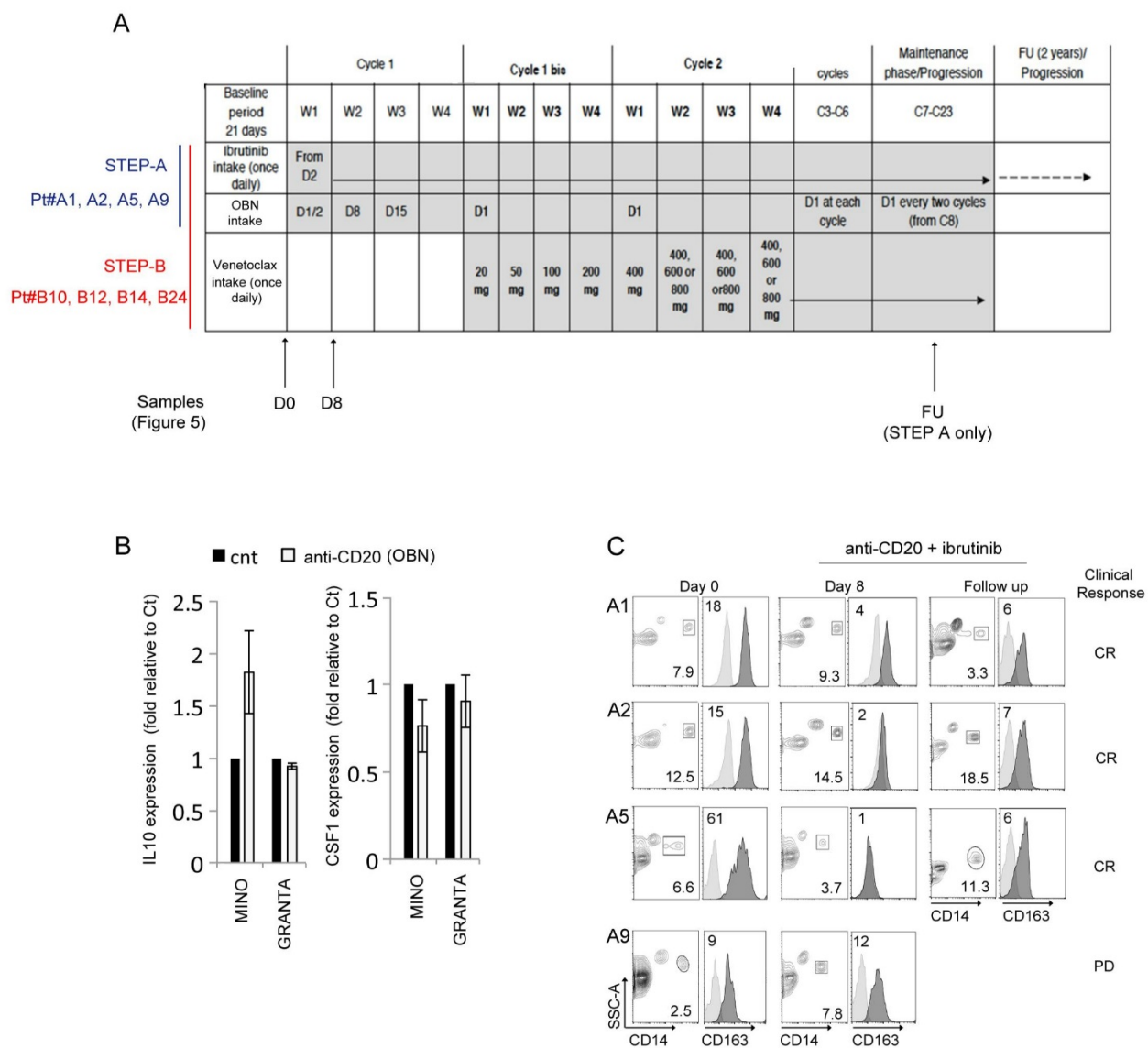


Figure S8. The anti-CD20 monoclonal antibody associated with ibrutinib in vivo does not directly modulate MCL secretome

(A) The trial NCT02558816 has been designed to assess the safety, tolerability and efficacy of the obinutuzumab/ibrutinib (step A) and obinutuzumab/ibrutinib/venetoclax (step B) combinations.

(B) qRT-PCR analysis of CSF1 and IL10 genes in Mino and Granta cells with or without obinutuzumab treatment (72h; 0.5µM). Gene expression has been normalized to the non-treated control condition of each cell line (realized in triplicate).

(C) Gating strategy on CD14+ cells for evaluation of CD163 expression (MFI) at different times of treatment associated to clinical response. Longitudinal follow-up of patients treated with anti-CD20 monoclonal antibody associated with ibrutinib (n = 4), CR: complete response, PD: progression disease.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de mes trois années de thèse, mes travaux apportent de nouveaux éléments dans la compréhension biologique du LCM et sur l'importance du microenvironnement immunitaire dans les hémopathies B matures pour la survie, la prolifération et la chemorésistance des cellules tumorales. Ces nouvelles connaissances sur les dialogues qui s'opèrent entre les cellules de LCM et les cellules du microenvironnement permettent d'apporter un rationnel biologique pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques en ciblant les cellules cancéreuses au sein de leur niche tumorale.

Nous avons mis en évidence le rôle des lymphocytes T, par l'intermédiaire de l'interaction CD40-CD40L, dans la survie et la prolifération des cellules tumorales. Cette prolifération des cellules de LCM peut être potentialisée par certains facteurs solubles (IL-6, IL-10, IGF1 et BAFF). La co-culture des cellules primaires de LCM issues du sang périphérique *ex vivo* dans le modèle « CD40L + cytokines » permet l'expansion des cellules sur le long terme, une activation de la voie NF- κ B et des modulations de la famille Bcl-2. Pour confirmer la pertinence dans notre modèle pour l'étude du microenvironnement, nous avons comparé le transcriptome des cellules primaires de LCM après 7 jours de co-culture *ex vivo* avec des cellules de LCM *in situ* dans les ganglions. Nous observons que plus de 65% des gènes induits *ex vivo* sont également induits dans les ganglions par rapport au sang périphérique. Notre modèle de co-culture des cellules primaires de LCM récapitule les signatures moléculaires caractéristiques des cellules tumorales dans les OLS comme le cycle cellulaire, la voie BCR ou NF- κ B. Une autre étude montre que l'activation des voies BCR et NF- κ B sont restreintes aux ganglions dans le LCM et conforte l'intérêt de notre modèle (Saba et al., 2016).

La production de facteurs solubles par les cellules tumorales est étroitement régulée par la voie BCR elle-même régulée par les niches tumorales (Bernard et al., 2015; Saba et al., 2016). En cohérence, l'analyse mettant en évidence les régulations communes entre les cellules de LCM dans notre modèle « CD40L + cytokines » et les cellules tumorales dans les ganglions *in vivo* montre une induction importante de nombreuses cytokines et chemokines par rapport aux cellules de LCM dans le sang périphérique. Dans les 30 premiers gènes communément induits se trouvent *IGF1*, *IL18*, *IL32*, *CXCL9*, *CXCL12*, *CXCL13* dont le rôle n'est pas toujours décrit dans le LCM et qui pourraient être mis en jeu dans la survie ou la prolifération des cellules tumorales (tout comme l'IGF1 ou le CXCL12) ou dans la polarisation des cellules du microenvironnement (Kurtova et al., 2009; Vishwamitra et al.,

2011) (**Figure 22**). Une analyse approfondie du sécrétome des cellules tumorales permettra l'identification des facteurs importants dans la biologie du LCM. De plus, le mode de sécrétion des différents médiateurs solubles est peu étudié. L'analyse de contenu des exosomes et des microvésicules produites par les cellules de LCM serait intéressante à réaliser (Hazan-Halevy et al., 2015).

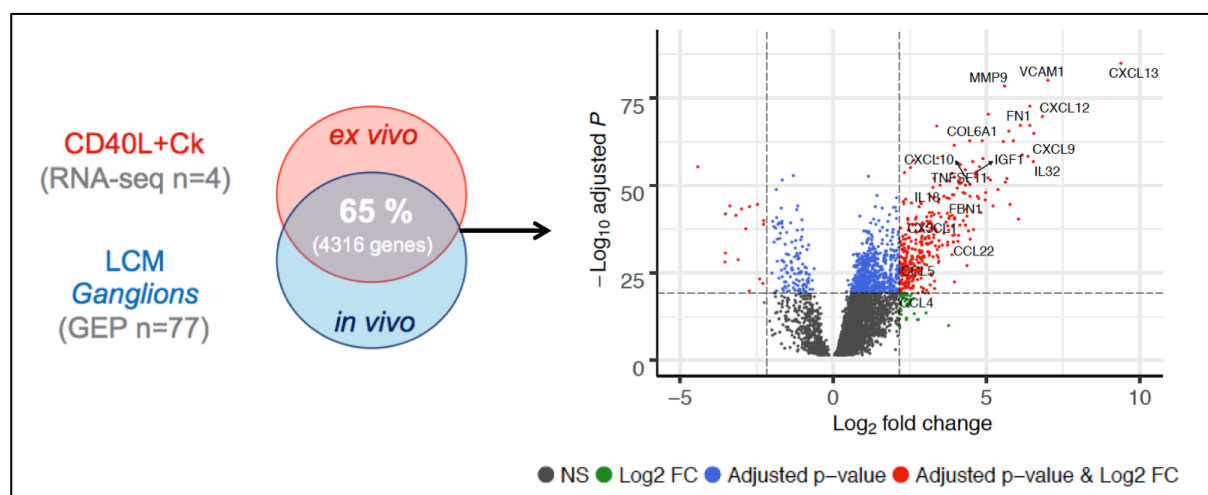


Figure 23 : La co-culture de cellules primaires de LCM dans le modèle « CD40L + cytokines » *ex vivo* mime le profil transcriptomique des cellules tumorales dans les ganglions *in vivo*. Plus de 65% des gènes induits par le modèle de co-culture « CD40L + cytokines » sont surexprimés dans les cellules primaires de LCM dans les ganglions par rapport au sang périphérique (Gauche). Volcanoplot des gènes induits par le microenvironnement dans les cellules primaires de LCM (Droite).

Nous montrons également que les cellules myéloïdes supportent la survie et la prolifération des cellules primaires de LCM et nos données suggèrent que le rôle protumoral des M ϕ LCM est au moins partiellement régi par des facteurs solubles, confirmant ainsi l'importance de ces médiateurs dans les dialogues qui s'opèrent au sein de la niche tumorale. L'analyse transcriptomique des M ϕ LCM montre qu'ils expriment de nombreux facteurs solubles anti-inflammatoires, tels que l'IL-10, ou pro-inflammatoires, tels que le TNF ou l'IL-6, mais également des facteurs solubles spécifiques aux M ϕ LCM tels que le LIF, l'INF γ ou encore le TNFSF14. Le rôle de ces facteurs solubles spécifiques des M ϕ LCM n'a pas encore été évalué dans le LCM. De plus, ce phénotype mixte anti/pro inflammatoire interroge sur les médiateurs mis en jeu dans la polarisation des M ϕ LCM. L'analyse du transcriptome des M ϕ LCM souligne également l'expression de facteurs solubles déjà décrits pour jouer un rôle protumoral dans le LCM comme l'IL-6, l'IL-10, le BAFF ou encore l'IGF1 (Fu et al., 2006; Baran-Marszak et al., 2010; Vishwamitra et al., 2011; Zhang et al., 2012). Ces cytokines

correspondent notamment aux facteurs solubles intégrés dans notre modèle de co-culture « CD40L + cytokines » mimant en partie le microenvironnement ganglionnaire. Ces observations suggèrent une complémentarité des différents acteurs de la niche tumorale pour promouvoir la survie, la prolifération et la chemorésistance des cellules de LCM. L'élaboration de modèles de culture 2D ou d'organoïdes comprenant les lymphocytes T, les macrophages et les cellules tumorales pourrait être d'intérêt pour étudier les dialogues entre les différentes cellules. Récemment, des modèles de culture de lymphocytes B naïfs en organoïdes ont été élaborés pour mimer les CG. Ces études confirment l'importance de l'interaction CD40L mais aussi de l'intégrine $\alpha\beta3$ dans la prolifération et la génération des lymphocytes B du CG (Purwada et al., 2015).

Ces modèles de culture 3D ont pour avantage non plus seulement d'étudier des dialogues bidirectionnels entre deux types cellulaires mais également d'interroger, par exemple, l'impact des macrophages sur les lymphocytes T et inversement. En effet, différentes études montrent l'importance de ces contacts entre macrophages et lymphocytes T notamment dans l'axe PD1/PDL1. Les inhibiteurs de checkpoints jouent un rôle majeur dans « l'épuisement » des lymphocytes T, pour une inhibition de la réponse cytotoxique, et dans l'inhibition des macrophages (Gordon et al., 2017). Nos données préliminaires au laboratoire montrent que les protéines PDL1 et PDL2 sont exprimées à la surface des cellules de LCM et dépendante de la signalisation CD40L, donc des signaux du microenvironnement et pourraient alors inhiber les lymphocytes T et les macrophages et ainsi échapper au système immunitaire. De plus, l'expression du PD1 est élevée sur les lymphocytes T infiltrés dans les lymphomes B (Xu-Monette et al., 2018). Dans le DLBCL, les macrophages dans les ganglions expriment fortement PDL1 et PDL2 et peuvent interagir avec les lymphocytes T pour un signal inhibiteur et nos données préliminaires montrent que les M ϕ LCM expriment PD1, PDL1 et PDL2, rendant possible ce mécanisme dans le LCM (Horlad et al., 2016). Ces observations supportent l'idée d'étudier plus largement les inhibiteurs de checkpoints dans le LCM. Les études en cours sur l'efficacité des anticorps anti-PD1 dans les lymphomes apporteront rapidement une idée de l'importance des inhibiteurs de checkpoints dans les hémopathies B (Goodman et al., 2017). Cependant, peu d'essais en cours concernent le LCM.

Dernièrement, l'efficacité thérapeutique d'un anti-CD47 a été mise en évidence dans les LNH (Advani et al., 2018). Le CD47 est une protéine exprimée par les cellules tumorales qui se lie à la protéine SIRP α sur les macrophages pour inhiber la phagocytose. Cette interaction n'a pas été étudiée dans le LCM et pourrait aussi être majeure dans l'échappement immunitaire des cellules de LCM au sein de leurs niches tumorales.

L'ensemble de nos travaux et de nos premières perspectives suggèrent un rôle protumoral des lymphocytes T des macrophages *in vitro* par des dialogues solubles et par des contacts cellulaires. Cependant seules quelques études montrent la présence de lymphocytes T dans les ganglions de patients atteints de LCM et leur caractérisation n'est pas complète. De plus, peu de travaux définissent le phénotype des M ϕ LCM (Yang et al., 2006; Nygren et al., 2014). Une définition plus exhaustive de la composition de la niche tumorale est nécessaire et pourra être documentée par l'essor du single cell RNA sequencing et notamment pour identifier le sécrétome des différents types cellulaires des ganglions. La disposition spatiale des différents types cellulaires ainsi que les contacts entre les cellules peuvent être évalués par des techniques d'IHC multiplex.

Nos travaux sur la compréhension des signaux du microenvironnement mis en jeu dans la survie, la prolifération et la chemorésistance des cellules de LCM permettent l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. La culture des cellules primaires de LCM dans le modèle « CD40L + cytokines » modifie l'expression des protéines de la famille Bcl-2 impliquée dans la survie et permet une chemorésistance des cellules tumorales à des agents de chimiothérapie tels que la bendamustine et à des thérapies ciblées comme à un BH3-mimétique, le Venetoclax. Notre étude montre que les cellules présentes dans le sang périphérique expriment un niveau élevé de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et sont donc sensibles au Venetoclax, alors que les cellules présentes dans les OLS sont résistantes au Venetoclax car elles expriment fortement la protéine anti-apoptotique Bcl-xL qui est un facteur de résistance. En parallèle, des études montrent que le traitement des patients avec l'Ibrutinib provoque une lymphocytose des cellules tumorales. En effet, l'Ibrutinib agit sur la voie BCR et empêche la rétention des cellules dans leur niche tumorale via une dérégulation de l'axe CXCR4. Dans le sang périphérique, les cellules tumorales ne sont plus en contact avec leur microenvironnement et ne surexpriment plus Bcl-xL mais Bcl-2 et sont ainsi sensibilisées au Venetoclax (Chang et al., 2013; Chiron et al., 2015; Furtado et al., 2015). Le Venetoclax et l'Ibrutinib montrent des efficacités prometteuses en agent seule dans le LCM et ces dernières observations apportent un rationnel à traiter les patients séquentiellement avec de l'Ibrutinib puis du Venetoclax (M. L. Wang et al., 2013; Davids et al., 2017).

Récemment, une étude montre l'efficacité de la combinaison séquentielle de l'Ibrutinib puis du Venetoclax dans le traitement des patients atteint de LCM réfractaires ou en rechute. L'étude inclut 24 patients et montre un taux de réponse globale de 71% avec 62% de réponses complètes et 8% de réponses partielles. La comparaison des patients répondeurs et non répondeurs montre que peu de critères clinicopathologiques sont associés à la réponse clinique excepté un fort index de prolifération Ki67 avant traitement qui corrèle avec

une mauvaise réponse (Tam et al., 2018). En revanche, l'étude du profil mutationnel des patients inclus dans ce protocole clinique montre que la résistance est significativement associée à des mutations ou des délétions du gène *SMARCA4*. Le gène *SMARCA4* code pour une protéine du complexe SWI-SNF qui joue un rôle de modificateur épigénétique et permet la régulation de certains gènes et notamment *ATF3*, un régulateur négatif de Bcl-xL. Effectivement, dans cette étude, les patients non répondeurs à la combinaison Ibrutinib plus Venetoclax ont une expression de Bcl-xL plus élevée que les patients répondeurs confirmant que cette protéine est un facteur de résistance au Venetoclax et plus largement à sa combinaison avec l'Ibrutinib (Agarwal et al., 2019). Une autre étude confirme le rôle de l'anti-apoptotique Bcl-xL dans la résistance à cette combinaison *in vitro* en utilisant un système de culture comparable à notre modèle « CD40L + cytokines » (Jayappa et al., 2017).

Pour pallier à cette résistance, nos travaux montrent que le traitement *in vitro* des cellules primaires de LCM avec l'anti-CD20 de nouvelle génération Obinutuzumab permet une diminution de l'expression de la protéine Bcl-xL contrairement au rituximab en accord avec sa cytotoxicité supérieure vis-à-vis des cellules tumorales (Heinrich et al., 2015). L'ensemble de ces données met en évidence un rationnel biologique pour l'utilisation de la triplette Obinutuzumab, Ibrutinib et Venetoclax dans le traitement des LCM (**Figure 23**). Cette combinaison est actuellement en cours d'évaluation, notamment localement, à l'occasion d'un essai clinique (NCT02558816) et les premiers résultats (9 patients) montrent un taux de réponse globale de 89% avec 78% de réponses complètes et 11% de réponses partielles.

Dans nos travaux, nous montrons que les facteurs polarisateurs des M ϕ LCM (CSF1 et IL-10) produits par les cellules tumorales sont régulés par la voie BCR et inhibés par un traitement à l'Ibrutinib pour les cellules sensibles et confirme l'importance de cette molécule dans le traitement du LCM. L'Ibrutinib est un progrès majeur dans le traitement du LCM et plus largement des hémopathies B. Ainsi beaucoup d'essais cliniques sont basés sur l'utilisation de cet inhibiteur du BTK. Cependant, des résistances sont observées et le traitement des patients résistants ou réfractaire à l'Ibrutinib est un vrai défi pour les années futures. Différents mécanismes sont décrits pour la résistance parmi lesquels l'acquisition d'une mutation BTK, une voie alterne de NF- κ B constitutivement active, ou encore l'acquisition *de novo* d'un kinome impliqués dans la résistance (Chiron et al., 2014; Rahal et al., 2014; Zhao et al., 2017). Nos résultats *in vitro* identifie le CSF1R comme une cible thérapeutique potentielle pour couper le dialogue entre les cellules tumorales et leur microenvironnement indépendamment de leur réponse à l'Ibrutinib. Cette stratégie pourrait donc être une alternative pour les patients résistants à l'Ibrutinib et pourrait être d'intérêt en combinaison pour les patients sensibles.

Le développement des thérapies ciblées tend vers une prise en charge individuelle des patients notamment en prenant en compte leur profil mutationnel ou transcriptionnel et nécessite l'élaboration de marqueurs prédictifs ou pronostiques de réponse. Nous avons mis en évidence l'importance des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL dans la réponse au Venetoclax dans le LCM. L'étude de l'équilibre dans les membres de la famille Bcl-2 dans les hémopathies B matures montre que les régulations de leur expression par le microenvironnement ne sont pas restreintes au LCM mais partagées avec différentes pathologies notamment le FL et le MZL. Nous avons établi que le ratio d'expression ($BCL2 + BCL2L1 + BAX$) / ($BCL2L1$) était prédictif de la réponse au Venetoclax dans les hémopathies B matures. La comparaison de ce ratio pour les cellules tumorales dans les OLS à celles dans le sang périphérique confirme une sensibilité moins importante des cellules tumorales dans les niches tumorales et pourraient être à l'origine des rechutes observées dans différentes hémopathies B. La prise en compte de ce ratio pourrait également être d'intérêt dans la décision thérapeutique pour un traitement au Venetoclax.

De plus, en concordance avec nos observations *in vitro*, nos résultats préliminaires *in vivo* montrent que les patients répondeurs à un traitement à l'ibrutinib diminuent leurs niveaux d'IL-10, de CSF1 ainsi que du marqueur M2 CD163 sur les monocytes circulants après 8 jours de traitement contrairement aux patients non répondeurs ou rechutant rapidement. Ces données sont très préliminaires et des analyses sur un nombre de patients plus important est nécessaire. La prise en compte des facteurs pronostics biologiques présentés ici permettra peut-être de prévenir les rechutes et proposer plus tôt de nouvelles alternatives thérapeutiques.

L'évaluation de la pertinence de combinaisons thérapeutiques notamment intégrant le microenvironnement et des marqueurs pronostiques de réponse aux traitements dans le LCM est limitée par l'absence de modèles précliniques pertinents disponibles. Dernièrement, le développement des PDX a été un premier pas pour évaluer l'efficacité des drogues ciblant directement les cellules tumorales. Dans l'idée de ne plus cibler uniquement les cellules tumorales uniquement mais également les cellules du microenvironnement, les PDX classiques ne sont pas pertinents et un modèle de souris plus complexe est à envisager. En effet, les PDX sont réalisés dans des souris NSG (Nod Scid Gamma) n'ayant pas de système immunitaire, rendant impossible l'étude du microenvironnement immunitaire et donc son impact. Il est possible d'humaniser des souris NSG avec des cellules CSH CD34⁺ puis de greffer les cellules du patient. Ce modèle a montré sa faisabilité dans certains modèles notamment dans la LLC (Bagnara et al., 2011). Cette étude montre d'ailleurs l'importance des lymphocytes T dans la prolifération tumorale par transfert de lymphocytes T autologues.

Cependant, ce modèle reste imparfait avec une incompatibilité entre le donneur de CSH CD34⁺ et les cellules primaires du patient pouvant provoquer une réaction de la greffe de cellules CD34⁺ contre les cellules tumorales (GVL). Une majorité des patients atteints de LCM est traitée par autogreffe avec une possible disponibilité de cellules CD34⁺. Pour pallier au problème de GVL, une solution consisterait à humaniser les souris NSG avec les CSH CD34⁺ du patient suivi d'une greffe des cellules tumorales du même patient. Ce modèle permettrait un modèle *in vivo* pertinent pour l'étude du microenvironnement tumoral dans le LCM mais aussi la disponibilité d'un modèle préclinique pour tester la tolérabilité et l'efficacité de combinaisons thérapeutiques notamment avec un ciblage du microenvironnement en plus de la tumeur.

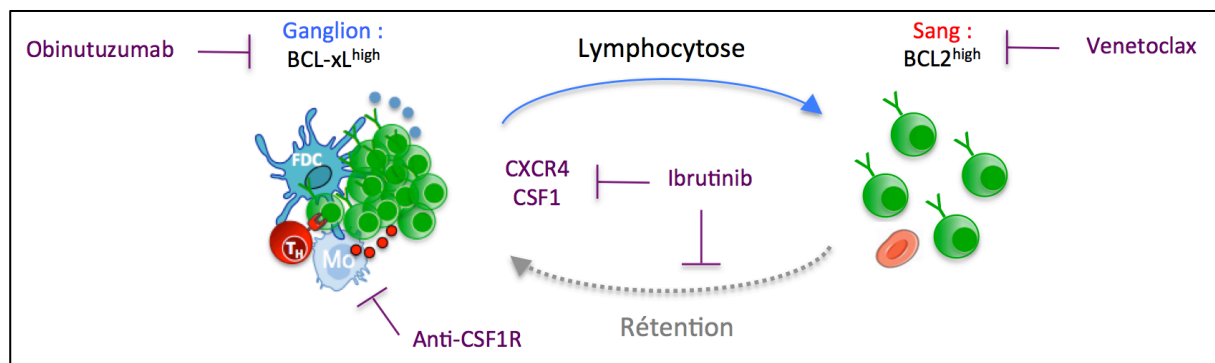


Figure 24 : Rationnel biologique des thérapies ciblées dans le traitement des LCM. Dans le sang périphérique, les cellules de LCM expriment fortement Bcl-2 alors qu'elles expriment Bcl-xL dans les ganglions. L'Ibrutinib provoque une sortie des cellules de LCM dans le sang périphérique et les sensibilise au Venetoclax. Bcl-xL est un facteur de résistance à la combinaison Ibrutinib/Venetoclax et peut être ciblé par l'anti CD20 de nouvelle génération Obinutuzumab. L'ibrutinib inhibe également l'expression du CSF1 pour altérer le dialogue entre les cellules tumorales et les macrophages. Les anti-CSF1R pourraient être une alternative thérapeutique pour les patients résistants à l'Ibrutinib.

ANNEXES

Durant ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à différents autres projets qui ont abouti à des publications en cours de soumission. Chaque projet est résumé et suivi de la première page de l'article.

Annexe 1 : Pannexin-1 Channels curbs the production of proinflammatory cytokines during necroptosis

Résumé : L'activation de la protéine MLKL pour « mixed lineage kinase-like », par le récepteur à la protéine kinase 3 (RIPK3) contrôle l'exécution de la nécroptose, une forme de nécrose qui se réalise dans des cellules déficientes pour l'apoptose. Les oligomères activés de MLKL engendrent l'exposition des résidus phosphatidylsérine à la surface cellulaire et altèrent l'intégrité de la membrane plasmique en formant des pores. MLKL contrôle également le trafic des endosomes et la biogénèse des petites vésicules extracellulaires ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires durant la phase précoce de la nécroptose. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas connus. Dans ce travail, nous montrons que les oligomères de MLKL activent les canaux Pannexine-1 (PANX1) concomitamment à la perte de l'asymétrie des phosphatidylsérines. Cette fragilité de la membrane plasmique nécessite la GTPase Rab27 qui régule le trafic intracellulaire des vésicules ainsi que leur recrutement et leur fusion à la membrane plasmique. Les cellules où la PANX1 est réprimée ou inhibée augmentent leur production de cytokines, notamment l'interleukine 8, indiquant que la PANX1 prend part au contrôle de l'inflammation. Nos données identifient pour la première fois une voie de signalisation commune entre MLKL, Rab27 et PANX1 et proposent des mécanismes moléculaires de l'inflammation associés à la nécroptose.

**Pannexin-1 Channels curbs the Production of proinflammatory
Cytokines during Necroptosis**

Tiphaine Douanne¹, Gwennan André-Grégoire^{1,2}, Kilian Trillet¹, An Thys¹, Antonin Papin^{1,3,4},
Magalie Feyeux⁵, Philippe Hulin⁵, David Chiron^{1,3,4}, Julie Gavard^{1,2}, Nicolas Bidère^{1,4,*}

¹CRCINA, INSERM, CNRS, Université de Nantes, Université d'Angers, IRS-UN blg, Room 405, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes, FRANCE; ²Institut de Cancérologie de l'Ouest, Site René Gauducheau, 44800 Saint-Herblain, FRANCE; ³GDR3697 Micronit, CNRS, Nantes, France; ⁴L'Héma-NexT, i-Site NexT, Nantes, France; ⁵MicroPICell Imaging Core Facility, SFR Santé F. Bonamy UMS016, INSERM, CNRS, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes, FRANCE

*Author for correspondence: nicolas.bidere@inserm.fr

ABSTRACT

The activation of mixed lineage kinase-like (MLKL) by receptor-interacting protein kinase-3 (RIPK3) controls the execution of necroptosis, a regulated form of necrosis that occurs in apoptosis-deficient conditions. Active oligomerized MLKL triggers the exposure of phosphatidylserine residues on the cell surface and disrupts the plasma membrane integrity by forming lytic pores. MLKL also governs endosomal trafficking and biogenesis and of small extracellular vesicles as well as the production of proinflammatory cytokines during the early steps of necroptosis, however the molecular basis continues to be elucidated. Here, we find that MLKL oligomers activate plasma membrane Pannexin-1 (PANX1) channels, concomitantly to the loss of phosphatidylserine asymmetry. This plasma membrane “leakiness” requires the Rab GTPase Rab27 isoforms, which regulate intracellular vesicle trafficking, docking and fusion with the plasma membrane. Cells, in which PANX1 is silenced or inhibited display enhanced production of cytokines such as interleukin-8, indicating that PANX1 may tamper with inflammation. These data identify a novel signaling nexus between MLKL, Rab27, and PANX1, and propose ways to interfere with inflammation associated with necroptosis.

Annexe 2 : High-resolution whole-genome copy number profiling reveals new prognostic bio-markers in the first line treatment mantle cell lymphoma (LyMa trial). A study by the LYSA group.

Résumé : Le lymphome à cellules du manteau est un lymphome non-hodgkinien caractérisé par la translocation t(11;14)(q13;q32). Les bio-marqueurs pronostiques qui prédisent la réponse des patients au diagnostic et qui permettent d'adapter les prises en charge thérapeutiques sont manquantes. Les échantillons de biopsies de ganglion au diagnostic de 100 patients de l'essai LyMa ont été sélectionnés pour l'analyse du génome entier par Oncoscan® SNAP-array. Cette technique permet d'interroger les modifications du nombre de copies (CNA) ainsi que la perte d'hétérozygotie. Les anomalies observées ont été testées pour leur pertinence pour prédire le devenir du patient et une cohorte de confirmation a été utilisée. Parmi les 47 CNA récurrentes identifiées, les plus fréquentes impliquent des gènes clés du cycle cellulaire et de la voie p53. Les délétions des régions 17p (TP53) et 9p (CDKN2A) sont plus fréquentes dans les patients réfractaires ou en rechute mais n'ont pas d'impact pronostique sur la survie. Des gains de la région 11q (CCND1) ont été observés et suggèrent des gains de la fusion CCND1/IG. Ces gains sont associés avec une mauvaise survie ce qui a été confirmé sur une autre cohorte. Inversement, un gain de la région 7p semble associé à un bon pronostic. En conclusion, les gains de la fusion CCND1/IG ainsi que du locus 7p apparaissent comme des bio-marqueurs potentiels prédictifs de la survie après une immunochemiothérapie de première ligne chez les patients jeunes de LCM.

High-resolution whole-genome copy number profiling reveals new prognostic biomarkers in the first line treatment mantle cell lymphoma (LyMa trial). A study by the LYSA group.

Y. Le Bris^{1,2}, F. Magrangeas², A. Moreau³, D. Chiron², C. Guérin-Charbonnel^{2,4}, O. Theisen¹, O. Pichon⁵, D. Canioni⁶, B. Burroni⁷, M. Tiab⁸, H. Maisonneuve⁸, C. Thieblemont⁹, L. Oberic¹⁰, K. Bouabdallah¹¹, E. Gyan¹², C. Pellat-Deceunynck², A. Papin², O. Hermine¹³, MH. Delfau-Larue¹⁴, B. Tessoulin^{2,15}, MC. Béné^{1,2}, L. Campion^{2,4}, S. Minvielle², S. Le Gouill^{2,15}

¹Hematology Biology Department, Nantes University Hospital, France, ²CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, France, ³Pathology Department Nantes University Hospital, ⁴Institut de Cancérologie de l'Ouest, U1232, ⁵Genetic Department, Nantes University Hospital, France, ⁶Pathology Department, Necker University Hospital, Paris, France, ⁷Pathology Department, Cochin University Hospital, Paris, France, ⁸Hematology Clinic, Centre Hospitalier Départemental de Vendée, La Roche sur Yon, France, ⁹Clinical Hematology Department, Saint Louis University Hospital, Paris, France, ¹⁰Clinical Hematology Department, IUCT Oncopole, Toulouse University Hospital, France, ¹¹Clinical Hematology Department, Bordeaux University Hospital, France, ¹²Clinical Hematology Department, Tours University Hospital, France, ¹³Clinical Hematology Department, Necker University Hospital, Paris, France, ¹⁴Immunology Department, Mondor University Hospital, Creteil, France, ¹⁵Clinical Hematology Department, Nantes University Hospital, France.

ABSTRACT

Mantle cell lymphoma (MCL) is a lymphoproliferative disorder characterized by the t(11;14)(q13;q32) translocation. Prognostic biomarkers that could predict the patients' response at diagnosis and allow to adapt therapeutic options are lacking. Lymph node biopsies sampled at diagnosis from 100 patients in the LyMa trial were selected for whole genome analysis using the Oncoscan® SNP-array. This allowed to investigate for copy number alterations (CNAs) and copy neutral loss of heterozygosity. The anomalies observed were tested for their relevance in outcome prediction and a confirmatory cohort was used. Among the 47 recurrent CNAs identified, the most frequent involved key genes of cell-cycle regulation and of the p53 pathway. Deletions of the 17p(TP53) and 9p(CDKN2A) regions were more frequent in refractory or early relapsing patients, but had no impact on survival. Gains of the 11q(CCDN1) region suggest gains of the CCND1/IG fusion. These gains were

associated to poor overall survival and this was confirmed by FISH analysis in a confirmatory cohort. Conversely, a gain in the 7p region was found to be associated with good outcomes. Gains of the CCND1/IG fusion and of the 7p locus appear to be potential new biomarkers predictive of survival after first line immunochemotherapy in young MCL patients.

REFERENCES

- Adams, C.M., Clark-Garvey, S., Porcu, P., Eischen, C.M., 2018. Targeting the Bcl-2 Family in B Cell Lymphoma. *Front Oncol* 8, 636. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00636>
- Adams, C.M., Mitra, R., Gong, J.Z., Eischen, C.M., 2017. Non-Hodgkin and Hodgkin Lymphomas Select for Overexpression of BCLW. *Clin. Cancer Res.* 23, 7119–7129. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1144>
- Adams, J.M., Cory, S., 2018. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death Differ* 25, 27–36. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.161>
- Advani, R., Flinn, I., Popplewell, L., Forero, A., Bartlett, N.L., Ghosh, N., Kline, J., Roschewski, M., LaCasce, A., Collins, G.P., Tran, T., Lynn, J., Chen, J.Y., Volkmer, J.-P., Agoram, B., Huang, J., Majeti, R., Weissman, I.L., Takimoto, C.H., Chao, M.P., Smith, S.M., 2018. CD47 Blockade by Hu5F9-G4 and Rituximab in Non-Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 379, 1711–1721. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1807315>
- Agarwal, B., Naresh, K.N., 2002. Bcl-2 family of proteins in indolent B-cell non-Hodgkin's lymphoma: study of 116 cases. *Am. J. Hematol.* 70, 278–282. <https://doi.org/10.1002/ajh.10139>
- Agarwal, R., Chan, Y.-C., Tam, C.S., Hunter, T., Vassiliadis, D., Teh, C.E., Thijssen, R., Yeh, P., Wong, S.Q., Ftouni, S., Lam, E.Y.N., Anderson, M.A., Pott, C., Gilan, O., Bell, C.C., Knezevic, K., Blombery, P., Rayeroux, K., Zordan, A., Li, J., Huang, D.C.S., Wall, M., Seymour, J.F., Gray, D.H.D., Roberts, A.W., Dawson, M.A., Dawson, S.-J., 2019. Dynamic molecular monitoring reveals that SWI-SNF mutations mediate resistance to ibrutinib plus venetoclax in mantle cell lymphoma. *Nat. Med.* 25, 119–129. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0243-z>
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J.I., Yang, L., Marti, G.E., Moore, T., Hudson, J., Lu, L., Lewis, D.B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W.C., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Armitage, J.O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M.R., Byrd, J.C., Botstein, D., Brown, P.O., Staudt, L.M., 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503–511. <https://doi.org/10.1038/35000501>
- Allende, M.L., Tuymetova, G., Lee, B.G., Bonifacino, E., Wu, Y.-P., Proia, R.L., 2010. S1P1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood. *J. Exp. Med.* 207, 1113–1124. <https://doi.org/10.1084/jem.20092210>
- Amé-Thomas, P., Hoeller, S., Artchounin, C., Misiak, J., Braza, M.S., Jean, R., Le Priol, J., Monvoisin, C., Martin, N., Gaulard, P., Tarte, K., 2015. CD10 delineates a subset of human IL-4 producing follicular helper T cells involved in the survival of follicular lymphoma B cells. *Blood* 125, 2381–2385. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-625152>
- Amé-Thomas, P., Tarte, K., 2014. The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin. Cancer Biol.* 24, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.08.001>
- Amin, R., Mourcin, F., Uhel, F., Pangault, C., Ruminy, P., Dupré, L., Guirriec, M., Marchand, T., Fest, T., Lamy, T., Tarte, K., 2015. DC-SIGN-expressing macrophages trigger activation of mannosylated IgM B-cell receptor in follicular lymphoma. *Blood* 126, 1911–1920. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-640912>
- Andersen, N.S., Larsen, J.K., Christiansen, J., Pedersen, L.B., Christophersen, N.S., Geisler, C.H., Jurlander, J., 2000. Soluble CD40 ligand induces selective proliferation of lymphoma cells in primary mantle cell lymphoma cell cultures. *Blood* 96, 2219–2225.

- Ansell, S.M., Lesokhin, A.M., Borrello, I., Halwani, A., Scott, E.C., Gutierrez, M., Schuster, S.J., Millenson, M.M., Cattry, D., Freeman, G.J., Rodig, S.J., Chapuy, B., Ligon, A.H., Zhu, L., Grosso, J.F., Kim, S.Y., Timmerman, J.M., Shipp, M.A., Armand, P., 2015. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 372, 311–319. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411087>
- Argatoff, L.H., Connors, J.M., Klasa, R.J., Horsman, D.E., Gascoyne, R.D., 1997. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 89, 2067–2078.
- Bagnara, D., Kaufman, M.S., Calissano, C., Marsilio, S., Patten, P.E.M., Simone, R., Chum, P., Yan, X.-J., Allen, S.L., Kolitz, J.E., Baskar, S., Rader, C., Mellstedt, H., Rabbani, H., Lee, A., Gregersen, P.K., Rai, K.R., Chiorazzi, N., 2011. A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease. *Blood* 117, 5463–5472. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-324210>
- Baran-Marszak, F., Boukhari, M., Harel, S., Laguillier, C., Roger, C., Gressin, R., Martin, A., Fagard, R., Varin-Blank, N., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Ledoux, D., 2010. Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. *Haematologica* 95, 1865–1872. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.019745>
- Bartek, J., Lukas, J., 2011. DNA repair: Cyclin D1 multitasks. *Nature* 474, 171–172. <https://doi.org/10.1038/474171a>
- Basso, K., Dalla-Favera, R., 2015. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 172–184. <https://doi.org/10.1038/nri3814>
- Batista, F.D., Harwood, N.E., 2009. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 15–27. <https://doi.org/10.1038/nri2454>
- Beà, S., Valdés-Mas, R., Navarro, A., Salaverria, I., Martín-García, D., Jares, P., Giné, E., Pinyol, M., Royo, C., Nadeu, F., Conde, L., Juan, M., Clot, G., Vizán, P., Di Croce, L., Puente, D.A., López-Guerra, M., Moros, A., Roue, G., Aymerich, M., Villamor, N., Colomo, L., Martínez, A., Valera, A., Martín-Subero, J.I., Amador, V., Hernández, L., Rozman, M., Enjuanes, A., Forcada, P., Muntañola, A., Hartmann, E.M., Calasanz, M.J., Rosenwald, A., Ott, G., Hernández-Rivas, J.M., Klapper, W., Siebert, R., Wiestner, A., Wilson, W.H., Colomer, D., López-Guillermo, A., López-Otín, C., Puente, X.S., Campo, E., 2013. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 18250–18255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314608110>
- Beck, T.C., Gomes, A.C., Cyster, J.G., Pereira, J.P., 2014. CXCR4 and a cell-extrinsic mechanism control immature B lymphocyte egress from bone marrow. *J. Exp. Med.* 211, 2567–2581. <https://doi.org/10.1084/jem.20140457>
- Benson, M.J., Dillon, S.R., Castigli, E., Geha, R.S., Xu, S., Lam, K.-P., Noelle, R.J., 2008. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J. Immunol.* 180, 3655–3659. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.3655>
- Bergsland, M., Werme, M., Malewicz, M., Perlmann, T., Muhr, J., 2006. The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. *Genes Dev.* 20, 3475–3486. <https://doi.org/10.1101/gad.403406>
- Bernard, S., Danglade, D., Gardano, L., Laguillier, C., Lazarian, G., Roger, C., Thieblemont, C., Marzec, J., Gribben, J., Cymbalista, F., Varin-Blank, N., Ledoux, D., Baran-Marszak, F., 2015. Inhibitors of BCR signalling interrupt the survival signal mediated by the micro-environment in mantle cell lymphoma. *Int. J. Cancer* 136, 2761–2774. <https://doi.org/10.1002/ijc.29326>
- Bhatt, S., Matthews, J., Parvin, S., Sarosiek, K.A., Zhao, D., Jiang, X., Isik, E., Letai, A., Lossos, I.S., 2015. Direct and immune-mediated cytotoxicity of interleukin-21 contributes to antitumor effects in mantle cell lymphoma. *Blood* 126, 1555–1564.

<https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-624585>

Bikos, V., Darzentas, N., Hadzidimitriou, A., Davis, Z., Hockley, S., Traverse-Glehen, A., Algara, P., Santoro, A., Gonzalez, D., Mollejo, M., Dagklis, A., Gangemi, F., Bosler, D.S., Bourikas, G., Anagnostopoulos, A., Tsaftaris, A., Iannitto, E., Ponzoni, M., Felman, P., Berger, F., Belessi, C., Ghia, P., Papadaki, T., Dogan, A., Degano, M., Matutes, E., Piris, M.A., Oscier, D., Stamatopoulos, K., 2012. Over 30% of patients with splenic marginal zone lymphoma express the same immunoglobulin heavy variable gene: ontogenetic implications. *Leukemia* 26, 1638–1646. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.3>

Binder, M., O'Byrne, M.M., Maurer, M.J., Ansell, S., Feldman, A.L., Cerhan, J., Novak, A., Porrata, L.F., Markovic, S., Link, B.K., Witzig, T.E., 2017. Associations between elevated pre-treatment serum cytokines and peripheral blood cellular markers of immunosuppression in patients with lymphoma. *Am. J. Hematol.* 92, 752–758. <https://doi.org/10.1002/ajh.24758>

Biram, A., Davidzohn, N., Shulman, Z., 2019. T cell interactions with B cells during germinal center formation, a three-step model. *Immunol. Rev.* 288, 37–48. <https://doi.org/10.1111/imr.12737>

Bodet, L., Gomez-Bougie, P., Touzeau, C., Dousset, C., Descamps, G., Maïga, S., Avet-Loiseau, H., Bataille, R., Moreau, P., Le Gouill, S., Pellat-Deceunynck, C., Amiot, M., 2011. ABT-737 is highly effective against molecular subgroups of multiple myeloma. *Blood* 118, 3901–3910. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-317438>

Bodrug, S.E., Warner, B.J., Bath, M.L., Lindeman, G.J., Harris, A.W., Adams, J.M., 1994. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J* 13, 2124–2130.

Boissard, F., Tosolini, M., Ligat, L., Quillet-Mary, A., Lopez, F., Fournié, J.-J., Ysebaert, L., Poupot, M., 2017. Nurse-like cells promote CLL survival through LFA-3/CD2 interactions. *Oncotarget* 8, 52225–52236. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13660>

Bowman, E.P., Campbell, J.J., Soler, D., Dong, Z., Manlongat, N., Picarella, D., Hardy, R.R., Butcher, E.C., 2000. Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation. *J. Exp. Med.* 191, 1303–1318. <https://doi.org/10.1084/jem.191.8.1303>

Brosseau, C., Dousset, C., Touzeau, C., Maïga, S., Moreau, P., Amiot, M., Le Gouill, S., Pellat-Deceunynck, C., 2014. Combination of lenalidomide with vitamin D3 induces apoptosis in mantle cell lymphoma via demethylation of BIK. *Cell Death Dis* 5, e1389. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.346>

Burger, J.A., Ford, R.J., 2011. The microenvironment in mantle cell lymphoma: cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies. *Semin. Cancer Biol.* 21, 308–312. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.09.006>

Burger, J.A., Gribben, J.G., 2014. The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. *Semin. Cancer Biol.* 24, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.08.011>

Burger, J.A., Wiestner, A., 2018. Targeting B cell receptor signalling in cancer: preclinical and clinical advances. *Nat. Rev. Cancer* 18, 148–167. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.121>

Calado, D.P., Sasaki, Y., Godinho, S.A., Pellerin, A., Köchert, K., Sleckman, B.P., de Alborán, I.M., Janz, M., Rodig, S., Rajewsky, K., 2012. The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nat. Immunol.* 13, 1092–1100. <https://doi.org/10.1038/ni.2418>

Cambier, J.C., Gauld, S.B., Merrell, K.T., Vilen, B.J., 2007. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat. Rev. Immunol.* 7, 633–643. <https://doi.org/10.1038/nri2133>

- Caron, G., Le Gallou, S., Lamy, T., Tarte, K., Fest, T., 2009. CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells. *J. Immunol.* 182, 7595–7602. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804272>
- Cassese, G., Arce, S., Hauser, A.E., Lehnert, K., Moewes, B., Mostarac, M., Muehlinghaus, G., Szyska, M., Radbruch, A., Manz, R.A., 2003. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J. Immunol.* 171, 1684–1690. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1684>
- Castillo, R., Mascarenhas, J., Telford, W., Chadburn, A., Friedman, S.M., Schattner, E.J., 2000. Proliferative response of mantle cell lymphoma cells stimulated by CD40 ligation and IL-4. *Leukemia* 14, 292–298.
- Cerutti, A., Cols, M., Puga, I., 2013. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 118–132. <https://doi.org/10.1038/nri3383>
- Cha, S.-C., Qin, H., Kannan, S., Rawal, S., Watkins, L.S., Baio, F.E., Wu, W., Ong, J., Wei, J., Kwak, B., Kim, S., Popescu, M.S., Paick, D.S., Kim, K., Luong, A., Davis, R.E., Schroeder, H.W., Kwak, L.W., Neelapu, S.S., 2013. Nonstereotyped lymphoma B cell receptors recognize vimentin as a shared autoantigen. *J. Immunol.* 190, 4887–4898. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300179>
- Chang, B.Y., Francesco, M., De Rooij, M.F.M., Magadala, P., Steggerda, S.M., Huang, M.M., Kuil, A., Herman, S.E.M., Chang, S., Pals, S.T., Wilson, W., Wiestner, A., Spaargaren, M., Buggy, J.J., Elias, L., 2013. Egress of CD19(+)CD5(+) cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients. *Blood* 122, 2412–2424. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-482125>
- Chávez-Galán, L., Olleros, M.L., Vesin, D., Garcia, I., 2015. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00263>
- Chen, Z., Teo, A.E., McCarty, N., 2016. ROS-Induced CXCR4 Signaling Regulates Mantle Cell Lymphoma (MCL) Cell Survival and Drug Resistance in the Bone Marrow Microenvironment via Autophagy. *Clin. Cancer Res.* 22, 187–199. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0987>
- Chiron, D., Di Liberto, M., Martin, P., Huang, X., Sharman, J., Blecua, P., Mathew, S., Vijay, P., Eng, K., Ali, S., Johnson, A., Chang, B., Ely, S., Elemento, O., Mason, C.E., Leonard, J.P., Chen-Kiang, S., 2014. Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma. *Cancer Discov* 4, 1022–1035. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0098>
- Chiron, D., Dousset, C., Brosseau, C., Touzeau, C., Maïga, S., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., Le Gouill, S., Amiot, M., 2015. Biological rationale for sequential targeting of Bruton tyrosine kinase and Bcl-2 to overcome CD40-induced ABT-199 resistance in mantle cell lymphoma. *Oncotarget* 6, 8750–8759. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3275>
- Chng, W.-J., Huang, G.F., Chung, T.H., Ng, S.B., Gonzalez-Paz, N., Troska-Price, T., Mulligan, G., Chesi, M., Bergsagel, P.L., Fonseca, R., 2011. Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia* 25, 1026–1035. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.53>
- Chu, V.T., Berek, C., 2013. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol. Rev.* 251, 177–188. <https://doi.org/10.1111/imr.12011>
- Clot, G., Jares, P., Giné, E., Navarro, A., Royo, C., Pinyol, M., Martín-García, D., Demajo, S., Espinet, B., Salar, A., Ferrer, A., Muntanola, A., Aymerich, M., Rauert-Wunderlich, H., Jaffe, E.S., Connors, J.M., Gascoyne, R.D., Delabie, J., López-Guillermo, A., Ott, G., Wright, G.W., Staudt, L.M., Rosenwald, A., Scott, D.W., Rimsza, L.M., Beà, S., Campo, E., 2018. A gene signature that distinguishes conventional and leukemic nonnodal mantle cell lymphoma helps

predict outcome. *Blood* 132, 413–422. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-838136>

Corcione, A., Arduino, N., Ferretti, E., Raffaghello, L., Roncella, S., Rossi, D., Fedeli, F., Ottonello, L., Trentin, L., Dallegri, F., Semenzato, G., Pistoia, V., 2004. CCL19 and CXCL12 trigger in vitro chemotaxis of human mantle cell lymphoma B cells. *Clin. Cancer Res.* 10, 964–971.

Couronné, L., Bachy, E., Roulland, S., Nadel, B., Davi, F., Armand, M., Canioni, D., Michot, J.M., Visco, C., Arcaini, L., Besson, C., Hermine, O., 2018. From hepatitis C virus infection to B-cell lymphoma. *Ann. Oncol.* 29, 92–100. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx635>

Craig, F.E., Foon, K.A., 2008. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 111, 3941–3967. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-120535>

Cyster, J.G., 2003. Homing of antibody secreting cells. *Immunol. Rev.* 194, 48–60.

Daids, M.S., Roberts, A.W., Seymour, J.F., Pagel, J.M., Kahl, B.S., Wierda, W.G., Puvvada, S., Kipps, T.J., Anderson, M.A., Salem, A.H., Dunbar, M., Zhu, M., Peale, F., Ross, J.A., Gressick, L., Desai, M., Kim, S.Y., Verdugo, M., Humerickhouse, R.A., Gordon, G.B., Gerecitano, J.F., 2017. Phase I First-in-Human Study of Venetoclax in Patients With Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 35, 826–833. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.4320>

De Bruyne, E., Bos, T.J., Schuit, F., Van Valckenborgh, E., Menu, E., Thorrez, L., Atadja, P., Jernberg-Wiklund, H., Vanderkerken, K., 2010. IGF-1 suppresses Bim expression in multiple myeloma via epigenetic and posttranslational mechanisms. *Blood* 115, 2430–2440. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-232801>

De Silva, N.S., Klein, U., 2015. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148. <https://doi.org/10.1038/nri3804>

Delfau-Larue, M.-H., Klapper, W., Berger, F., Jardin, F., Briere, J., Salles, G., Casasnovas, O., Feugier, P., Haioun, C., Ribrag, V., Thieblemont, C., Unterhalt, M., Dreyling, M., Macintyre, E., Pott, C., Hermine, O., Hoster, E., European Mantle Cell Lymphoma Network, 2015. High-dose cytarabine does not overcome the adverse prognostic value of CDKN2A and TP53 deletions in mantle cell lymphoma. *Blood* 126, 604–611. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-628792>

Doñate, C., Vijaya Kumar, A., Imhof, B.A., Matthes, T., 2016. Anti-JAM-C therapy eliminates tumor engraftment in a xenograft model of mantle cell lymphoma. *J. Leukoc. Biol.* 100, 843–853. <https://doi.org/10.1189/jlb.1HI1114-549RR>

Dorfman, D.M., Pinkus, G.S., 1994. Distinction between small lymphocytic and mantle cell lymphoma by immunoreactivity for CD23. *Mod. Pathol.* 7, 326–331.

Dreyling, M., Campo, E., Hermine, O., Jerkeman, M., Le Gouill, S., Rule, S., Shpilberg, O., Walewski, J., Ladetto, M., ESMO Guidelines Committee, 2017. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 28, iv62–iv71. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx223>

Dreyling, M., Klapper, W., Rule, S., 2018. Blastoid and pleomorphic mantle cell lymphoma: still a diagnostic and therapeutic challenge! *Blood* 132, 2722–2729. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-737502>

Ek, S., Björck, E., Högerkorp, C.-M., Nordenskjöld, M., Porwit-MacDonald, A., Borrebaeck, C.A.K., 2006. Mantle cell lymphomas acquire increased expression of CCL4, CCL5 and 4-1BB-L implicated in cell survival. *Int. J. Cancer* 118, 2092–2097. <https://doi.org/10.1002/ijc.21579>

Epron, G., Ame-Thomas, P., Le Priol, J., Pangault, C., Dulong, J., Lamy, T., Fest, T., Tarte, K., 2012. Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. *Leukemia* 26, 139–148.

<https://doi.org/10.1038/leu.2011.179>

Eskelund, C.W., Dahl, C., Hansen, J.W., Westman, M., Kolstad, A., Pedersen, L.B., Montano-Almendras, C.P., Husby, S., Freiburghaus, C., Ek, S., Pedersen, A., Niemann, C., Rätty, R., Brown, P., Geisler, C.H., Andersen, M.K., Guldberg, P., Jerkeman, M., Grønbaek, K., 2017. TP53 mutations identify younger mantle cell lymphoma patients who do not benefit from intensive chemoimmunotherapy. *Blood* 130, 1903–1910. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-779736>

Fairfax, K.A., Corcoran, L.M., Pridans, C., Huntington, N.D., Kallies, A., Nutt, S.L., Tarlinton, D.M., 2007. Different kinetics of blimp-1 induction in B cell subsets revealed by reporter gene. *J. Immunol.* 178, 4104–4111. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4104>

Fernández, V., Salameró, O., Espinet, B., Solé, F., Royo, C., Navarro, A., Camacho, F., Beà, S., Hartmann, E., Amador, V., Hernández, L., Agostinelli, C., Sargent, R.L., Rozman, M., Aymerich, M., Colomer, D., Villamor, N., Swerdlow, S.H., Pileri, S.A., Bosch, F., Piris, M.A., Montserrat, E., Ott, G., Rosenwald, A., López-Guillermo, A., Jares, P., Serrano, S., Campo, E., 2010. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 70, 1408–1418. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3419>

Ferrer, A., Salaverria, I., Bosch, F., Villamor, N., Rozman, M., Beà, S., Giné, E., López-Guillermo, A., Campo, E., Montserrat, E., 2007. Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. *Cancer* 109, 2473–2480. <https://doi.org/10.1002/cncr.22715>

Fistonich, C., Zehentmeier, S., Bednarski, J.J., Miao, R., Schjerven, H., Sleckman, B.P., Pereira, J.P., 2018. Cell circuits between B cell progenitors and IL-7+ mesenchymal progenitor cells control B cell development. *J. Exp. Med.* 215, 2586–2599. <https://doi.org/10.1084/jem.20180778>

Fonseca, R., Bergsagel, P.L., Drach, J., Shaughnessy, J., Gutierrez, N., Stewart, A.K., Morgan, G., Van Ness, B., Chesi, M., Minvielle, S., Neri, A., Barlogie, B., Kuehl, W.M., Liebisch, P., Davies, F., Chen-Kiang, S., Durie, B.G.M., Carrasco, R., Sezer, O., Reiman, T., Pilarski, L., Avet-Loiseau, H., International Myeloma Working Group, 2009. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 23, 2210–2221. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.174>

Franciszkiwicz, K., Boissonnas, A., Boutet, M., Combadière, C., Mami-Chouaib, F., 2012. Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer Res.* 72, 6325–6332. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2027>

Frankenberger, M., Hofer, T.P.J., Marei, A., Dayyani, F., Schewe, S., Strasser, C., Aldraihi, A., Stanzel, F., Lang, R., Hoffmann, R., Prazeres da Costa, O., Buch, T., Ziegler-Heitbrock, L., 2012. Transcript profiling of CD16-positive monocytes reveals a unique molecular fingerprint. *Eur. J. Immunol.* 42, 957–974. <https://doi.org/10.1002/eji.201141907>

Fu, L., Lin-Lee, Y.-C., Pham, L.V., Tamayo, A., Yoshimura, L., Ford, R.J., 2006. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. *Blood* 107, 4540–4548. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4042>

Furtado, M., Wang, M.L., Munneke, B., McGreivy, J., Beaupre, D.M., Rule, S., 2015. Ibrutinib-associated lymphocytosis corresponds to bone marrow involvement in mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 170, 131–134. <https://doi.org/10.1111/bjh.13275>

Galy, A., Travis, M., Cen, D., Chen, B., 1995. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3, 459–473.

Gitlin, A.D., Shulman, Z., Nussenzweig, M.C., 2014. Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* 509, 637–640. <https://doi.org/10.1038/nature13300>

- Goodman, A., Patel, S.P., Kurzrock, R., 2017. PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 203–220. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.168>
- Gordon, S.R., Maute, R.L., Dulken, B.W., Hutter, G., George, B.M., McCracken, M.N., Gupta, R., Tsai, J.M., Sinha, R., Corey, D., Ring, A.M., Connolly, A.J., Weissman, I.L., 2017. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* 545, 495–499. <https://doi.org/10.1038/nature22396>
- Goy, A., Bernstein, S.H., Kahl, B.S., Djulbegovic, B., Robertson, M.J., de Vos, S., Epner, E., Krishnan, A., Leonard, J.P., Lonial, S., Nasta, S., O'Connor, O.A., Shi, H., Boral, A.L., Fisher, R.I., 2009. Bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated time-to-event analyses of the multicenter phase 2 PINNACLE study. *Ann. Oncol.* 20, 520–525. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn656>
- Goy, A., Sinha, R., Williams, M.E., Kalayoglu Besisik, S., Drach, J., Ramchandren, R., Zhang, L., Cicero, S., Fu, T., Witzig, T.E., 2013. Single-agent lenalidomide in patients with mantle-cell lymphoma who relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study. *J. Clin. Oncol.* 31, 3688–3695. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.49.2835>
- Green, D.R., 2019. The Coming Decade of Cell Death Research: Five Riddles. *Cell* 177, 1094–1107. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.024>
- Gribben, J.G., Fowler, N., Morschhauser, F., 2015. Mechanisms of Action of Lenalidomide in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 33, 2803–2811. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.5363>
- Guilloton, F., Caron, G., Ménard, C., Pangault, C., Amé-Thomas, P., Dulong, J., De Vos, J., Rossille, D., Henry, C., Lamy, T., Fouquet, O., Fest, T., Tarte, K., 2012. Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood* 119, 2556–2567. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-370908>
- Haberman, A.M., Gonzalez, D.G., Wong, P., Zhang, T.-T., Kerfoot, S.M., 2019. Germinal center B cell initiation, GC maturation, and the coevolution of its stromal cell niches. *Immunol. Rev.* 288, 10–27. <https://doi.org/10.1111/imr.12731>
- Hadzidimitriou, A., Agathangelidis, A., Darzentas, N., Murray, F., Delfau-Larue, M.-H., Pedersen, L.B., Lopez, A.N., Dagklis, A., Rombout, P., Beldjord, K., Kolstad, A., Dreyling, M.H., Anagnostopoulos, A., Tsaftaris, A., Mavragani-Tsipidou, P., Rosenwald, A., Ponzoni, M., Groenen, P., Ghia, P., Sander, B., Papadaki, T., Campo, E., Geisler, C., Rosenquist, R., Davi, F., Pott, C., Stamatopoulos, K., 2011. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* 118, 3088–3095. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-343434>
- Halldórsdóttir, A.M., Lundin, A., Murray, F., Mansouri, L., Knuutila, S., Sundström, C., Laurell, A., Ehrencrona, H., Sander, B., Rosenquist, R., 2011. Impact of TP53 mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 25, 1904–1908. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.162>
- Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., Stevenson, F.K., 1999. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 1848–1854.
- Han, S., Hathcock, K., Zheng, B., Kepler, T.B., Hodes, R., Kelsoe, G., 1995. Cellular interaction in germinal centers. Roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J. Immunol.* 155, 556–567.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Harrington, B.K., Wheeler, E., Hornbuckle, K., Y Shana'ah, A., Youssef, Y., Smith, L., Hassan li, Q., Klamer, B., Zhang, X., Long, M., Baiocchi, R.A., Maddocks, K., Johnson, A.J., Byrd, J.C., Alinari, L., 2019. Modulation of immune checkpoint molecule expression in mantle cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 1–10. <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1569231>
- Hauser, A.E., Debes, G.F., Arce, S., Cassese, G., Hamann, A., Radbruch, A., Manz, R.A., 2002. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J. Immunol.* 169, 1277–1282. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.3.1277>
- Hazan-Halevy, I., Rosenblum, D., Weinstein, S., Bairey, O., Raanani, P., Peer, D., 2015. Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes. *Cancer Lett.* 364, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.04.026>
- Heinrich, D.A., Weinkauff, M., Hutter, G., Zimmermann, Y., Jurinovic, V., Hiddemann, W., Dreyling, M., 2015. Differential regulation patterns of the anti-CD20 antibodies obinutuzumab and rituximab in mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 168, 606–610. <https://doi.org/10.1111/bjh.13132>
- Hermann, M., Niemitz, C., Marafioti, T., Schriever, F., 1998. Reduced phagocytosis of apoptotic cells in malignant lymphoma. *Int. J. Cancer* 75, 675–679.
- Hermine, O., Hoster, E., Walewski, J., Bosly, A., Stilgenbauer, S., Thieblemont, C., Szymczyk, M., Bouabdallah, R., Kneba, M., Hallek, M., Salles, G., Feugier, P., Ribrag, V., Birkmann, J., Forstpointner, R., Haioun, C., Hänel, M., Casasnovas, R.O., Finke, J., Peter, N., Bouabdallah, K., Sebban, C., Fischer, T., Dührsen, U., Metzner, B., Maschmeyer, G., Kanz, L., Schmidt, C., Delarue, R., Brousse, N., Klapper, W., Macintyre, E., Delfau-Larue, M.-H., Pott, C., Hiddemann, W., Unterhalt, M., Dreyling, M., European Mantle Cell Lymphoma Network, 2016. Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Lancet* 388, 565–575. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00739-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00739-X)
- Herzog, S., Reth, M., Jumaa, H., 2009. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 195–205. <https://doi.org/10.1038/nri2491>
- Hess, G., Herbrecht, R., Romaguera, J., Verhoef, G., Crump, M., Gisselbrecht, C., Laurell, A., Offner, F., Strahs, A., Berkenblit, A., Hanushevsky, O., Clancy, J., Hewes, B., Moore, L., Coiffier, B., 2009. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 27, 3822–3829. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.7977>
- Hock, B.D., McKenzie, J.L., Patton, N.W., Drayson, M., Taylor, K., Wakeman, C., Kantarjian, H., Giles, F., Albitar, M., 2006. Circulating levels and clinical significance of soluble CD40 in patients with hematologic malignancies. *Cancer* 106, 2148–2157. <https://doi.org/10.1002/cncr.21816>
- Hofmann, W.K., de Vos, S., Tsukasaki, K., Wachsman, W., Pinkus, G.S., Said, J.W., Koeffler, H.P., 2001. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood* 98, 787–794. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.3.787>
- Honma, K., Tsuzuki, S., Nakagawa, M., Tagawa, H., Nakamura, S., Morishima, Y., Seto, M., 2009. TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 114, 2467–2475. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-194852>
- Horlad, H., Ma, C., Yano, H., Pan, C., Ohnishi, K., Fujiwara, Y., Endo, S., Kikukawa, Y., Okuno, Y., Matsuoka, M., Takeya, M., Komohara, Y., 2016. An IL-27/Stat3 axis induces expression of programmed cell death 1 ligands (PD-L1/2) on infiltrating macrophages in

lymphoma. *Cancer Sci.* 107, 1696–1704. <https://doi.org/10.1111/cas.13065>

Inoue, T., Moran, I., Shinnakasu, R., Phan, T.G., Kurosaki, T., 2018. Generation of memory B cells and their reactivation. *Immunol. Rev.* 283, 138–149. <https://doi.org/10.1111/imr.12640>

Ito, D., Frantz, A.M., Williams, C., Thomas, R., Burnett, R.C., Avery, A.C., Breen, M., Mason, N.J., O'Brien, T.D., Modiano, J.F., 2012. CD40 ligand is necessary and sufficient to support primary diffuse large B-cell lymphoma cells in culture: a tool for in vitro preclinical studies with primary B-cell malignancies. *Leuk. Lymphoma* 53, 1390–1398. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.654337>

Iyengar, S., Ariza-McNaughton, L., Clear, A., Taussig, D., Auer, R., Roe, A., Lillington, D., Iqbal, S., Joel, S., Gribben, J., Bonnet, D., 2016. Characteristics of human primary mantle cell lymphoma engraftment in NSG mice. *Br. J. Haematol.* 173, 165–169. <https://doi.org/10.1111/bjh.13581>

Jain, P., Wang, M., 2019. Mantle cell lymphoma: 2019 update on the diagnosis, pathogenesis, prognostication, and management. *Am. J. Hematol.* 94, 710–725. <https://doi.org/10.1002/ajh.25487>

Jares, P., Colomer, D., Campo, E., 2012. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J. Clin. Invest.* 122, 3416–3423. <https://doi.org/10.1172/JCI61272>

Jayappa, K.D., Portell, C.A., Gordon, V.L., Capaldo, B.J., Bekiranov, S., Axelrod, M.J., Brett, L.K., Wulfkühle, J.D., Gallagher, R.I., Petricoin, E.F., Bender, T.P., Williams, M.E., Weber, M.J., 2017. Microenvironmental agonists generate de novo phenotypic resistance to combined ibrutinib plus venetoclax in CLL and MCL. *Blood Adv* 1, 933–946.

Jin, M.K., Hoster, E., Dreyling, M., Unterhalt, M., Hiddemann, W., Klapper, W., 2011. Follicular dendritic cells in follicular lymphoma and types of non-Hodgkin lymphoma show reduced expression of CD23, CD35 and CD54 but no association with clinical outcome. *Histopathology* 58, 586–592. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03779.x>

Jones, D., Benjamin, R.J., Shahsafari, A., Dorfman, D.M., 2000. The chemokine receptor CXCR3 is expressed in a subset of B-cell lymphomas and is a marker of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 95, 627–632.

Juilland, M., Thome, M., 2016. Role of the CARMA1/BCL10/MALT1 complex in lymphoid malignancies. *Curr. Opin. Hematol.* 23, 402–409. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000257>

Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 541–570. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115830>

Kabashima, K., Haynes, N.M., Xu, Y., Nutt, S.L., Allende, M.L., Proia, R.L., Cyster, J.G., 2006. Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. *J. Exp. Med.* 203, 2683–2690. <https://doi.org/10.1084/jem.20061289>

Katz, S.G., Labelle, J.L., Meng, H., Valeriano, R.P., Fisher, J.K., Sun, H., Rodig, S.J., Kleinstein, S.H., Walensky, L.D., 2014. Mantle cell lymphoma in cyclin D1 transgenic mice with Bim-deficient B cells. *Blood* 123, 884–893. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-499079>

Khodadoust, M.S., Olsson, N., Wagar, L.E., Haabeth, O.A.W., Chen, B., Swaminathan, K., Rawson, K., Liu, C.L., Steiner, D., Lund, P., Rao, S., Zhang, L., Marceau, C., Stehr, H., Newman, A.M., Czerwinski, D.K., Carlton, V.E.H., Moorhead, M., Faham, M., Kohrt, H.E., Carette, J., Green, M.R., Davis, M.M., Levy, R., Elias, J.E., Alizadeh, A.A., 2017. Antigen presentation profiling reveals recognition of lymphoma immunoglobulin neoantigens. *Nature* 543, 723–727. <https://doi.org/10.1038/nature21433>

Kluin-Nelemans, H.C., Hoster, E., Hermine, O., Walewski, J., Trneny, M., Geisler, C.H.,

- Stilgenbauer, S., Thieblemont, C., Vehling-Kaiser, U., Doorduijn, J.K., Coiffier, B., Forstpointner, R., Tilly, H., Kanz, L., Feugier, P., Szymczyk, M., Hallek, M., Kremers, S., Lepeu, G., Sanhes, L., Zijlstra, J.M., Bouabdallah, R., Lugtenburg, P.J., Macro, M., Pfreundschuh, M., Procházka, V., Di Raimondo, F., Ribrag, V., Uppenkamp, M., André, M., Klapper, W., Hiddemann, W., Unterhalt, M., Dreyling, M.H., 2012. Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 367, 520–531. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200920>
- Koh, Y.W., Shin, S.-J., Park, C., Yoon, D.H., Suh, C., Huh, J., 2014. Absolute monocyte count predicts overall survival in mantle cell lymphomas: correlation with tumour-associated macrophages. *Hematol Oncol* 32, 178–186. <https://doi.org/10.1002/hon.2106>
- Kohrt, H.E., Sagiv-Barfi, I., Rafiq, S., Herman, S.E.M., Butchar, J.P., Cheney, C., Zhang, X., Buggy, J.J., Muthusamy, N., Levy, R., Johnson, A.J., Byrd, J.C., 2014. Ibrutinib antagonizes rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity. *Blood* 123, 1957–1960. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-547869>
- Krappmann, D., Vincendeau, M., 2016. Mechanisms of NF- κ B deregulation in lymphoid malignancies. *Semin. Cancer Biol.* 39, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.05.002>
- Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N., Rajewsky, K., 2004. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the I α /I β heterodimer. *Cell* 117, 787–800. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.014>
- Kridel, R., Xerri, L., Gelas-Dore, B., Tan, K., Feugier, P., Vawda, A., Canioni, D., Farinha, P., Boussetta, S., Moccia, A.A., Brice, P., Chavez, E.A., Kyle, A.H., Scott, D.W., Sanders, A.D., Fabiani, B., Slack, G.W., Minchinton, A.I., Haioun, C., Connors, J.M., Sehn, L.H., Steidl, C., Gascoyne, R.D., Salles, G., 2015. The Prognostic Impact of CD163-Positive Macrophages in Follicular Lymphoma: A Study from the BC Cancer Agency and the Lymphoma Study Association. *Clin. Cancer Res.* 21, 3428–3435. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3253>
- Küppers, R., 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 251–262. <https://doi.org/10.1038/nrc1589>
- Kurosaki, T., Kometani, K., Ise, W., 2015. Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 149–159. <https://doi.org/10.1038/nri3802>
- Kurtova, A.V., Tamayo, A.T., Ford, R.J., Burger, J.A., 2009. Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood* 113, 4604–4613. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-185827>
- Lai, R., Rassidakis, G.Z., Medeiros, L.J., Leventaki, V., Keating, M., McDonnell, T.J., 2003. Expression of STAT3 and its phosphorylated forms in mantle cell lymphoma cell lines and tumours. *J. Pathol.* 199, 84–89. <https://doi.org/10.1002/path.1253>
- Lamaison, C., Tarte, K., 2019. Impact of B cell/lymphoid stromal cell crosstalk in B-cell physiology and malignancy. *Immunol. Lett.* <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.02.005>
- Lamarque, M., 2014. Actualités de l'EHA dans le lymphome à cellules du manteau. *Hématologie* 20, 142–152. <https://doi.org/10.1684/hma.2014.0950>
- Lamm, W., Kaufmann, H., Raderer, M., Hoffmann, M., Chott, A., Zielinski, C., Drach, J., 2011. Bortezomib combined with rituximab and dexamethasone is an active regimen for patients with relapsed and chemotherapy-refractory mantle cell lymphoma. *Haematologica* 96, 1008–1014. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.041392>
- Launay, E., Pangault, C., Bertrand, P., Jardin, F., Lamy, T., Tilly, H., Tarte, K., Bastard, C., Fest, T., 2012. High rate of TNFRSF14 gene alterations related to 1p36 region in de novo follicular lymphoma and impact on prognosis. *Leukemia* 26, 559–562.

<https://doi.org/10.1038/leu.2011.266>

Le Gouill, S., Thieblemont, C., Oberic, L., Moreau, A., Bouabdallah, K., Dartigeas, C., Damaj, G., Gastinne, T., Ribrag, V., Feugier, P., Casasnovas, O., Zerazhi, H., Haioun, C., Maisonneuve, H., Houot, R., Jardin, F., Van Den Neste, E., Tournilhac, O., Le Dû, K., Morschhauser, F., Cartron, G., Fornecker, L.-M., Canioni, D., Callanan, M., Béné, M.C., Salles, G., Tilly, H., Lamy, T., Gressin, R., Hermine, O., LYSA Group, 2017. Rituximab after Autologous Stem-Cell Transplantation in Mantle-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 377, 1250–1260. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1701769>

LeBien, T.W., 2000. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 96, 9–23.

Letai, A.G., 2008. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 121–132. <https://doi.org/10.1038/nrc2297>

Leux, C., Maynadié, M., Troussard, X., Cabrera, Q., Herry, A., Le Guyader-Peyrou, S., Le Gouill, S., Monnereau, A., 2014. Mantle cell lymphoma epidemiology: a population-based study in France. *Ann. Hematol.* 93, 1327–1333. <https://doi.org/10.1007/s00277-014-2049-5>

Li, L., Zhang, J., Chen, J., Xu-Monette, Z.Y., Miao, Y., Xiao, M., Young, K.H., Wang, S., Medeiros, L.J., Wang, M., Ford, R.J., Pham, L.V., 2018. B-cell receptor-mediated NFATc1 activation induces IL-10/STAT3/PD-L1 signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 132, 1805–1817. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-841015>

Love, C., Sun, Z., Jima, D., Li, G., Zhang, J., Miles, R., Richards, K.L., Dunphy, C.H., Choi, W.W.L., Srivastava, G., Lugar, P.L., Rizzieri, D.A., Lagoo, A.S., Bernal-Mizrachi, L., Mann, K.P., Flowers, C.R., Naresh, K.N., Evens, A.M., Chadburn, A., Gordon, L.I., Czader, M.B., Gill, J.I., Hsi, E.D., Greenough, A., Moffitt, A.B., McKinney, M., Banerjee, A., Grubor, V., Levy, S., Dunson, D.B., Dave, S.S., 2012. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat. Genet.* 44, 1321–1325. <https://doi.org/10.1038/ng.2468>

Lovec, H., Grzeschiczek, A., Kowalski, M.B., Mörry, T., 1994. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J.* 13, 3487–3495.

Luo, W., Weisel, F., Shlomchik, M.J., 2018. B Cell Receptor and CD40 Signaling Are Rewired for Synergistic Induction of the c-Myc Transcription Factor in Germinal Center B Cells. *Immunity* 48, 313–326.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.008>

Lwin, T., Lin, J., Choi, Y.S., Zhang, X., Moscinski, L.C., Wright, K.L., Sotomayor, E.M., Dalton, W.S., Tao, J., 2010. Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. *Blood* 116, 5228–5236. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-275925>

Ma, Q., Jones, D., Springer, T.A., 1999. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 10, 463–471.

Maffei, R., Fiorcari, S., Martinelli, S., Potenza, L., Luppi, M., Marasca, R., 2015. Targeting neoplastic B cells and harnessing microenvironment: the “double face” of ibrutinib and idelalisib. *J Hematol Oncol* 8, 60. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0157-x>

Manier, S., Salem, K.Z., Park, J., Landau, D.A., Getz, G., Ghobrial, I.M., 2017. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 100–113. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.122>

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>

Martin, V.G., Wu, Y.-C.B., Townsend, C.L., Lu, G.H.C., O'Hare, J.S., Mozeika, A., Coolen, A.C.C., Kipling, D., Fraternali, F., Dunn-Walters, D.K., 2016. Transitional B Cells in Early Human B Cell Development - Time to Revisit the Paradigm? *Front Immunol* 7, 546.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00546>

Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., Mantovani, A., 2006. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol.* 177, 7303–7311. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7303>

McDonnell, T.J., Deane, N., Platt, F.M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J.P., Korsmeyer, S.J., 1989. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57, 79–88.

Mebius, R.E., Kraal, G., 2005. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 606–616. <https://doi.org/10.1038/nri1669>

Medina, D.J., Goodell, L., Glod, J., Gélinas, C., Rabson, A.B., Strair, R.K., 2012. Mesenchymal stromal cells protect mantle cell lymphoma cells from spontaneous and drug-induced apoptosis through secretion of B-cell activating factor and activation of the canonical and non-canonical nuclear factor κ B pathways. *Haematologica* 97, 1255–1263. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.040659>

Meissner, B., Kridel, R., Lim, R.S., Rogic, S., Tse, K., Scott, D.W., Moore, R., Mungall, A.J., Marra, M.A., Connors, J.M., Steidl, C., Gascoyne, R.D., 2013. The E3 ubiquitin ligase UBR5 is recurrently mutated in mantle cell lymphoma. *Blood* 121, 3161–3164. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-478834>

Melchers, F., 2015. Checkpoints that control B cell development. *J. Clin. Invest.* 125, 2203–2210. <https://doi.org/10.1172/JCI78083>

Milne, C.D., Paige, C.J., 2006. IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin. Immunol.* 18, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.10.003>

Mohanty, A., Sandoval, N., Phan, A., Nguyen, T.V., Chen, R.W., Budde, E., Mei, M., Popplewell, L., Pham, L.V., Kwak, L.W., Weisenburger, D.D., Rosen, S.T., Chan, W.C., M  schen, M., Ngo, V.N., 2019. Regulation of SOX11 expression through CCND1 and STAT3 in mantle cell lymphoma. *Blood* 133, 306–318. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-05-851667>

Molavi, O., Wang, P., Zak, Z., Gelebart, P., Belch, A., Lai, R., 2013. Gene methylation and silencing of SOCS3 in mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 161, 348–356. <https://doi.org/10.1111/bjh.12262>

Molina-Cerrillo, J., Alonso-Gordoa, T., Gajate, P., Grande, E., 2017. Bruton's tyrosine kinase (BTK) as a promising target in solid tumors. *Cancer Treat. Rev.* 58, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.06.001>

Montoto, S., Davies, A.J., Matthews, J., Calaminici, M., Norton, A.J., Amess, J., Vinnicombe, S., Waters, R., Rohatiner, A.Z.S., Lister, T.A., 2007. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 25, 2426–2433. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.3260>

Morin, R.D., Mendez-Lago, M., Mungall, A.J., Goya, R., Mungall, K.L., Corbett, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Chiu, R., Field, M., Jackman, S., Krzywinski, M., Scott, D.W., Trinh, D.L., Tamura-Wells, J., Li, S., Firme, M.R., Rogic, S., Griffith, M., Chan, S., Yakovenko, O., Meyer, I.M., Zhao, E.Y., Smailus, D., Moksa, M., Chittaranjan, S., Rimsza, L., Brooks-Wilson, A., Spinelli, J.J., Ben-Neriah, S., Meissner, B., Woolcock, B., Boyle, M., McDonald, H., Tam, A., Zhao, Y., Delaney, A., Zeng, T., Tse, K., Butterfield, Y., Birol, I., Holt, R., Schein, J., Horsman, D.E., Moore, R., Jones, S.J.M., Connors, J.M., Hirst, M., Gascoyne, R.D., Marra, M.A., 2011. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 476, 298–303. <https://doi.org/10.1038/nature10351>

Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>

- Mottok, A., Renné, C., Seifert, M., Oppermann, E., Bechstein, W., Hansmann, M.-L., Küppers, R., Bräuninger, A., 2009. Inactivating SOCS1 mutations are caused by aberrant somatic hypermutation and restricted to a subset of B-cell lymphoma entities. *Blood* 114, 4503–4506. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-225839>
- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F.O., Mege, J.-L., Mosser, D.M., Natoli, G., Saeij, J.P., Schultze, J.L., Shirey, K.A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J.A., Vogel, S.N., Wynn, T.A., 2014. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- Myklebust, J.H., Brody, J., Kohrt, H.E., Kolstad, A., Czerwinski, D.K., Wälchli, S., Green, M.R., Trøen, G., Liestøl, K., Beiske, K., Houot, R., Delabie, J., Alizadeh, A.A., Irish, J.M., Levy, R., 2017. Distinct patterns of B-cell receptor signaling in non-Hodgkin lymphomas identified by single-cell profiling. *Blood* 129, 759–770. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-718494>
- Nagasawa, T., 2006. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 107–116. <https://doi.org/10.1038/nri1780>
- Nakayama, T., Hieshima, K., Izawa, D., Tatsumi, Y., Kanamaru, A., Yoshie, O., 2003. Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J. Immunol.* 170, 1136–1140. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1136>
- Namen, A.E., Lupton, S., Hjerrild, K., Wignall, J., Mochizuki, D.Y., Schmieder, A., Mosley, B., March, C.J., Urdal, D., Gillis, S., 1988. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 333, 571–573. <https://doi.org/10.1038/333571a0>
- Navarro, A., Clot, G., Royo, C., Jares, P., Hadzidimitriou, A., Agathangelidis, A., Bikos, V., Darzentas, N., Papadaki, T., Salaverria, I., Pinyol, M., Puig, X., Palomero, J., Vegliante, M.C., Amador, V., Martinez-Trillos, A., Stefancikova, L., Wiestner, A., Wilson, W., Pott, C., Calasanz, M.J., Trim, N., Erber, W., Sander, B., Ott, G., Rosenwald, A., Colomer, D., Giné, E., Siebert, R., Lopez-Guillermo, A., Stamatopoulos, K., Beà, S., Campo, E., 2012. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res.* 72, 5307–5316. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1615>
- Nemazee, D., 2017. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 281–294. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.19>
- Niir, H., Clark, E.A., 2002. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 945–956. <https://doi.org/10.1038/nri955>
- Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., Corcoran, L.M., 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 160–171. <https://doi.org/10.1038/nri3795>
- Nygren, L., Wasik, A.M., Baumgartner-Wennerholm, S., Jeppsson-Ahlberg, Å., Klimkowska, M., Andersson, P., Buhrkuhl, D., Christensson, B., Kimby, E., Wahlin, B.E., Sander, B., 2014. T-cell levels are prognostic in mantle cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 20, 6096–6104. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0889>
- Oakes, C.C., Seifert, M., Assenov, Y., Gu, L., Przekopowicz, M., Ruppert, A.S., Wang, Q., Imbusch, C.D., Serva, A., Koser, S.D., Brocks, D., Lipka, D.B., Bogatyrova, O., Weichenhan, D., Brors, B., Rassenti, L., Kipps, T.J., Mertens, D., Zapatka, M., Lichter, P., Döhner, H., Küppers, R., Zenz, T., Stilgenbauer, S., Byrd, J.C., Plass, C., 2016. DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 48, 253–264. <https://doi.org/10.1038/ng.3488>
- O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.-

- L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., Noelle, R.J., 2004. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J. Exp. Med.* 199, 91–98. <https://doi.org/10.1084/jem.20031330>
- Ogden, C.A., Pound, J.D., Bath, B.K., Owens, S., Johannessen, I., Wood, K., Gregory, C.D., 2005. Enhanced apoptotic cell clearance capacity and B cell survival factor production by IL-10-activated macrophages: implications for Burkitt's lymphoma. *J. Immunol.* 174, 3015–3023. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.3015>
- Okada, T., Ngo, V.N., Ekland, E.H., Förster, R., Lipp, M., Littman, D.R., Cyster, J.G., 2002. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 196, 65–75. <https://doi.org/10.1084/jem.20020201>
- O'Riordan, M., Grosschedl, R., 1999. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* 11, 21–31.
- Osmond, D.G., Jacobsen, K., Park, Y.H., Lamontagne, L., 1988. In vivo localization of B lymphocyte progenitor cells in mouse bone marrow. *Adv. Exp. Med. Biol.* 237, 45–51.
- Papin, A., Le Gouill, S., Chiron, D., 2018. Rationale for targeting tumor cells in their microenvironment for mantle cell lymphoma treatment. *Leuk. Lymphoma* 59, 1064–1072. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1357177>
- Papin, A., Le Gouill, S., Chiron, D., 2017. Rationale for targeting tumor cells in their microenvironment for mantle cell lymphoma treatment. *Leuk. Lymphoma* 1–9. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1357177>
- Pasqualucci, L., Dalla-Favera, R., 2018. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 131, 2307–2319. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-764332>
- Pereira, J.P., An, J., Xu, Y., Huang, Y., Cyster, J.G., 2009. Cannabinoid receptor 2 mediates the retention of immature B cells in bone marrow sinusoids. *Nat. Immunol.* 10, 403–411. <https://doi.org/10.1038/ni.1710>
- Perkins, N.D., 2012. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12, 121–132. <https://doi.org/10.1038/nrc3204>
- Pham, L.V., Pogue, E., Ford, R.J., 2018. The Role of Macrophage/B-Cell Interactions in the Pathophysiology of B-Cell Lymphomas. *Front Oncol* 8, 147. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00147>
- Pham, L.V., Tamayo, A.T., Yoshimura, L.C., Lin-Lee, Y.-C., Ford, R.J., 2005. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood* 106, 3940–3947. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1167>
- Pham, L.V., Tamayo, A.T., Yoshimura, L.C., Lo, P., Ford, R.J., 2003. Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J. Immunol.* 171, 88–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.1.88>
- Pham, L.V., Vang, M.T., Tamayo, A.T., Lu, G., Challagundla, P., Jorgensen, J.L., Rollo, A.A., Ou, Z., Zhang, L., Wang, M., Ford, R.J., 2015. Involvement of tumor-associated macrophage activation in vitro during development of a novel mantle cell lymphoma cell line, PF-1, derived from a typical patient with relapsed disease. *Leuk. Lymphoma* 56, 186–193. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.901511>
- Pighi, C., Gu, T.-L., Dalai, I., Barbi, S., Parolini, C., Bertolaso, A., Pedron, S., Parisi, A., Ren, J., Cecconi, D., Chilosi, M., Menestrina, F., Zamò, A., 2011. Phospho-proteomic analysis of mantle cell lymphoma cells suggests a pro-survival role of B-cell receptor signaling. *Cell Oncol (Dordr)* 34, 141–153. <https://doi.org/10.1007/s13402-011-0019-7>
- Polk, A., Lu, Y., Wang, T., Seymour, E., Bailey, N.G., Singer, J.W., Boonstra, P.S., Lim, M.S., Malek, S., Wilcox, R.A., 2016. Colony-Stimulating Factor-1 Receptor Is Required for

Nurse-like Cell Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin. Cancer Res.* 22, 6118–6128. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-3099>

Porrata, L.F., Ristow, K., Markovic, S.N., 2013. Absolute monocyte count at diagnosis and survival in mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 163, 545–547. <https://doi.org/10.1111/bjh.12531>

Prukova, D., Andera, L., Nahacka, Z., Karolova, J., Svaton, M., Klanova, M., Havranek, O., Soukup, J., Svobodova, K., Zemanova, Z., Tuskova, D., Pokorna, E., Helman, K., Forsterova, K., Pacheco-Blanco, M., Vockova, P., Berkova, A., Fronkova, E., Trneny, M., Klener, P., 2019. Cotargeting of BCL2 with Venetoclax and MCL1 with S63845 Is Synthetically Lethal In Vivo in Relapsed Mantle Cell Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3275>

Puente, X.S., Jares, P., Campo, E., 2018. Chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma: crossroads of genetic and microenvironment interactions. *Blood* 131, 2283–2296. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-764373>

Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., Magri, G., Knowles, D.M., Tam, W., Chiu, A., Bussel, J.B., Serrano, S., Lorente, J.A., Bellosillo, B., Lloreta, J., Juanpere, N., Alameda, F., Baró, T., de Heredia, C.D., Torán, N., Català, A., Torrebaddell, M., Fortuny, C., Cusí, V., Carreras, C., Diaz, G.A., Blander, J.M., Farber, C.-M., Silvestri, G., Cunningham-Rundles, C., Calvillo, M., Dufour, C., Notarangelo, L.D., Lougaris, V., Plebani, A., Casanova, J.-L., Ganai, S.C., Diefenbach, A., Aróstegui, J.I., Juan, M., Yagüe, J., Mahlaoui, N., Donadieu, J., Chen, K., Cerutti, A., 2011. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* 13, 170–180. <https://doi.org/10.1038/ni.2194>

Purwada, A., Jaiswal, M.K., Ahn, H., Nojima, T., Kitamura, D., Gaharwar, A.K., Cerchiatti, L., Singh, A., 2015. Ex vivo engineered immune organoids for controlled germinal center reactions. *Biomaterials* 63, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.06.002>

Puthier, D., Derenne, S., Barillé, S., Moreau, P., Harousseau, J.L., Bataille, R., Amiot, M., 1999. Mcl-1 and Bcl-xL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells. *Br. J. Haematol.* 107, 392–395.

Qi, H., Cannons, J.L., Klauschen, F., Schwartzberg, P.L., Germain, R.N., 2008. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 455, 764–769. <https://doi.org/10.1038/nature07345>

Queirós, A.C., Beekman, R., Vilarrasa-Blasi, R., Duran-Ferrer, M., Clot, G., Merkel, A., Raineri, E., Russiñol, N., Castellano, G., Beà, S., Navarro, A., Kulis, M., Verdaguer-Dot, N., Jares, P., Enjuanes, A., Calasanz, M.J., Bergmann, A., Vater, I., Salaverría, I., van de Werken, H.J.G., Wilson, W.H., Datta, A., Flicek, P., Royo, R., Martens, J., Giné, E., Lopez-Guillermo, A., Stunnenberg, H.G., Klapper, W., Pott, C., Heath, S., Gut, I.G., Siebert, R., Campo, E., Martín-Subero, J.I., 2016. Decoding the DNA Methylome of Mantle Cell Lymphoma in the Light of the Entire B Cell Lineage. *Cancer Cell* 30, 806–821. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.014>

Rahal, R., Frick, M., Romero, R., Korn, J.M., Kridel, R., Chan, F.C., Meissner, B., Bhang, H., Ruddy, D., Kauffmann, A., Farsidjani, A., Derti, A., Rakiec, D., Naylor, T., Pfister, E., Kovats, S., Kim, S., Dietze, K., Dörken, B., Steidl, C., Tzankov, A., Hummel, M., Monahan, J., Morrissey, M.P., Fritsch, C., Sellers, W.R., Cooke, V.G., Gascoyne, R.D., Lenz, G., Stegmeier, F., 2014. Pharmacological and genomic profiling identifies NF- κ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nat. Med.* 20, 87–92. <https://doi.org/10.1038/nm.3435>

Rao, E., Jiang, C., Ji, M., Huang, X., Iqbal, J., Lenz, G., Wright, G., Staudt, L.M., Zhao, Y., McKeithan, T.W., Chan, W.C., Fu, K., 2012. The miRNA-17~92 cluster mediates chemoresistance and enhances tumor growth in mantle cell lymphoma via PI3K/AKT

- pathway activation. *Leukemia* 26, 1064–1072. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.305>
- Rauert-Wunderlich, H., Rudelius, M., Berberich, I., Rosenwald, A., 2018. CD40L mediated alternative NF κ B-signaling induces resistance to BCR-inhibitors in patients with mantle cell lymphoma. *Cell Death Dis* 9, 86. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0157-6>
- Rickert, R.C., 2013. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 578–591. <https://doi.org/10.1038/nri3487>
- Rinaldi, A., Kwee, I., Tadorelli, M., Largo, C., Uccella, S., Martin, V., Poretti, G., Gaidano, G., Calabrese, G., Martinelli, G., Baldini, L., Pruneri, G., Capella, C., Zucca, E., Cotter, F.E., Cigudosa, J.C., Catapano, C.V., Tibiletti, M.G., Berton, F., 2006. Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 132, 303–316. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05883.x>
- Robak, T., Huang, H., Jin, J., Zhu, J., Liu, T., Samoilova, O., Pylypenko, H., Verhoef, G., Siritanaratkul, N., Osmanov, E., Alexeeva, J., Pereira, J., Drach, J., Mayer, J., Hong, X., Okamoto, R., Pei, L., Rooney, B., van de Velde, H., Cavalli, F., LYM-3002 Investigators, 2015. Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 372, 944–953. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412096>
- Romaguera, J.E., Medeiros, L.J., Hagemeister, F.B., Fayad, L.E., Rodriguez, M.A., Pro, B., Younes, A., McLaughlin, P., Goy, A., Sarris, A.H., Dang, N.H., Samaniego, F., Brown, H.M., Gagneja, H.K., Cabanillas, F., 2003. Frequency of gastrointestinal involvement and its clinical significance in mantle cell lymphoma. *Cancer* 97, 586–591. <https://doi.org/10.1002/cncr.11096>
- Rossi, D., Trifonov, V., Fangazio, M., Bruscaggin, A., Rasi, S., Spina, V., Monti, S., Vaisitti, T., Arruga, F., Famà, R., Ciardullo, C., Greco, M., Cresta, S., Piranda, D., Holmes, A., Fabbri, G., Messina, M., Rinaldi, A., Wang, J., Agostinelli, C., Piccaluga, P.P., Lucioni, M., Tabbò, F., Serra, R., Franceschetti, S., Deambroggi, C., Daniele, G., Gattei, V., Marasca, R., Facchetti, F., Arcaini, L., Inghirami, G., Berton, F., Pileri, S.A., Deaglio, S., Foà, R., Dalla-Favera, R., Pasqualucci, L., Rabadan, R., Gaidano, G., 2012. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J. Exp. Med.* 209, 1537–1551. <https://doi.org/10.1084/jem.20120904>
- Royo, C., Salaverria, I., Hartmann, E.M., Rosenwald, A., Campo, E., Beà, S., 2011. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Semin. Cancer Biol.* 21, 322–334. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.09.007>
- Ruddle, N.H., Akirav, E.M., 2009. Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. *J. Immunol.* 183, 2205–2212. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804324>
- Saba, N.S., Liu, D., Herman, S.E.M., Underbayev, C., Tian, X., Behrend, D., Weniger, M.A., Skarzynski, M., Gyamfi, J., Fontan, L., Melnick, A., Grant, C., Roschewski, M., Navarro, A., Beà, S., Pittaluga, S., Dunleavy, K., Wilson, W.H., Wiestner, A., 2016. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF- κ B activation in mantle cell lymphoma. *Blood* 128, 82–92. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-681460>
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., Nakagami-Yamaguchi, E., Hamada, Y., Aizawa, S., Hirai, H., 2003. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18, 675–685.
- Sakaguchi, N., Melchers, F., 1986. Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature* 324, 579–582. <https://doi.org/10.1038/324579a0>
- Salaverria, I., Royo, C., Carvajal-Cuenca, A., Clot, G., Navarro, A., Valera, A., Song, J.Y., Woroniecka, R., Rymkiewicz, G., Klapper, W., Hartmann, E.M., Sujobert, P., Wlodarska, I.,

- Ferry, J.A., Gaulard, P., Ott, G., Rosenwald, A., Lopez-Guillermo, A., Quintanilla-Martinez, L., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Siebert, R., Campo, E., Beà, S., 2013. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood* 121, 1394–1402. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-452284>
- Sander, S., Calado, D.P., Srinivasan, L., Köchert, K., Zhang, B., Rosolowski, M., Rodig, S.J., Holzmann, K., Stilgenbauer, S., Siebert, R., Bullinger, L., Rajewsky, K., 2012. Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer Cell* 22, 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.012>
- Schmitz, R., Young, R.M., Ceribelli, M., Jhavar, S., Xiao, W., Zhang, M., Wright, G., Shaffer, A.L., Hodson, D.J., Buras, E., Liu, X., Powell, J., Yang, Y., Xu, W., Zhao, H., Kohlhammer, H., Rosenwald, A., Kluin, P., Müller-Hermelink, H.K., Ott, G., Gascoyne, R.D., Connors, J.M., Rimsza, L.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Delabie, J., Smeland, E.B., Olgwang, M.D., Reynolds, S.J., Fisher, R.I., Braziel, R.M., Tubbs, R.R., Cook, J.R., Weisenburger, D.D., Chan, W.C., Pittaluga, S., Wilson, W., Waldmann, T.A., Rowe, M., Mbulaiteye, S.M., Rickinson, A.B., Staudt, L.M., 2012. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 490, 116–120. <https://doi.org/10.1038/nature11378>
- Schrader, C., Meusers, P., Brittinger, G., Janssen, D., Teymoortash, A., Siebmann, J.U., Parwaresch, R., Tiemann, M., 2006. Growth pattern and distribution of follicular dendritic cells in mantle cell lymphoma: a clinicopathological study of 96 patients. *Virchows Arch.* 448, 151–159. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-0049-5>
- Schwickert, T.A., Vitoria, G.D., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Mugnier, M.R., Gitlin, A.D., Dustin, M.L., Nussenzweig, M.C., 2011. A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J. Exp. Med.* 208, 1243–1252. <https://doi.org/10.1084/jem.20102477>
- Scott, D.W., Gascoyne, R.D., 2014. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat. Rev. Cancer* 14, 517–534. <https://doi.org/10.1038/nrc3774>
- Shah, S., Schrader, K.A., Waanders, E., Timms, A.E., Vijai, J., Miething, C., Wechsler, J., Yang, J., Hayes, J., Klein, R.J., Zhang, J., Wei, L., Wu, G., Rusch, M., Nagahawatte, P., Ma, J., Chen, S.-C., Song, G., Cheng, J., Meyers, P., Bhojwani, D., Jhanwar, S., Maslak, P., Fleisher, M., Littman, J., Offit, L., Rau-Murthy, R., Fleischut, M.H., Corines, M., Murali, R., Gao, X., Manschreck, C., Kitzing, T., Murty, V.V., Raimondi, S., Kuiper, R.P., Simons, A., Schiffman, J.D., Onel, K., Plon, S.E., Wheeler, D., Ritter, D., Ziegler, D.S., Tucker, K., Sutton, R., Chenevix-Trench, G., Li, J., Huntsman, D.G., Hansford, S., Senz, J., Walsh, T., Lee, M., Hahn, C.N., Roberts, K., King, M.-C., Lo, S.M., Levine, R.L., Viale, A., Socci, N.D., Nathanson, K.L., Scott, H.S., Daly, M., Lipkin, S.M., Lowe, S.W., Downing, J.R., Altshuler, D., Sandlund, J.T., Horwitz, M.S., Mullighan, C.G., Offit, K., 2013. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 45, 1226–1231. <https://doi.org/10.1038/ng.2754>
- Sherr, C.J., 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672–1677.
- Shinnakasu, R., Inoue, T., Kometani, K., Moriyama, S., Adachi, Y., Nakayama, M., Takahashi, Y., Fukuyama, H., Okada, T., Kurosaki, T., 2016. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nat. Immunol.* 17, 861–869. <https://doi.org/10.1038/ni.3460>
- Singh, R., Letai, A., Sarosiek, K., 2019. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 175–193. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
- Smith, K.G., Light, A., O'Reilly, L.A., Ang, S.M., Strasser, A., Tarlinton, D., 2000. bcl-2 transgene expression inhibits apoptosis in the germinal center and reveals differences in the selection of memory B cells and bone marrow antibody-forming cells. *J. Exp. Med.* 191, 475–484. <https://doi.org/10.1084/jem.191.3.475>

Sonbol, M.B., Maurer, M.J., Stenson, M.J., Allmer, C., LaPlant, B.R., Weiner, G.J., Macon, W.R., Cerhan, J.R., Witzig, T.E., Gupta, M., 2014. Elevated soluble IL-2R α , IL-8, and MIP-1 β levels are associated with inferior outcome and are independent of MIPI score in patients with mantle cell lymphoma. *Am. J. Hematol.* 89, E223–227. <https://doi.org/10.1002/ajh.23838>

Song, K., Herzog, B.H., Sheng, M., Fu, J., McDaniel, J.M., Chen, H., Ruan, J., Xia, L., 2013. Lenalidomide inhibits lymphangiogenesis in preclinical models of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 73, 7254–7264. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0750>

Sonneveld, P., Avet-Loiseau, H., Lonial, S., Usmani, S., Siegel, D., Anderson, K.C., Chng, W.-J., Moreau, P., Attal, M., Kyle, R.A., Caers, J., Hillengass, J., San Miguel, J., van de Donk, N.W.C.J., Einsele, H., Bladé, J., Durie, B.G.M., Goldschmidt, H., Mateos, M.-V., Palumbo, A., Orłowski, R., 2016. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood* 127, 2955–2962. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-631200>

Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M., Busslinger, M., 2002. Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* 17, 781–793.

Stebegg, M., Kumar, S.D., Silva-Cayetano, A., Fonseca, V.R., Linterman, M.A., Graca, L., 2018. Regulation of the Germinal Center Response. *Front Immunol* 9, 2469. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02469>

Steidl, C., Lee, T., Shah, S.P., Farinha, P., Han, G., Nayar, T., Delaney, A., Jones, S.J., Iqbal, J., Weisenburger, D.D., Bast, M.A., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H.-K., Rimsza, L.M., Campo, E., Delabie, J., Braziel, R.M., Cook, J.R., Tubbs, R.R., Jaffe, E.S., Lenz, G., Connors, J.M., Staudt, L.M., Chan, W.C., Gascoyne, R.D., 2010. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 362, 875–885. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905680>

Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., Jaffe, E.S., 2016. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375–2390. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>

Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M., 2005. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 24, 1348–1358. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208300>

Takemori, T., Kaji, T., Takahashi, Y., Shimoda, M., Rajewsky, K., 2014. Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *Eur. J. Immunol.* 44, 1258–1264. <https://doi.org/10.1002/eji.201343716>

Tam, C.S., Anderson, M.A., Pott, C., Agarwal, R., Handunnetti, S., Hicks, R.J., Burbury, K., Turner, G., Di Iulio, J., Bressel, M., Westerman, D., Lade, S., Dreyling, M., Dawson, S.-J., Dawson, M.A., Seymour, J.F., Roberts, A.W., 2018. Ibrutinib plus Venetoclax for the Treatment of Mantle-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 378, 1211–1223. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1715519>

Tessoulin, B., Eveillard, M., Lok, A., Chiron, D., Moreau, P., Amiot, M., Moreau-Aubry, A., Le Gouill, S., Pellat-Deceunynck, C., 2017. p53 dysregulation in B-cell malignancies: More than a single gene in the pathway to hell. *Blood Rev.* 31, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.03.001>

Thurner, L., Hartmann, S., Fadle, N., Kemele, M., Bock, T., Bewarder, M., Regitz, E., Neumann, F., Nimmesgern, A., von Müller, L., Pott, C., Kim, Y.-J., Bohle, R.M., Wasik, M., Schuster, S.J., Hansmann, M.-L., Preuss, K.-D., Pfreundschuh, M., 2019. LRPAP1 is a frequent proliferation-inducing antigen of BCRs of mantle cell lymphomas and can be used for specific therapeutic targeting. *Leukemia* 33, 148–158. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0182-1>

- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.-I., Nagasawa, T., 2004. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20, 707–718. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.05.001>
- Touzeau, C., Dousset, C., Le Gouill, S., Sampath, D., Levenson, J.D., Souers, A.J., Maïga, S., Béné, M.C., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., Amiot, M., 2014. The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia* 28, 210–212. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.216>
- Touzeau, C., Maciag, P., Amiot, M., Moreau, P., 2018. Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* 32, 1899–1907. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0223-9>
- Trentin, L., Agostini, C., Facco, M., Piazza, F., Perin, A., Siviero, M., Gurrieri, C., Galvan, S., Adami, F., Zambello, R., Semenzato, G., 1999. The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *J. Clin. Invest.* 104, 115–121. <https://doi.org/10.1172/JCI7335>
- Trentin, L., Cabrelle, A., Facco, M., Carollo, D., Miorin, M., Tosoni, A., Pizzo, P., Binotto, G., Nicolardi, L., Zambello, R., Adami, F., Agostini, C., Semenzato, G., 2004. Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 104, 502–508. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-09-3103>
- Trněný, M., Lamy, T., Walewski, J., Belada, D., Mayer, J., Radford, J., Jurczak, W., Morschhauser, F., Alexeeva, J., Rule, S., Afanasyev, B., Kaplanov, K., Thyss, A., Kuzmin, A., Voloshin, S., Kuliczowski, K., Giza, A., Milpied, N., Stelitano, C., Marks, R., Trümper, L., Biyukov, T., Patturajan, M., Bravo, M.-L.C., Arcaini, L., SPRINT trial investigators and in collaboration with the European Mantle Cell Lymphoma Network, 2016. Lenalidomide versus investigator's choice in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL-002; SPRINT): a phase 2, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol.* 17, 319–331. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00559-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00559-8)
- Tsukada, N., Burger, J.A., Zvaifler, N.J., Kipps, T.J., 2002. Distinctive features of “nurselike” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99, 1030–1037. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.3.1030>
- Victora, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., Nussenzweig, M.C., 2010. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143, 592–605. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.032>
- Vishwamitra, D., Shi, P., Wilson, D., Manshouri, R., Vega, F., Schlette, E.J., Amin, H.M., 2011. Expression and effects of inhibition of type I insulin-like growth factor receptor tyrosine kinase in mantle cell lymphoma. *Haematologica* 96, 871–880. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.031567>
- Visser, H.P., Tewis, M., Willemze, R., Kluin-Nelemans, J.C., 2000. Mantle cell lymphoma proliferates upon IL-10 in the CD40 system. *Leukemia* 14, 1483–1489.
- von Hohenstaufen, K.A., Conconi, A., de Campos, C.P., Franceschetti, S., Bertoni, F., Margiotta Casaluci, G., Stathis, A., Ghielmini, M., Stussi, G., Cavalli, F., Gaidano, G., Zucca, E., 2013. Prognostic impact of monocyte count at presentation in mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 162, 465–473. <https://doi.org/10.1111/bjh.12409>
- Wang, L., Qian, J., Lu, Y., Li, H., Bao, H., He, D., Liu, Z., Zheng, Y., He, J., Li, Y., Neelapu, S., Yang, J., Kwak, L.W., Yi, Q., Cai, Z., 2013a. Immune evasion of mantle cell lymphoma: expression of B7-H1 leads to inhibited T-cell response to and killing of tumor cells. *Haematologica* 98, 1458–1466. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.071340>
- Wang, L., Zhao, Y., Qian, J., Sun, L., Lu, Y., Li, H., Li, Y., Yang, J., Cai, Z., Yi, Q., 2013b. Toll-like receptor-4 signaling in mantle cell lymphoma: effects on tumor growth and immune evasion. *Cancer* 119, 782–791. <https://doi.org/10.1002/cncr.27792>

- Wang, M., Fayad, L., Wagner-Bartak, N., Zhang, L., Hagemeister, F., Neelapu, S.S., Samaniego, F., McLaughlin, P., Fanale, M., Younes, A., Cabanillas, F., Fowler, N., Newberry, K.J., Sun, L., Young, K.H., Champlin, R., Kwak, L., Feng, L., Badillo, M., Bejarano, M., Hartig, K., Chen, W., Chen, Y., Byrne, C., Bell, N., Zeldis, J., Romaguera, J., 2012. Lenalidomide in combination with rituximab for patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: a phase 1/2 clinical trial. *Lancet Oncol.* 13, 716–723. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70200-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70200-0)
- Wang, M.L., Rule, S., Martin, P., Goy, A., Auer, R., Kahl, B.S., Jurczak, W., Advani, R.H., Romaguera, J.E., Williams, M.E., Barrientos, J.C., Chmielewska, E., Radford, J., Stilgenbauer, S., Dreyling, M., Jedrzejczak, W.W., Johnson, P., Spurgeon, S.E., Li, L., Zhang, L., Newberry, K., Ou, Z., Cheng, N., Fang, B., McGreivy, J., Clow, F., Buggy, J.J., Chang, B.Y., Beaupre, D.M., Kunkel, L.A., Blum, K.A., 2013. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 369, 507–516. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306220>
- Weill, J.-C., Weller, S., Reynaud, C.-A., 2009. Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 267–285. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132607>
- Weisel, F.J., Zuccarino-Catania, G.V., Chikina, M., Shlomchik, M.J., 2016. A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity* 44, 116–130. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.12.004>
- Weller, S., Mamani-Matsuda, M., Picard, C., Cordier, C., Lecoecue, D., Gauthier, F., Weill, J.-C., Reynaud, C.-A., 2008. Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants. *J. Exp. Med.* 205, 1331–1342. <https://doi.org/10.1084/jem.20071555>
- Westin, J.R., Chu, F., Zhang, M., Fayad, L.E., Kwak, L.W., Fowler, N., Romaguera, J., Hagemeister, F., Fanale, M., Samaniego, F., Feng, L., Baladandayuthapani, V., Wang, Z., Ma, W., Gao, Y., Wallace, M., Vence, L.M., Radvanyi, L., Muzzafar, T., Rotem-Yehudar, R., Davis, R.E., Neelapu, S.S., 2014. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 15, 69–77. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70551-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70551-5)
- Winkler, T.H., Mårtensson, I.-L., 2018. The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance. *Front Immunol* 9, 2423. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02423>
- Wu, C., de Miranda, N.F., Chen, L., Wasik, A.M., Mansouri, L., Jurczak, W., Galazka, K., Dlugosz-Danecka, M., Machaczka, M., Zhang, H., Peng, R., Morin, R.D., Rosenquist, R., Sander, B., Pan-Hammarström, Q., 2016. Genetic heterogeneity in primary and relapsed mantle cell lymphomas: Impact of recurrent CARD11 mutations. *Oncotarget* 7, 38180–38190. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9500>
- Xargay-Torrent, S., López-Guerra, M., Saborit-Villarroya, I., Rosich, L., Campo, E., Roué, G., Colomer, D., 2011. Vorinostat-induced apoptosis in mantle cell lymphoma is mediated by acetylation of proapoptotic BH3-only gene promoters. *Clin. Cancer Res.* 17, 3956–3968. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3412>
- Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., Casali, P., 2012. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 517–531. <https://doi.org/10.1038/nri3216>
- Xu-Monette, Z.Y., Zhou, J., Young, K.H., 2018. PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. *Blood* 131, 68–83. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-740993>
- Yang, Z.-Z., Novak, A.J., Stenson, M.J., Witzig, T.E., Ansell, S.M., 2006. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107, 3639–3646. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3376>

- Yeh, C.-H., Nojima, T., Kuraoka, M., Kelsoe, G., 2018. Germinal center entry not selection of B cells is controlled by peptide-MHCII complex density. *Nat Commun* 9, 928. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03382-x>
- Young, R.M., Staudt, L.M., 2013. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov* 12, 229–243. <https://doi.org/10.1038/nrd3937>
- Ysebaert, L., Fournié, J.-J., 2011. Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 52, 1404–1406. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.568078>
- Zaja, F., De Luca, S., Vitolo, U., Orsucci, L., Levis, A., Salvi, F., Rusconi, C., Ravelli, E., Tucci, A., Bottelli, C., Balzarotti, M., Brusamolino, E., Bonfichi, M., Pileri, S.A., Sabattini, E., Volpetti, S., Monagheddu, C., Vacca, A., Ria, R., Fanin, R., 2012. Salvage treatment with lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: clinical results and effects on microenvironment and neo-angiogenic biomarkers. *Haematologica* 97, 416–422. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.051813>
- Zaretsky, I., Atrakchi, O., Mazor, R.D., Stoler-Barak, L., Biram, A., Feigelson, S.W., Gitlin, A.D., Engelhardt, B., Shulman, Z., 2017. ICAMs support B cell interactions with T follicular helper cells and promote clonal selection. *J. Exp. Med.* 214, 3435–3448. <https://doi.org/10.1084/jem.20171129>
- Zehentmeier, S., Pereira, J.P., 2019. Cell circuits and niches controlling B cell development. *Immunol. Rev.* 289, 142–157. <https://doi.org/10.1111/imr.12749>
- Zhang, H., Chen, Z., Miranda, R.N., Medeiros, L.J., McCarty, N., 2016. TG2 and NF- κ B Signaling Coordinates the Survival of Mantle Cell Lymphoma Cells via IL6-Mediated Autophagy. *Cancer Res.* 76, 6410–6423. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0595>
- Zhang, J., Jima, D., Moffitt, A.B., Liu, Q., Czader, M., Hsi, E.D., Fedoriw, Y., Dunphy, C.H., Richards, K.L., Gill, J.I., Sun, Z., Love, C., Scotland, P., Lock, E., Levy, S., Hsu, D.S., Dunson, D., Dave, S.S., 2014. The genomic landscape of mantle cell lymphoma is related to the epigenetically determined chromatin state of normal B cells. *Blood* 123, 2988–2996. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-517177>
- Zhang, L., Yang, J., Qian, J., Li, H., Romaguera, J.E., Kwak, L.W., Wang, M., Yi, Q., 2012. Role of the microenvironment in mantle cell lymphoma: IL-6 is an important survival factor for the tumor cells. *Blood* 120, 3783–3792. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-424630>
- Zhang, X.-Y., Xu, J., Zhu, H.-Y., Wang, Y., Wang, L., Fan, L., Wu, Y.-J., Li, J.-Y., Xu, W., 2016. Negative prognostic impact of low absolute CD4⁺ T cell counts in peripheral blood in mantle cell lymphoma. *Cancer Sci.* 107, 1471–1476. <https://doi.org/10.1111/cas.13020>
- Zhao, X., Lwin, T., Silva, A., Shah, B., Tao, Jiangchuan, Fang, B., Zhang, Liang, Fu, K., Bi, C., Li, J., Jiang, H., Meads, M.B., Jacobson, T., Silva, M., Distler, A., Darville, L., Zhang, Ling, Han, Y., Rebatchouk, D., Di Liberto, M., Moscinski, L.C., Koomen, J.M., Dalton, W.S., Shain, K.H., Wang, M., Sotomayor, E., Tao, Jianguo, 2017. Unification of de novo and acquired ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. *Nat Commun* 8, 14920. <https://doi.org/10.1038/ncomms14920>
- Zhao, X., Ren, Y., Lawlor, M., Shah, B.D., Park, P.M.C., Lwin, T., Wang, X., Liu, K., Wang, M., Gao, J., Li, T., Xu, M., Silva, A.S., Lee, K., Zhang, T., Koomen, J.M., Jiang, H., Sudalagunta, P.R., Meads, M.B., Cheng, F., Bi, C., Fu, K., Fan, H., Dalton, W.S., Moscinski, L.C., Shain, K.H., Sotomayor, E.M., Wang, G.G., Gray, N.S., Cleveland, J.L., Qi, J., Tao, J., 2019. BCL2 Amplicon Loss and Transcriptional Remodeling Drives ABT-199 Resistance in B Cell Lymphoma Models. *Cancer Cell* 35, 752–766.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.04.005>
- Zhu, X.-D., Zhang, J.-B., Zhuang, P.-Y., Zhu, H.-G., Zhang, W., Xiong, Y.-Q., Wu, W.-Z., Wang, L., Tang, Z.-Y., Sun, H.-C., 2008. High expression of macrophage colony-stimulating

factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 26, 2707–2716. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.6521>

Zucca, E., Bertoni, F., Vannata, B., Cavalli, F., 2014. Emerging role of infectious etiologies in the pathogenesis of marginal zone B-cell lymphomas. *Clin. Cancer Res.* 20, 5207–5216. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0496>

Titre : Rôle du microenvironnement tumoral dans l'expansion des lymphomes B

Mots clés : Lymphomes, Microenvironnement, Lymphocytes T, Macrophages

Résumé : Le lymphome à cellules du manteau (LCM) est un lymphome non-hodgkinien agressif associé à un mauvais pronostic. Malgré des améliorations récentes dans les stratégies thérapeutiques pour traiter le LCM, sa prise en charge demeure difficile. Des progrès technologiques dans le séquençage de nouvelle génération ont amélioré notre compréhension des anomalies intrinsèques de cellules de LCM mais le rôle des signaux extrinsèques reste largement inconnu. Des études récentes ont souligné le rôle central du microenvironnement du LCM dans la survie, la prolifération et la chimiorésistance des cellules tumorales.

La caractérisation des niches tumorales du LCM et la compréhension des dialogues entre les cellules tumorales et les cellules environnantes au sein de leur microenvironnement sont nécessaires pour améliorer l'efficacité des traitements. Dans ce travail de thèse, nous présentons une revue de la littérature des niches tumorales du LCM ainsi que nos travaux sur le rôle du microenvironnement dans les lymphomes B. Ces connaissances apportent un rationnel pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques pour pallier à la chimiorésistance durant le traitement du LCM.

Title: Role of the tumor microenvironment in B cell lymphomas

Keywords: Lymphoma, Microenvironment, T lymphocytes, Macrophages

Abstract: Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive non-Hodgkin lymphoma associated with poor prognosis, and despite recent improvements in the therapeutic strategies for treating MCL, its management remains challenging. While improvements in next generation sequencing technology have greatly increased our understanding of the intrinsic abnormalities of MCL, the role of extrinsic signaling remains largely unknown. Recent studies have highlighted the central role of the MCL microenvironment in tumor cell survival, drug resistance and proliferation.

Characterization of the diverse MCL tumoral niches and comprehension of the crosstalk between tumor cells and surrounding cells within the MCL microenvironment are needed to increase treatment efficacy. In this work, we present a revue of MCL microenvironment and our results on the role of tumoral niches in B lymphomas. This knowledge could be rapidly translated into new therapeutic strategies to overcome drug resistance during MCL treatment.