

NantesUniversité

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605 Biologie-Santé Spécialité : Biologie Cellulaire, Biologie du Développement

Par Salomé DECOMBIS

« Etude de la résistance dans le Lymphome à Cellules du Manteau : Rôle des voies NFkB dépendantes d'anomalies génomiques et du microenvironnement »

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 09 mars 2023 Unité de recherche : Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Intégrée Nantes Angers – INSERM 1307 CNRS 6075

Rapporteurs avant soutenance :

Pr Olivier HeraultProfesseur d'Université, Praticien Hospitalier, Université de ToursDr Mary PoupotChargée de Recherche INSERM, Université de Toulouse

Composition du Jury :

Président :	Dr Nicolas Bidère	Directeur de Recherche INSERM, Université de Nantes
Examinateurs	: Dr Nicolas Bidère Dr Christelle Vincent-Fabert	Directeur de Recherche INSERM, Université de Nantes Chargée de Recherche CNRS, Université de Limoges
Dir. de thèse : Co-dir. de thès	Dr Catherine Pellat-Deceunynck e : Dr David Chiron	Directeur de Recherche CNRS, Université de Nantes Chargé de Recherche CNRS, Université de Nantes

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent d'abord au Dr David Chiron. Je te remercie pour ta rigueur, ta disponibilité, tes conseils et ta confiance qui m'ont permis de mener ces projets de thèse. Merci de m'avoir laissé l'opportunité d'aller présenter mes travaux deux années consécutives à l'ASH, c'était deux expériences incroyables d'un point de vue scientifique mais aussi personnel. J'ai beaucoup appris à tes côtés et travailler avec toi a été un plaisir.

Merci au Dr Catherine Pellat-Deceunynck de m'avoir accueillie dans l'équipe et de m'avoir fait confiance. Je te remercie pour tes conseils, ta disponibilité, ta rigueur et pour nos discussions. Merci pour les bons moments que nous avons partagés avec David, Romane et Sara lors de l'ASH à la Nouvelle-Orléans.

Merci au Pr Olivier Herault, au Dr Mary Poupot, au Dr Nicolas Bidère et au Dr Christelle Vincent-Fabert de me faire l'honneur de juger mon travail et de participer à mon jury de thèse.

Aux Dr Yannick Le Bris, Dr Benoît Tessoulin, Pr Cyrille Touzeau et Pr Marion Eveillard pour leurs conseils.

Au Dr Martine Amiot pour ses conseils. C'était un réel plaisir de te faire découvrir ce qu'est un escape game.

Au Dr Agnès Moreau-Aubry, pour sa bonne humeur, sa joie de vivre et ses anecdotes.

A Céline pour nos réflexions, son soutien, ses conseils et sa disponibilité. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Tu as été tellement précieuse pour moi durant mes trois années de thèse.

Aux « superwomen » de l'équipe 11 qui représentent un soutien au quotidien. A Christelle, Géraldine et Patricia pour leur rigueur et leurs conseils, à Sophie pour son écoute et sa joie de vivre, à Charlotte et Manue pour leur gentillesse et leur bienveillance. A la team des doctorantes/postdoctorantes. Merci à Ophélie pour tes anecdotes, ton écoute et ta gentillesse, à Romane pour ton sens du détail, pour être mon « english corrector » préférée et pour tes conseils très précieux, à Candice pour ta joie de vivre et tes blagues « recherchées » au quotidien. Merci à vous pour votre soutien et vos conseils de tous les jours mais aussi pour nos sorties escape game qui ont développé notre sens du détail ! Merci pour tous ces souvenirs et pour votre amitié. J'ai hâte de vous faire découvrir le pays du Père Noël ! Merci également à Sara, Clara et Carolane.

A la team Micropicell et notamment à Stéphanie, Philippe, Magalie, Marine et Steven. Merci Stéphanie pour tous tes conseils, ta rigueur et ta disponibilité, travailler avec toi sur le projet d'immunohistochimie multiplex a été un réel plaisir. Merci Philippe pour ces longues heures passées ensemble à admirer le microenvironnement immunitaire ganglionnaire au confocal qui est très complexe et passionnant ! Merci Magalie pour ton aide concernant la quantification des images. Merci à Marine et à Steven pour leurs conseils.

Au Dr Anne Moreau pour sa disponibilité et son expertise sur le projet d'immunohistochimie.

Merci à tous les membres de l'équipe 11 du CRCI2NA pour ces trois belles années passées à vos côtés. Venir faire ma thèse à Nantes et dans l'équipe a été un réel plaisir et une très belle expérience. Je repars avec beaucoup de souvenirs, j'ai beaucoup appris à vos côtés. Vous allez me manquer !

A ma famille, à Antoine et à mes amis pour leur soutien. Merci à mes parents et à mes grands parents d'avoir toujours cru en moi et pour votre soutien tellement précieux.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	4
INDEX DES FIGURES	77 م
INTRODUCTION	12
I) La différenciation lymphocytaire B	12
I.1) Etapes précoces de la différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse	12
I.1.1) Le processus de différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse	12
I.1.2) Les lymphocytes B1a	15
I.2) Etapes tardives de la différenciation lymphocytaire B dans les organes lymphoïde secondaires	es 16
I.2.1) Sorties des lymphocytes B immatures de la moelle osseuse	16
I.2.2) Le processus de différenciation lymphocytaire B dans les organes lymphoïd secondaires	es 16
I.3) La différenciation terminale des lymphocytes B en plasmocytes et lymphocytes B mémoire	22
I.3.1) La différenciation des lymphocytes B en plasmocytes	22
I.3.2) La différenciation des lymphocytes B en lymphocytes B mémoire	23
II) Le Lymphome à Cellules du Manteau	24
 II.1) Epidémiologie et présentation clinique II.2) Présentation biologique : hétérogénéité de la pathologie II.3) Les anomalies liées au développement du LCM 	_24 _25 _25
II.3.1) La translocation t(11;14)(q13;q32)	25
II.3.2) SOX11 : le facteur clé oncogénique	27
II.3.2.1) Rôle et régulation de SOX11 dans le LCM	27
II.3.2.2) Les différents sous-types du LCM associés à l'expression de SOX11	28
II.3.3) Instabilité génomique dans le LCM	32
II.3.4) Régulation épigénétique dans le LCM	32
II.4) Les différents sous-groupes pronostiques du LCM	
II.5) Rôle du microenvironnement tumoral dans la progression du LCM	35
II.5.1) Arguments sur le rôle du microenvironnement	35
II.5.2) Les différentes populations cellulaires retrouvées dans l'écosystème	
tumoral	36

II.5.3) Les d	lifférents types de microenvironnements retrouvés dans les	
lymphomes	В	_38
II.5.4) Le mi	icroenvironnement tumoral du LCM	_40
II.5.4.1)) Implication d'un réseau de chemokines dans la niche du LCM	40
II.5.4.2 _/) Les différents types cellulaires de la niche du LCM	41
	II.5.4.2.1) Les lymphocytes T	41
	II.5.4.2.2) Les macrophages associés à la tumeur	_44
II.5.4.3, microei) Influence du sous-type de LCM sur la composition du nvironnement tumoral	_47
II.5.4.4 _/) Autres interactions décrites dans le LCM	48
	II.5.4.4.1) Interactions avec les cellules stromales	
	mésenchymateuses	48
	II.5.4.4.2) Interactions avec les cellules stromales mésenchymateuses la moelle osseuse	de _48
11.5.4.5) LCM) Etablissement d'un dialogue soluble au sein de la niche tumorale du	_49
11.5.4.6 du LCN) Régulation des voies de signalisation par le microenvironnement tumo 1	oral 50
	II.5.4.6.1) La voie du BCR	50
	II.5.4.6.2) La voie NFkB	_54
	II.5.4.6.3) Activation des voies BCR et NFkB induite par le microenvironnement dans le LCM	_ <u>60</u>
II.5.4.7)) Dérégulation de l'apoptose par le microenvironnement tumoral	
du LCN	1	60
	II.5.4.7.1) La famille BCL2	60
	II.5.4.7.2) Dérégulation de la famille BCL2 par le microenvironnement dans le LCM	_63
II.6) Stratégies	thérapeutiques intégrant le LCM dans son écosystème	
ll.6.1) Théra	apie ciblée	_65
II.6.2) Immu	Inothérapie	68
II.6.2.1,) Les inhibiteurs des « immune checkpoints »	68
II.6.2.2) Les anticorps bispécifiques	<u>69</u>
II.6.2.3,) Les CAR-T cells	_70

OBJECTIFS DU TRAVAIL	72
RESULTATS	75
I) Etude du microenvironnement immunitaire du LCM	76
I.1) Etude du dialogue soluble au sein du microenvironnement immunitaire du LCM : Article « The IL32/BAFF axis supports prosurvival dialogs in the lymphoma ecosystem and is disrupted by NIK inhibition »	77
I.2) Etude de l'architecture du microenvironnement immunitaire du LCM à l'aide d'une technique d'immunohistochimie multiplex	115
II) Etude des mécanismes de résistance du LCM à la thérapie OAsIs	126
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	189

ANNEXES	199
REFERENCES	207

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Processus de recombinaison des segments $V_H D_H J_H$ dans les cellules pro-B

Figure 2 : Etapes précoces de la différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse

Figure 3 : Interactions lors de la reconnaissance des lymphocytes B par les lymphocytes T_{FH} durant la formation du GC

Figure 4 : Structure des organes lymphoïdes secondaires, sélection des lymphocytes B dans les GC et hémopathies B associées

Figure 5: Anatomie du centre germinatif en immunohistochimie et microscopie multiphotonique intravitale

Figure 6 : La niche médullaire des plasmocytes

Figure 7 : Rôle de la cycline D1 dans la régulation du cycle cellulaire

Figure 8 : Les différents sous-types du LCM

Figure 9 : Analyse cytologique et histologique des différents sous-types de LCM dans des frottis de moelle osseuse (coloration wright-giemsa) et des biopsies de ganglions et de rate (coloration hématoxyline éosine)

Figure 10 : Représentation des quatre sous-groupes pronostiques du LCM

Figure 11 : Représentation du microenvironnement tumoral

Figure 12 : Nature des 3 sous-types de microenvironnements retrouvés dans les lymphomes à cellules B

Figure 13 : Mécanismes d'immuno-échappement au sein du microenvironnement tumoral des lymphomes

Figure 14 : La voie de signalisation du récepteur B (BCR)

Figure 15 : Les deux modèles d'activation du BCR

Figure 16 : Activation de la voie classique de NFkB et structure et activation de CARD11

Figure 17 : Activation de la voie alterne de NFkB

Figure 18 : Localisation des mutations de CARD11

Figure 19 : Les protéines de la famille BCL2

Figure 20 : La voie intrinsèque / mitochondriale de l'apoptose

Figure 21 : Action des anticorps bispécifiques

Figure 22 : Rôle central des voies NFkB dépendantes de l'écosystème tumoral et d'anomalies génomiques dans la survie et la résistance du LCM

Figure 23 : Implication de l'axe IL32/BAFF dans les dialogues au sein de l'écosystème tumoral du LCM perturbé par l'inhibition de NIK

Figure 24 : Différentes étapes de la technique d'immunohistochimie multiplex

Figure 25 : Microenvironnement lymphoïde et myéloïde du LCM en immunohistochimie multiplex

Figure 26 : Microenvironnement lymphoïde du LCM en immunohistochimie multiplex

Figure 27 : Expression des marqueurs CD3 et CD8 dans des ganglions tumoraux de patients atteints de LCM

Figure 28 : Expression des marqueurs CD4 et CD8 dans des ganglions tumoraux de patients atteints de LCM

Figure 29 : Expression de l'IL-32 *in situ* dans les ganglions lymphatiques de patients atteints de LCM

Figure 30 : Implication de CARD11 et BCL2A1 dans la résistance à la combinaison Ibrutinib/Venetoclax dans le LCM

LISTE DES ABREVIATIONS

AID : Activation Induced cytidine Deaminase

AMC : Absolute Monocytes Count (nombre absolu de monocytes)

APE1 : Apurinic-Apyrimidinic Endonuclease 1

APRIL : A Proliferation Inducing Ligand

BA : Brexucabtagene Autoleucel

BAFF : B-cell Activating Factor

BAFFR : B-cell Activating Factor Receptor

BCAP : B Cell Adaptor for Phosphoinositide 3-kinase

BCL2 : B-Cell Lymphoma 2

BCL6 : B-Cell Lymphoma 6

BCR : B Cell Receptor

BIRC3 : Baculoviral IAP Repeat Containing 3

BL : Lymphome de Burkitt

BLIMP1 : B Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1

BLNK : B cell Linker protein

BMSC : cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse

BTK : Bruton's Tyrosine Kinase

CAM : Chorioallantoic Membrane

CAM-DR : Résistance aux médicaments médiée par l'adhésion cellulaire

CARD11 : Caspase Recruitment Domain Family Member 11

CAR-T cells : Chimeric Antigen Receptor T cells

CBM : CARD11-BCL10-MALT1

cIAP1/cIAP2 : Cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins 1/2

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CR : Complete Response (réponse complète)

CSF1/2 : Colony Stimulating Factor 1/2

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4

DAG : Diacylglycérols

DLBCL : Lymphome Diffus à Grandes Cellules B

DNMT-1 : ADN méthyltransférase-1

EBF1 : Early B cell Factor 1

EpiCMIT : Epigenetically determined Cumulative Mitoses

FAK : Focal Adhesion Kinase

FasL : Fas Ligand FasR : Fas Recepteur **FDC** : Cellules Folliculaires Dendritiques FFPE : Formalin-Fixed Paraffin-Embedded FL : Lymphome Folliculaire **FOXP3** : Forkhead box Protein P3 GC : Centres Germinatifs **GM-CSF** : Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor **GOF** : Gain of function HDAC1/2 : Histones Désacétylases HDAC1/2 **HEVs** : High Endothelial Vessels ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule-1 ICP : Immune Checkpoints Ig: Immunoglobuline IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1 IGH : chaîne lourde des immunoglobulines IGHV : région hypervariable de la chaîne lourde des immunoglobulines **IP3**: Inositol trisphosphate IRF4 : Interferon-Regulatory Factor 4 ISMCN : Néoplasie in situ des Cellules du Manteau ITAMs : Immunoreceptor Tyrosine based-Activation Motifs

LAG-3 : Lymphocyte Activation Gene 3

LCM : Lymphome à Cellules du Manteau

LFA-1 : Lymphocyte Function-Associated Antigen-1

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LNH : Lymphomes Non Hodgkiniens

LRPAP1 : LDL-Receptor-related Protein-Associated Protein-1

Lymphocytes T_{FH} : Lymphocytes T Folliculaires Helpers

Lymphocytes Treg : Lymphocytes T régulateurs

MALT : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma

MALT1 : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Protein 1

M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor

MDSC : Cellules Myéloïdes Suppressives

MOMP : Perméabilisation de la Membrane Mitochondriale Externe

MRD : Molecular Residual Disease

MSC : Mesenchymal Stromal Cells

Μφ32 : macrophages stimulés par l'IL-32β

NFkB : Nuclear Factor kappa B

NIK : NFkB Inducing Kinase

NK : Natural Killer

OLS : Organes Lymphoïdes Secondaires

ORR : Overall Response Rate (taux de réponse global)

PAX5 : Paired Box 5

PD1 : Programmed cell Death 1

PD-L1/2 : Programmed Death Ligand 1/2

PDX : xénogreffes de cellules primaires de patients dans des souris

PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5bisphosphate

PLC : Progéniteur Lymphoïde Commun

PMC : Progéniteur Myéloïde Commun

pRB : protéine du Rétinoblastome

PROTAC : Proteolytic Targeting Chimera

RAG : Recombination-Activating Genes

ROI : Region Of Interest

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

RT-MLPA : Reverse Transcriptase Multiplex Ligation-dependant probe Amplification

S1P : Sphigosine-1-Phosphatase

S1PR1 : Sphingosine-1-Phosphate Receptor-1

SIRPa : Signal Regulatory Protein-a

SLAM : Signaling Lymphocytic Activation Molecule

SLC : Surrogate Light Chain

SOX11 : SRY-Box Transcription Factor 11

TAM : Macrophages Associés à la Tumeur

TCR : T Cell Receptor

TIGIT : T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains

TLR : Toll-Like Receptors

TRAF2/TRAF3 : Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factors 2/3

UNG : Uracil-DNA Glycosylase

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1

XBP : X-Box Binding Protein 1

INTRODUCTION

I) La différenciation lymphocytaire B

Au sein de la moelle osseuse, l'hématopoïèse représente le processus permettant de générer l'ensemble des cellules sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34⁺. Les CSH se différencient soit vers un progéniteur myéloïde commun (PMC), permettant de générer le lignage myéloïde (érythrocytes, mégacaryocytes, neutrophiles, monocytes et granulocytes éosinophiles et basophiles), soit vers un progéniteur lymphoïde commun (PLC) afin de générer le lignage lymphoïde (lymphocytes B, lymphocytes T et cellules « Natural Killer » NK) (Eibel et al., 2014 ; Passegué et al., 2003).

Les lymphocytes B constituent les principaux acteurs de la réponse immunitaire à médiation humorale en assurant la production d'anticorps de haute affinité afin d'induire une réponse immunitaire adaptative durable et spécifique d'un antigène étranger. La différenciation des lymphocytes B aboutit à la génération et à la sélection de lymphocytes B mémoire circulants et de plasmocytes sécréteurs d'anticorps dans la moelle osseuse afin de maintenir la mémoire immunologique. L'acquisition d'anticorps de haute affinité nécessite divers processus de modifications génétiques des lymphocytes B qui peuvent aboutir à des erreurs (translocations, mutations...) et entrainer le développement d'hémopathies B **(Seifert et al., 2019)**.

I.1) Etapes précoces de la différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse

I.1.1) Le processus de différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse

La différenciation lymphocytaire B est caractérisée par un processus ordonné de stades distincts de maturation se produisant dans la moelle osseuse aboutissant à la génération des lymphocytes B immatures exprimant une immunoglobuline (Ig) de surface. Les différents stades de maturation des lymphocytes B sont marqués par le réarrangement des chaines lourdes et légères des Ig permettant la formation du « B Cell Receptor » (BCR) à la surface des cellules (Herzog et al., 2009).

Au sein de la moelle osseuse, divers facteurs solubles sont impliqués dans le processus de différenciation lymphocytaire B. En effet, la chemokine CXCL12 sécrétée par les cellules

stromales (fibroblastes, adipocytes, ostéoblastes) se lie à son récepteur CXCR4 exprimé à la surface du CLP entrainant ainsi sa rétention dans la moelle **(Wilson and Trumpp, 2006)**. L'IL-7, également sécrétée par les cellules stromales, joue un rôle dans le développement lymphocytaire B en permettant l'engagement, la prolifération, la maturation et la survie des lymphocytes B **(Milne and Paige, 2006)**.

Le CLP (CD34⁺ CD10⁺ CD19⁻ IgM⁻) est à l'origine de la différenciation des lymphocytes B. Ce processus est contrôlé par les facteurs de transcription « Early B cell Factor 1 » (*EBF1*), *E2A* et « Paired Box 5 » (*PAX5*) qui engagent les cellules en induisant l'expression de gènes spécifiques du lignage lymphocytaire B ainsi qu'une répression des gènes spécifiques des autres lignages (Sanz et al., 2010 ; Medina and Singh, 2005).

Les cellules pro-B (CD34⁺ CD10⁺ CD19⁺ IgM⁻ PAX5⁺) constituent le premier stade d'engagement vers la lignée B. A ce stade du développement, l'IL-7 sécrétée par les cellules stromales se fixe à son récepteur (IL-7R) exprimé par les cellules pro-B entrainant ainsi une activation des voies de signalisation JAK1/3 et STAT5 permettant la prolifération et la survie des cellules. L'IL-7 entraine également une augmentation de l'expression de CXCR4, des protéines « Focal Adhesion Kinase » (FAK) au niveau des cellules pro-B leur permettant de rester à proximité des cellules stromales. Les cellules pro-B expriment également l'intégrine $\alpha4\beta1$ (VLA-4) qui interagit avec VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) exprimé par les cellules stromales (Zehentmeier and Pereira, 2019).

Les cellules pro-B présentent à leur surface des lg constituées de deux régions : une région variable (V), permettant l'interaction avec l'antigène, et une région constante (C), qui assure les fonctions effectrices des Ig. Afin de permettre la fonctionnalité des Ig, les cellules doivent établir des réarrangements des segments d'ADN qui codent pour les régions de la chaîne lourde (H) des gènes variables. Pour permettre ces réarrangements, un processus de recombinaison des segments V_H (variable), D_H (diversité) et J_H (jonction) sur le chromosome 14 se met en place. Cette recombinaison est médiée par les enzymes RAG (Recombination-Activating Genes). Dans un premier temps, un réarrangement D_H-J_H dans les gènes de la chaine lourde se met en place suivi du réarrangement V_H-D_HJ_H. La région variable (V) se connecte ensuite à la région constante (C) du gène de l'Ig. Ce réarrangement permet de créer une diversité des Ig au sein du locus IgH (Figure 1) (Seifert et al., 2019 ; Küppers, 2005 ; Jung et al., 2006).





Figure 1 : Processus de recombinaison des segments $V_H D_H J_H$ *dans les cellules pro-B.* Un réarrangement $D_H - J_H$ dans les gènes de la chaine lourde se met en place suivi du réarrangement $V_H - D_H J_H$. La région variable (V) se connecte ensuite à la région constante (C) du gène de l'Ig. D'après *Küppers, 2005*.

Les cellules pré-B (CD34⁻ CD10⁺ CD19⁺ IgM⁻) expriment à leur surface la chaine lourde des Ig afin de former le pré-BCR. Le pré-BCR est constitué de deux chaines lourdes associées à deux chaines « Surrogate Light Chain » (SLC) et s'associe à ses corécepteurs CD79A (Ig α), CD79B (Ig β) (Winkler and Mårtensson, 2018). La formation du pré-BCR entraine son activation afin de permettre la survie, la prolifération des cellules pré-B ainsi que le réarrangement des chaines légères κ des Ig sur le chromosome 2 ou des chaines légères λ sur le chromosome 22. Le pré-BCR régule également CXCR4 et inhibe l'expression de FAK et de VLA-4 afin de rompre le contact avec les cellules stromales (Zehentmeier and Pereira, 2019). Un premier point de contrôle de la différenciation lymphocytaire B se met en place car seules les cellules pré-B présentant une signalisation active survivent (Herzog et al., 2009).

Les lymphocytes B immatures (CD34⁻ CD10⁺ CD19⁺ IgM⁺) présentent une chaine légère réarrangée et un BCR fonctionnel d'isotype IgM et IgD. Un deuxième point de contrôle de la différenciation lymphocytaire B se met en place afin d'éliminer les lymphocytes B auto-réactifs avant leur sortie de la moelle osseuse. Cette sélection négative comprend les mécanismes de « BCR editing », délétion clonale et anergie (Figure 2) (Melchers, 2015 ; Herzog and Jumaa, 2012 ; Nemazee, 2017).



Figure 2 : Etapes précoces de la différenciation lymphocytaire B dans la moelle osseuse. Au cours de ce processus de différenciation, des réarrangements des gènes des chaines lourdes et légères des lg sont effectués au sein des lymphocytes B afin d'obtenir des lymphocytes B immatures exprimant un BCR fonctionnel. Adapté de Cambier et al., 2007 et Melchers, 2015.

I.1.2) Les lymphocytes B1a

Les CSH d'origine fœtale peuvent également intervenir dans développement lymphocytaire B et notamment l'émergence des lymphocytes B1. Les lymphocytes B1 sont impliqués dans l'immunité innée et adaptative. Ces cellules ont été initialement mises en évidence chez la souris mais les cellules souches hématopoïétiques humaines issues du sang de cordon et de la moelle osseuse adulte peuvent se différencier en lymphocytes B1 *in vivo* dans des modèles de xénotransplantation confirmant une existence de ces cellules chez l'Homme **(Kageyama and Katayama, 2020 ; Baumgarth, 2011)**.

Les lymphocytes B1 se différencient par la suite en lymphocytes B1a CD5⁺ et lymphocytes B1b CD5⁻ qui vont se localiser au niveau des cavités péritonéales. Les lymphocytes B1a expriment des anticorps naturels de faible affinité avec les antigènes exprimés par les pathogènes ainsi que les auto-antigènes. Ces cellules jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire rapide aux infections néonatales. Elles sont également impliquées dans l'auto-tolérance et l'auto-immunité **(Beaudin and Forsberg, 2016)**.

I.2) Etapes tardives de la différenciation lymphocytaire B dans les organes lymphoïdes secondaires

I.2.1) Sortie des lymphocytes B immatures de la moelle osseuse

La sortie des lymphocytes B immatures de la moelle osseuse vers le sang est médiée par la baisse de l'expression de VLA-4 et CXCR4 par les cellules B permettant de rompre les interactions avec les cellules stromales levant ainsi la rétention médullaire (Beck et al., 2014). La migration des cellules vers le sang est également due à la chimio-attraction médiée par la S1P (Sphigosine-1-Phosphatase) qui attire les cellules de la moelle vers le sang (Allende et al., 2010). Dans le sang, les lymphocytes B immatures deviennent des lymphocytes B de transition (Martin et al., 2016 ; Scharer et al., 2019).

I.2.2) Le processus de différenciation lymphocytaire B dans les organes lymphoïdes secondaires

Les lymphocytes B de transition se dirigent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires (OLS) tels que la rate et les ganglions lymphatiques. Cette chimio-attraction est médiée par les chemokines CXCL12, CXCL13, CCL20 et CCL19 qui se lient respectivement aux récepteurs CXCR4, CXCR5, CCR6 et CCR7 exprimés par les cellules. Les lymphocytes deviennent matures et naïfs de l'antigène et entrent dans les OLS par l'intermédiaire des « High Endothelial Vessels » (HEVs) (López-Giral et al., 2004 ; Okada et al., 2002).

Les OLS, tels que la rate et les ganglions lymphatiques, comportent des structures différentes. En effet, la rate est irriguée par le sang périphérique et comporte deux structures distinctes : la pulpe rouge, une zone de senescence des érythrocytes, et la pulpe blanche, responsable de l'initiation de l'immunité adaptative contre les antigènes circulant dans le sang. Ces deux structures sont séparées par la zone marginale essentiellement composée de lymphocytes B et de macrophages (Figure 4A) (Bošnjak et al., 2022). En revanche, les ganglions sont irrigués par le sang mais également par la lymphe. Ils sont organisés en trois structures distinctes : le cortex, formant des follicules primaires contenant les lymphocytes B entourés d'une zone marginale, le paracortex, comprenant les lymphocytes T, et la médulla, composée des lymphocytes B mémoire et des plasmocytes (Figure 4B) (Carbone et al., 2019).

Les antigènes circulant dans le sang sont amenés vers la pulpe blanche où ils sont captés par les macrophages au niveau de la zone marginale dans la rate et sont drainés par le système lymphatique avant d'être captés par les macrophages et transférés dans la région inter folliculaire dans les ganglions (Batista and Harwood, 2009). Les lymphocytes B matures et naïfs (IgM⁺ IgD⁺ CD19⁺ CD27⁻) rencontrent ainsi l'antigène soluble ou associé à une cellule présentatrice d'antigène (CPA), une cellule folliculaire dendritique (FDC), entrainant l'activation du BCR et la migration des cellules vers les follicules primaires. En parallèle, les lymphocytes T CD4⁺ rencontrent un antigène présenté par une CPA et se différencient en lymphocytes T folliculaires helpers (TFH). Les protéines transmembranaires SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) médient le contact initial entre les lymphocytes T_{FH} et les lymphocytes B de manière non spécifique à l'antigène. Les lymphocytes B ayant rencontré l'antigène vont l'internaliser pour le présenter par la suite sous forme de peptide à la membrane associé au complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II) au « T cell Receptor » (TCR) exprimé à la surface des lymphocytes T_{FH}. Une forte affinité permet de mettre en place la synapse immunologique où d'autres interactions rentrent en jeux avec notamment l'interaction du CD40 (à la surface des lymphocytes B) avec le CD40L (exprimé par les lymphocytes T_{FH}) (Figure 3). Ces interactions avec les lymphocytes T_{FH} activent les lymphocytes B (Seifert et al., 2019; McHeyzer-Williams et al., 2011; Schwickert et al., 2011 ; De Silva and Klein, 2015 ; Biram et al., 2019).

Une partie des lymphocytes B activés et sélectionnés se déplace vers la médulla pour se différencier en plasmablastes à courte durée de vie qui sécrètent des anticorps de faible affinité pour l'antigène. Un sous ensemble des lymphocytes B activés migre avec les lymphocytes T_{FH} pour initier la réaction du centre germinatif (GC) (**De Silva and Klein, 2015**). L'interaction entre les intégrines LFA-1 (Lymphocyte Function-Associated Antigen-1), exprimée par les lymphocytes T_{FH}, et ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), à la surface des lymphocytes B, est nécessaire afin d'établir un contact durable entre les deux types cellulaires et pour leur migration dans le follicule pour la formation du GC (Figure 3) (Biram et al., 2019).



Figure 3 : Interactions lors de la reconnaissance des lymphocytes B par les lymphocytes T_{FH} durant la formation du GC. Les lymphocytes B adhèrent aux lymphocytes T_{FH} de manière non spécifique à l'antigène grâce aux protéines SLAM. Par la suite, les lymphocytes T_{FH} reconnaissent spécifiquement le complexe peptide-CMH II présenté par les lymphocytes B. L'interaction CD40/CD40L rentre ensuite en jeu puis l'interaction entre les intégrines ICAM-1 et LFA-1 permet d'établir un contact de longue durée. D'après **Biram et al., 2019**.

Au sein du GC, les lymphocytes B se développent et se différencient en centroblastes qui se divisent rapidement et commencent à peupler le réseau de FDC au centre des follicules. A ce stade, la zone du manteau qui entoure le GC se forme. La prolifération des centroblastes entraine la formation de deux zones au sein du GC : la zone sombre et la zone claire. Dans la zone sombre, les centroblastes prolifèrent rapidement et subissent des hypermutations somatiques qui constituent des mutations au niveau des régions variables des lg induites par l'enzyme AID (Activation Induced cytidine Deaminase). Ces hypermutations somatiques permettent de diminuer ou augmenter leur affinité pour l'antigène et d'entrainer une diversification du BCR (De Silva and Klein, 2015 ; Carbone et al., 2019 ; Y. Zhang et al., 2016).

Lorsque les centroblastes entrent dans la zone claire, ils se différencient en centrocytes. Au sein de la zone claire, une coopération des centrocytes avec les lymphocytes T_{FH} et les FDC jouant le rôle de CPA s'établit **(Figure 4B** et **Figure 5)**. Une sélection d'affinité des centrocytes par les lymphocytes T_{FH} se met en place. Si l'affinité à l'antigène est faible, les lymphocytes T_{FH} ne sélectionnent pas les centrocytes qui meurent par la suite par apoptose. Au contraire,

si l'affinité à l'antigène est forte, les lymphocytes T_{FH} sélectionnent les centrocytes en leur envoyant des signaux de différenciation leur permettant ainsi de migrer à nouveau dans la zone sombre pour proliférer et subir de nouvelles hypermutations somatiques puis une nouvelle sélection dans la zone claire. Ce processus de passage de la zone claire à la zone sombre est appelé « recycling » (Figure 4B) (Carbone et al., 2019 ; De Silva and Klein, 2015 ; Zhang et al., 2022 ; Y. Zhang et al., 2016 ; Stebegg et al., 2018).

Au sein de la zone claire, un phénomène de commutation de classe, un réarrangement intrachromosomique de l'ADN du locus de la chaîne lourde des Ig, se met en place. Ce processus est induit par les enzymes AID, UNG (Uracil-DNA Glycosylase) et APE1 (Apurinic-Apyrimidinic Endonuclease 1) qui permettent un ciblage spécifique des zones introniques appelées régions de commutation. En conséquence, les lymphocytes expriment des anticorps de classe IgA, IgG ou IgE différents dans leurs fonctions effectrices sans altérer la spécificité pour l'antigène (**Roco et al., 2019**).

Les mouvements des cellules au sein de la zone sombre et de la zone claire du CG sont organisés par l'expression des récepteurs de chemokines CXCR4 et CXCR5 par les centroblastes et centrocytes. En effet, dans la zone sombre, les centroblastes présentent un phénotype CXCR4^{hi} CD83^{low} CD86^{low} alors que dans la zone claire, les centrocytes expriment CXCR4^{low} CD83^{hi} CD86^{hi}. Les centroblastes sont dépendants de l'expression de CXCR4 alors que les centrocytes dépendent de CXCR5 (**De Silva and Klein, 2015 ; Allen et al., 2004**).

Les signaux de différenciation des centrocytes induits par les lymphocytes T_{FH} peuvent également leur permette de poursuivre leur processus de différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps à longue durée de vie ou en lymphocytes B mémoire dans la zone marginale (Mesin et al., 2016).

Au cours de ces différents stades de maturation des lymphocytes B dans les OLS, des anomalies peuvent émerger et conduire au développement d'hémopathies B malignes (Figure 4B) (Carbone et al., 2019).



Figure 4 : Structure des organes lymphoïdes secondaires, sélection des lymphocytes B dans les GC et hémopathies B associées. (A) La rate est composée de trois structures

distinctes : la pulpe rouge et la pulpe blanche séparées par la zone marginale. La pulpe blanche représente la zone d'interaction entre les lymphocytes B et T. **(B)** Les ganglions lymphatiques sont composés de trois structures : le cortex formant des follicules primaires et contenant les lymphocytes B, le paracortex comprenant les lymphocytes T, et la médulla composée des lymphocytes B mémoire et des plasmocytes. Dans l'espace interfolliculaire, les lymphocytes B rencontrent l'antigène et interagissent avec les lymphocytes T_{FH} pour former la réaction du GC. Au sein du GC, les centroblastes prolifèrent rapidement et forment deux zones : la zone sombre et la zone claire qui sont entourées par la zone du manteau. Dans la zone sombre, les centroblastes subissent des hypermutations somatiques. Au niveau de la zone claire, les centroblastes se différencient en centrocytes qui subissent une sélection d'affinité par les lymphocytes T_{FH}. Ces différentes étapes permettent la génération de plasmocytes sécréteurs d'anticorps à longue durée de vie ainsi que de lymphocytes B mémoire. Au cours de ces différents stades de maturation des lymphocytes B, des hémopathies B peuvent émerger. Adapté de **Bošnjak et al., 2022, Carbone et al., 2019** et **Akkaya et al., 2020**.



Figure 5 : Anatomie du centre germinatif en immunohistochimie et microscopie multiphotonique intravitale. (A) Le GC est divisé en deux zones : la zone claire (composée de FDC, lymphocytes B du GC, lymphocytes B naïfs, lymphocytes T, cellules dendritiques dérivées de la moelle (cDCs) et macrophages (TBMs)) et la zone sombre (composée de lymphocytes B du GC et de macrophages). Immunohistochimie sur un tissu congelé de souris transgénique. (B) Réseau de cellules dendritiques dans le GC. Immunohistochimie sur un tissu

congelé de souris transgénique. (C) Microscopie multiphotonique intravitale chez une souris transgénique CD11c-YFP exprimant YFP montrant la morphologie d'un lymphocyte B du GC en comparaison aux lymphocytes B naïfs et lymphocytes T. Les lymphocytes B du GC présentent une morphologie hautement polarisée et sont de plus grande taille que les lymphocytes B naïfs. (D) Interactions entre un macrophages et les lymphocytes B du GC. Image multiphotonique d'un explant de tissu non vivant provenant d'une souris transgénique CD11c-YFP. D'après Victora et al., 2010 et Victora and Nussenzweig, 2012.

I.3) La différenciation terminale des lymphocytes B en plasmocytes et lymphocytes B mémoire

I.3.1) La différenciation des lymphocytes B en plasmocytes

La différenciation des lymphocytes B en plasmocytes dépend de la régulation transcriptionnelle des gènes *BLIMP1* (B Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1), *XBP1* (X-Box Binding Protein 1) et *IRF4* (interferon-regulatory factor 4) qui entrainent une répression de l'expression de *PAX5* et *BCL6* (B-Cell Lymphoma 6) nécessaires au développement des lymphocytes B dans le GC (Shapiro-Shelef and Calame, 2005).

Les plasmablastes migrent dans la moelle osseuse et se lient aux cellules stromales via les interactions CXCL12/CXCR4 et VCAM-1/VLA-4. L'expression du récepteur S1PR1 (Sphingosine-1-Phosphate Receptor-1) est également nécessaire pour la sortie des plasmablastes des OLS et leur homing vers la moelle osseuse. Au sein de la moelle osseuse, les plasmablastes vont se différencier en plasmocytes à longue durée de vie. Divers facteurs solubles sécrétés par les cellules stromales et les éosinophiles permettent de maintenir les plasmocytes dans la niche médullaire tels que l'IL-6, CXCL12 et APRIL (A Proliferation Inducing Ligand) (Figure 6) (Kabashima et al., 2006 ; Nutt et al., 2015). Les plasmocytes à longue durée de vie sécrètent une lg de forte affinité contre un antigène et agissent comme une première ligne de défense lors de la réinfection par un pathogène assurant ainsi la mémoire humorale constitutive (Inoue et al., 2018).



Figure 6 : La niche médullaire des plasmocytes. Au sein de la moelle osseuse, les plasmocytes interagissent avec les cellules stromales grâce à l'interaction CXCL12/CCR4 et VCAM-1/VLA-4. Les cellules stromales et les éosinophiles sécrètent des facteurs solubles permettant de maintenir la survie des plasmocytes tels que l'IL-6, CXCL12 et APRIL. D'après **Nutt et al., 2015**.

I.3.2) La différenciation des lymphocytes B en lymphocytes B mémoire

Les lymphocytes B mémoire (CD19⁺ CD27⁺) sont issus de la différenciation dépendante des lymphocytes T à la bordure des zones T et B (stade pré-GC) et pendant la réaction du CG. Ils agissent comme une seconde ligne de défense lors de la réinfection par un pathogène et assurent la réponse humorale réactive **(Inoue et al., 2018)**.

Une fois différenciés, les lymphocytes B mémoire circulent dans l'organisme dans un état de repos jusqu'à leur réactivation. Lorsque les cellules sont réactivées par l'antigène, elles prolifèrent très rapidement et se différencient majoritairement en plasmocytes sécréteurs d'Ig ou réintègrent la réaction du GC afin de générer de nouveaux lymphocytes B mémoire **(Seifert and Küppers, 2016)**.

II) Le Lymphome à Cellules du Manteau

II.1) Epidémiologie et présentation clinique

Le Lymphome à Cellules du Manteau (LCM) est une hémopathie B maligne représentant 5 à 7% des Lymphomes Non Hodgkiniens (LNH). L'âge médian au diagnostic est de 65-70 ans avec une survie globale de 5 à 7 ans. Il s'agit d'un lymphome rare et agressif qui touche principalement les hommes (ratio 3/1) et qui reste aujourd'hui incurable. Son incidence est de 1 nouveau cas pour 100 000 personnes par an en France (Vose, 2017 ; Silkenstedt et al., 2021 ; Leux et al., 2014).

Les cellules de LCM sont des lymphocytes B localisés dans les OLS, les ganglions et la rate, et plus précisément dans la zone du manteau qui entoure les GC. Les cellules tumorales vont alors proliférer dans leur niche primaire d'expansion avant de se disséminer dans les tissus extranodaux tels que la moelle osseuse et le sang périphérique (Papin et al., 2018). Le LCM est caractérisé par la translocation chromosomique t(11 ;14) q(13 ;32), survenant au stade pré-B dans la moelle osseuse lors du réarrangement VDJ du locus *IGH* médié par les recombinases RAG. Cette translocation place le gène *CCND1*, qui code pour la cycline D1, sous le contrôle d'un enhancer du gène *IGH* entrainant une surexpression de la cycline D1 et une dérégulation du cycle cellulaire (Jares et al., 2012 ; Nadeu et al., 2020).

Les patients atteints par cette pathologie présentent des lymphadénopathies dont la plupart sont diagnostiquées à un stade avancé de la maladie. Des manifestations extranodales sont retrouvées chez 90% des patients avec notamment une dissémination des cellules tumorales dans la moelle osseuse (53-82% des cas) et le sang (50% des cas). Des infiltrations au niveau du foie (25% des cas) et du tractus gastro-intestinal (20 à 60% des cas) sont également retrouvées ainsi qu'une splénomégalie chez 40% des patients (Silkenstedt et al., 2021). Malgré des taux de réponses globales supérieures à 70% avec des immuno-chimiothérapies standard, l'évolution clinique de cette pathologie reste très agressive (Rule, 2019). D'autre part, un sous-ensemble de patients peut suivre une évolution clinique indolente et ne pas nécessiter de traitement pendant une longue période (Jares et al., 2007).

II.2) Présentation biologique : hétérogénéité de la pathologie

Les cellules de LCM présentent un phénotype de lymphocytes B matures avec une expression des Ig de surface IgM et IgG, des antigènes associés aux lymphocytes B tels que CD19, CD20, CD22, CD79 ainsi que l'antigène CD5 exprimé par des lymphocytes B et surtout par les lymphocytes T. Cependant, les cellules tumorales n'expriment pas CD23, un marqueur cellulaire clé impliqué dans l'activation et la croissance des lymphocytes B. De plus, l'expression de la cycline D1 est une caractéristique diagnostique du LCM. Tous ces marqueurs permettent de distinguer les cellules de LCM des autres lymphocytes B tumoraux (Jares et al., 2007; Navarro et al., 2012).

Les lymphocytes B1a pourraient être à l'origine du développement de la pathologie. En effet, les cellules de LCM présentent un phénotype et un BCR qui sont spécifiques des lymphocytes B1a, une forte activation de la voie du BCR ainsi qu'une forte activité protéase de MALT1 (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation protein 1) impliquée dans l'activation de la voie NFkB (Nuclear Factor kappa B) **(Pieters et al., 2021)**.

Malgré son phénotype caractéristique, le LCM est une pathologie hétérogène et complexe qui se divise en trois sous-types et quatre groupes pronostiques qui se distinguent de façon histologique, biologique, génétique et clinique **(Yi et al., 2022)**.

II.3) Les anomalies liées au développement du LCM

II.3.1) La translocation t(11;14)(q13;q32)

La cycline D1 est une protéine impliquée dans le passage des cellules de la phase G1 à la phase S lors du cycle cellulaire. Durant la phase G1, la cycline D1 se fixe aux protéines kinases dépendantes des cyclines CDK4 et CDK6 afin de former un complexe capable de phosphoryler la protéine du rétinoblastome (pRB). La phosphorylation de pRB entraine alors la libération du facteur de transcription E2F qui régule les gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire permettant ainsi le passage en phase S et une prolifération des cellules tumorales (Figure 7) (Bartek and Lukas, 2011).



Figure 7 : Rôle de la cycline D1 dans la régulation du cycle cellulaire. La translocation chromosomique t(11;14)(q13;q32) conduit à une surexpression de la cycline D1 dans les cellules de LCM. La cycline D1 forme un complexe avec les kinases CDK4/6 qui phosphoryle la pRB entrainant une libération du facteur de transcription E2F qui régule les gènes impliqués dans la phase S du cycle cellulaire. Adapté de Inamdar et al., 2016 et **Bartek and Lukas, 2011**.

La cycline D1 interagit également avec des facteurs de transcription ainsi que des enzymes de remodelage de la chromatine et de modification des histones lui permettant d'avoir un rôle dans la régulation transcriptionnelle **(Albero et al., 2018)**. Une étude récente montre qu'une expression importante de la signature transcriptionnelle dépendante de la cycline D1 est associée à un mauvais pronostic et à une diminution de la survie chez les patients et pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse du LCM **(Demajo et al., 2021)**.

La cycline D1 est localisée au niveau nucléaire, où elle contrôle la prolifération des cellules, mais également au niveau de la membrane mitochondriale externe et du cytoplasme chez les cas blastoïdes plus agressifs. Grâce à sa distribution subcellulaire et à ses différents partenaires d'interaction, la cycline D1 est impliquée dans la régulation de la réponse aux dommages de l'ADN, la duplication et la stabilité des chromosomes, la sénescence, la fonction mitochondriale et la migration qui représentent les processus clé permettant l'initiation de la cancérogenèse (**Body et al., 2017**).

Des mutations de la région N-terminale de la cycline D1 ont été mises en évidence chez les patients atteint de LCM entrainant une augmentation de la stabilité et la quantité de la protéine. D'autre part, une étude génomique a permis d'identifier des mutations somatiques dans l'exon 1 du gène *CCND1* dans 18 à 35% des cas de LCM. La mutation Y44D a notamment été identifiée comme impliquée dans la résistance des cellules de LCM à l'Ibrutinib (inhibiteur de la « Bruton's Tyrosine Kinase » BTK qui se lie de manière spécifique à la cystéine en position 481 dans le domaine kinase pour bloquer son activité) *in vitro* (Mohanty et al., 2016).

La surexpression constitutive de la cycline D1 qui résulte de la translocation chromosomique t(11;14) (q13;q32) est l'étape oncogénique caractéristique retrouvée chez 99% des patients atteints de LCM mais un sous-groupe de patients Cycline D1⁻ (1% des cas) a été observée **(Royo et al., 2011)**. Environ la moitié des LCM cycline D1⁻ présentent des translocations du gène qui code pour la cycline D2 (*CCND2*) et 16% des cas présentent une surexpression de la cycline D3 (*CCND3*). Ces données suggèrent que d'autres membres de la famille des cyclines D pourraient jouer un rôle oncogène dans le développement du LCM. D'autre part, il existe une sous population très rare de LCM triple négatif cycline D1⁻D2⁻D3⁻ qui présente une surexpression de la cycline E qui est associée à des cas blastoïdes **(Swerdlow et al., 2016; Martín-Garcia et al., 2019)**.

II.3.2) SOX11 : le facteur clé oncogénique

II.3.2.1) Rôle et régulation de SOX11 dans le LCM

Le gène SOX11 (SRY-Box Transcription Factor 11) est un facteur de transcription non exprimé dans les cellules lymphoïdes normales et exprimé chez 80 à 90% des patients jouant un rôle oncogène dans le développement du LCM (Matsuoka et al., 2020).

SOX11 pourrait contribuer à la pathogenèse du LCM en se liant aux régions régulatrices des deux facteurs de transcription *PAX5* (impliqué dans le développement précoce et la différenciation tardive des lymphocytes B) et de *BCL6* (qui régule l'entrée et le maintien des lymphocytes B dans le GC) **(Navarro et al., 2020 ; Beà and Amador, 2017)**. En effet, *SOX11* réprime *BCL6* empêchant ainsi l'entrée des cellules dans le GC et active *PAX5*, impliqué dans le blocage de la différenciation des lymphocytes B, favorisant la croissance et la migration des cellules tumorales vers les ganglions lymphatiques *via* l'activation de l'axe CXCR4/FAK/PI3K/AKT. *SOX11* est également impliqué dans le ganglions. A l'inverse, les cellules

tumorales SOX11⁻ présentent un faible potentiel invasif et restent dans le sang en tant que leucémie (Balsas et al., 2017).

Concernant la régulation de *SOX11*, une étude montre que la cycline D1 est capable de réduire le recrutement des deux histones désacétylases HDAC1 et HDAC2 au niveau du promoteur de *SOX11* entrainant ainsi une augmentation de l'acétylation des histones et de la transcription de ce facteur. Le facteur de transcription *STAT3* est également impliqué dans la régulation de ce gène en se fixant au niveau de promoteur et d'un enhancer de *SOX11* entrainant ainsi une répression de sa transcription (**Mohanty et al., 2019**).

II.3.2.2) Les différents sous-types du LCM associés à l'expression de SOX11

SOX11 est un facteur définissant le destin des cellules de LCM. En effet, l'analyse immunohistochimique de *SOX11* permet l'identification des différents sous-ensembles de LMC. De plus, l'expression de ce marqueur est retrouvée exclusivement dans le LCM en comparaison aux autres LNH (Federmann et al., 2020).

Le sous-type de LCM correspondant à la néoplasie *in situ* des cellules du manteau (ISMCN) est caractérisé par la présence de cellules cycline D1⁺ dans la zone du manteau qui entoure les GC des OLS. Bien que disséminé, ce sous type très rare semble avoir un faible taux de progression ce qui contribue au développement lent de la pathologie ainsi qu'à son caractère indolent. Contrairement au sous-type leucémique non-nodal qui présente une distribution des cellules tumorales dans le sang périphérique, la moelle osseuse et la rate, les cellules tumorales de l'ISMCN restent localisées au niveau de la couche interne de la zone du manteau faisant de ce sous-type un modèle *in situ* sur le plan histologique (Choi and O'Malley, 2018 ; Swerdlow et al., 2016 ; Roué and Sola, 2020 ; Matsuoka et al., 2020).

La forme classique/conventionnelle représente 80 à 90% des cas de LCM et est définie par une surexpression de l'oncogène *SOX11* et par l'absence de mutations dans la région hypervariable du gène *IGHV*. L'origine des cellules tumorales peut varier de lymphocytes B naïfs et matures sans hypermutations somatiques témoignant d'une absence de stimulation antigénique à lymphocytes B ayant subi la réaction du GC (lymphocytes B pro-GC) avec un faible taux d'hypermutations somatiques. Les cellules tumorales possèdent donc une empreinte épigénétique de lymphocyte B précédant le GC, présentent une instabilité génétique et colonisent la zone du manteau des ganglions lymphatiques ainsi que d'autres sites extranodaux. De plus, *SOX11* favorise l'angiogenèse *via* l'activation de la voie PDGFA permettant ainsi une croissance tumorale dans les ganglions. Sur le plan histologique, les cas de LCM classiques présentent des lymphocytes de taille petite à moyenne très proliférants

avec des noyaux irréguliers et clivés, une chromatine dense, des nucléoles peu visibles ainsi que des centroblastes absents. Ce sous-type présente un comportement clinique généralement agressif (Figures 8 et 9) (Silkenstedt et al., 2021 ; Beà and Amador, 2017 ; Queirós et al., 2016).

Le sous-type LCM leucémique non-nodal représentant 10 à 20% des cas. Les cellules tumorales portent des empreintes épigénétiques de lymphocytes B mémoire ayant subi la réaction du GC (Navarro et al., 2012 ; Queirós et al., 2016). Les cellules tumorales *SOX11*⁻ et *BCL6*⁺ colonisent la zone marginale des follicules lymphoïdes avant de rentrer dans le GC, acquérir des hypermutations somatiques du gène *IGHV* et procéder à la différenciation post-GC (Beà and Amador, 2017). Les cas *SOX11*⁻ présentent une angiogenèse faible en raison du faible niveau de *PDGFA*. Les cellules tumorales colonisent le sang périphérique, la moelle osseuse et la rate. Ce sous-type de LCM est caractérisé par une stabilité génétique et une maladie stable et indolente avec une survie globale plus longue des patients même en l'absence de chimiothérapie (Figures 8 et 9) (Roué and Sola, 2020 ; Beà and Amador, 2017).

Quel que soit le sous-type de LCM, l'acquisition d'anomalies moléculaires/cytogénétiques supplémentaires telles que des mutations de *TP53, NOTCH1* et *NOTCH2* peuvent conduire au développement d'un LCM plus agressif de type blastoïde ou pléomorphe. Le LCM blastoïde se caractérise par des cellules néoplasiques similaires à des lymphoblastes avec des noyaux arrondis, une chromatine finement dispersée, des nucléoles peu visibles. Certains cas présentent des cellules plus grandes avec des noyaux irréguliers, pléomorphes et distincts. Ces deux cas présentent généralement une prolifération plus élevée avec une forte expression du marqueur KI67. Les LCM blastoïdes et pléomorphes sont de mauvais pronostic et sont associés à une évolution clinique plus agressive avec des résultats cliniques inférieurs (Figures 8 et 9) (Jares et al., 2007 ; Federmann et al., 2020 ; Roué and Sola, 2020 ; Beà and Amador, 2017).



Figure 8 : Les différents sous-types du LCM. La cellule pré-B acquiert la translocation chromosomique t(11;14) caractéristique du LCM aboutissant à la surexpression de la cycline D1. Dans certains cas, la cycline D2 peut également être surexprimée. Les clones colonisent ensuite la zone du manteau (MZ) des follicules lymphoïdes. Les cellules cycline D1⁺ peuvent rester dans la zone du manteau interne des follicules et former le sous-type ISMCN indolent. Le destin cellulaire dépend par la suite de l'expression de SOX11. Si les cellules de LCM expriment SOX11 (LCM classique / conventionnel), PAX5 est alors exprimé et entraine l'inactivation de Blimp1 bloquant ainsi la différenciation des cellules B et BCL6 est inhibé empêchant l'entrée des cellules dans les CG. Les cellules tumorales prolifèrent alors dans la zone du manteau et peuvent coloniser d'autres sites extranodaux. Si les cellules de LCM n'expriment pas SOX11 (LCM leucémique non nodal), BCL6 est alors exprimé et permet une entrée des cellules dans les GC afin d'acquérir des hypermutations somatiques du gène IGHV et procéder à la différenciation post-GC. Les cellules colonisent ensuite le sang périphérique et la moelle osseuse. Certaines anomalies secondaires, impliquant généralement TP53, NOTCH1 et NOTCH2 peuvent survenir et conduire au développement d'une maladie plus agressive de type blastoïde ou pléomorphe. D'après Beà and Amador, 2017.



Figure 9 : Analyse cytologique et histologique des différents sous-types de LCM dans des frottis de moelle osseuse (coloration wright-giemsa) et des biopsies de ganglions et de rate (coloration hématoxyline éosine). (A) LCM leucémique non-nodal : les cellules tumorales cycline D1⁺ entrent dans le GC (panel gauche) pour subir des hypermutations somatiques IGHV avant de se propager dans le sang périphérique, la moelle osseuse (panel du centre) et la rate (panel droit) plutôt que dans les ganglions lymphatiques. (B) LCM classique : les cellules tumorales cycline D1⁺ se localisent dans la zone du manteau qui entoure le GC (panel gauche). La coloration histologique dans des coupes de ganglions met en évidence la présence de lymphocytes de petite taille avec des noyaux irréguliers, une chromatine dense ainsi que des nucléoles peu visibles (panel du centre et panel droit). (C) LCM blastoïde : les cellules de LCM blastoïde dans la moelle (panel gauche) et dans les ganglions (panel du centre et panel droit) sont de taille moyenne et présentent des noyaux arrondis, une chromatine finement dispersée ainsi que des nucléoles peu visibles. (D) LCM pléomorphe : les cellules de LCM dans la moelle (panel gauche) et dans les ganglions (panel du centre et panel droit) présentent des tailles très variables ainsi que des noyaux irréguliers, pléomorphes et distincts avec des nucléoles très visibles. Adapté de Jares et al., 2012, Jares et al., 2007 et Khoury et al., 2003.

II.3.3) Instabilité génomique dans le LCM

La translocation chromosomique t(11;14)(q13;32) présente un rôle majeur dans le LCM mais n'est pas suffisante pour permettre l'initiation de la pathologie. En effet, l'accumulation d'anomalies génétiques secondaires contribue également au développement du LCM. Certaines mutations ont été identifiées sur les gènes impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN comme ATM (40 à 75%) ou TP53 (28%), dans le cycle cellulaire comme CCND1 (35%), CDKN2A (21%) ou RB1 (23%) mais aussi dans la régulation épigénétique comme KMT2D (17 à 23%), KMT2C (5 à 16%), SMARCA4 (15%) et SP140 (13%) (Beà et al., 2013 ; Nadeu et al., 2020 ; Jain and Wang, 2022 ; Navarro et al., 2020 ; Hill et al., 2020). Des mutations de MYC (20%) ainsi que des gènes impliqués dans la voie de signalisation Notch comme NOTCH1/2 (10 à 14%) ont également été mises en évidence. Les mutations de BIRC3 (Baculoviral IAP Repeat Containing 3, 22% des cas) et TRAF2 (Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factors 2, 15% des cas) associées à une activation constitutive de la voie alterne de NFkB ont été identifiées comme impliquées dans la résistance du LCM à l'Ibrutinib. Des mutations moins fréquentes des gènes CARD11 (9%) et MAP3K14 (3%) impliqués dans l'activation de la voie NFkB sont également retrouvées chez certains patients (Nadeu et al., 2020 ; Saba et al., 2016 ; Hill et al., 2020).

II.3.4) Régulation épigénétique dans le LCM

Au cours des dernières années, la caractérisation des méthylomes des cellules tumorales a montré que la dérégulation épigénétique, telles que la méthylation de l'ADN et la modification des histones, présente un rôle dans le développement du LCM (Navarro et al., 2020 ; Queirós et al., 2016 ; Sadeghi and Wright, 2021). L'ADN des cellules de LCM est globalement hyperméthylé, associé à une prolifération plus importante et au comportement agressif ainsi qu'à la survie des cellules tumorales, et hypométhylé au niveau de régions promotrices de gènes cibles tels que *SOX11* (Jain and Wang, 2022 ; Sadeghi and Wright, 2021 ; Queirós et al., 2016).

La complexité génomique ainsi que les modifications de la méthylation de l'ADN peuvent être liées à une division incontrôlée des cellules tumorales. Ainsi, un score d'horloge mitotique basé sur la méthylation de l'ADN nommé EpiCMIT (Epigenetically determined Cumulative Mitoses) a récemment été établi afin de comprendre l'histoire proliférative des cellules tumorales. Cette signature corrèle avec les signatures mutationnelles liées à la division cellulaire (*SBS1, SBS5* et *SBS9*) ainsi que l'index de prolifération KI67. Cette étude a mis en évidence que des altérations génomiques spécifiques de *CDKN2A*, *TP53* et *MYC* peuvent influencer le potentiel prolifératif des cellules tumorales. Un score élevé est donc associé à une prolifération cellulaire

32

accrue et une évolution agressive du LCM et pourrait présenter une valeur pronostique pour les patients en intégrant les paramètres génomiques et épigénétiques (Nadeu et al., 2020). D'autre part, une étude menée par l'équipe du Dr Queiros a établi une classification des cellules de LCM basée sur leur empreinte épigénétique. Les différents clusters sont constitués par des cellules présentant un ADN méthylé et une empreinte épigénétique de lymphocytes B inexpérimentés ou expérimentés et mémoire du GC (Queirós et al., 2016).

Dans les cellules de LCM, le gène impliqué dans la régulation épigénétique le plus fréquemment muté est *KMT2D* (17 à 23%). D'autres modificateur épigénétiques tels que *KMT2C* (5 à 16%), *BMI1* (6 à 12%) et *TET2* (5 à 12%) sont retrouvés dérégulés chez certains patients. Des mutations sont également retrouvées dans le domaine catalytique de NSD2 et sont associées à une méthylation globale de la chromatine ainsi qu'à la surexpression de signatures liées à la prolifération et au cycle cellulaire. Des altérations de gènes impliqués dans les complexes de remodelage de la chromatine SWI-SNF telles que des mutations de *SMARCA4* (5-12%) ou les délétions impliquant *SMARCA2* sont retrouvées chez des patients en rechute/réfractaires. Ces altérations entrainent une surexpression de BCL-XL ce qui confère une résistance à l'Ibrutinib et au Venetoclax (inhibiteur de BCL2 (B Cell-Lymphoma 2)) chez les patients (Navarro et al., 2020 ; Agarwal et al., 2019 ; Sadeghi and Wright, 2021).

D'autre part, l'ADN méthyltransférase-1 (DNMT-1) est régulée à la hausse dans le LCM, entraînant une perturbation globale de la méthylation de l'ADN (Li et al., 2017 ; Sadeghi and Wright, 2021). Le modificateur de chromatine *EZH2*, un membre essentiel du complexe répressif polycomb, est surexprimé dans le LCM (Kanduri et al., 2013). De plus, l'augmentation de l'activité des HDAC a été décrite dans l'inhibition de la transcription de gènes cibles tels que *BCL2L11*, *PMAIP1* et *BMF*, trois membres pro-apoptotiques de la famille BCL2. Cette action permet de bloquer l'apoptose et de soutenir la survie tumorale (Sadeghi and Wright, 2021 ; Xargay-Torrent et al., 2011).

II.4) Les différents sous-groupes pronostiques du LCM

Une analyse génomique et transcriptomique réalisée pour 134 patients atteints de LCM et menée en 2022 par l'équipe du Dr Shuhua Yi a été réalisée afin de déterminer les mutations génétiques susceptibles de contribuer au développement de la pathologie et de comprendre l'origine cellulaire des différents sous-types de LCM. De plus, à l'aide d'échantillons longitudinaux, cette étude a permis de définir un ordre temporel des altérations génétiques liés à l'évolution clonale. Quatre groupes ont été identifiés et se caractérisent par différents profils transcriptomiques associés à des sous-types différents de la pathologie.

Le cluster 1 est caractérisé par une signature génétique de lymphocytes B mémoire avec des mutations des gènes *IGHV*, *CCND1*, *TP53*, une amplification 11q13 ainsi qu'une signalisation BCR active. Les patients de ce groupe présentant ou non des mutations de *TP53* ont une survie globale similaire. Les cellules présentent une faible expression de *SOX11* permettant d'associer ce cluster aux patients atteints d'un LCM leucémique non nodale avec le meilleur pronostic.

Le cluster 2 est défini par une délétion de 11q et des mutations d'*ATM*. Une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN et l'hyperprolifération est également observée dans les cellules de ce cluster. Les cellules présentent également un enrichissement des gènes impliqués dans l'activation de la signalisation TNFa *via* la voie NFkB ainsi que la réponse à l'IFNa et à l'IFNy. Ce cluster est associé à un LCM classique.

Le cluster 3 est associé à des mutations de *NOTCH1, NSD2, SP140* et *KMT2D*, une amplification de 13q et une délétion de 6q. Contrairement au cluster 2, le cluster 3 présente une diminution de la régulation de TNFa *via* la voie NFkB et de la réponse à l'IFNγ ainsi qu'une activation de la voie NOTCH. De plus, la signalisation du BCR, de l'IL-2 et de STAT5 ainsi que les cibles de *MYC* sont régulées à la baisse dans ce cluster. Ce cluster est associé à un LCM agressif.

Le cluster 4 présente le plus grand nombre d'altérations somatiques du nombre de copies, notamment les délétions del(17p), del(13q) et del(9p) et des mutations de *TP53* et de *TRAF2*. Les cellules présentent des signatures génétiques associés à une voie MYC active. Le cluster 4 est associé à un LCM blastoïde ou pléomorphe avec le plus mauvais pronostic (Figure 10) (Yi et al., 2022 ; Jain and Wang, 2022).



Figure 10 : Représentation des quatre sous-groupes pronostiques du LCM. Les cellules du cluster 1 portent la signature des lymphocytes B mémoire et appartiennent au sous-type de LCM leucémique non nodale qui présentent une évolution clinique indolente. Les cellules du cluster 2, présentant la signature des lymphocytes B naïfs, sont associées à un LCM classique. Les cellules des clusters 3 et 4 présentent une signature de lymphocytes B naïfs, sont associées à des LCM plus agressifs. Les cellules du cluster 4 sont associées à un LCM blastoïde/pléomorphe et présentent une évolution clinique plus agressive. D'après **Yi et al., 2022**.

II.5) Rôle du microenvironnement tumoral dans la progression du LCM

II.5.1) Arguments sur le rôle du microenvironnement

Les anomalies intrinsèques à la cellule tumorale telles que les anomalies génétiques et épigénétiques ne permettent pas à elles-seules la progression tumorale. Depuis quelques années, l'étude de la communication intercellulaire au sein du microenvironnement tumoral représente un axe majeur de la recherche en cancérologie permettant de considérer le cancer comme un écosystème tumoral. Les cellules tumorales semblent en effet dépendantes des cellules présentes dans leur microenvironnement pour leur survie, leur prolifération, leur chimiorésistance ainsi que leur immuno-évasion (Hanahan and Weinberg, 2011; Maman and Witz, 2018). Dans un premier temps identifié dans les cancers solides, le rôle central du microenvironnement tumoral a également été mis en évidence dans les hémopathies B telles que le LCM (Puente et al., 2018; Liu et al., 2021; Scott and Gascoyne, 2014).

Les cellules primaires de LCM isolées ne survivent pas lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*. De plus, la prolifération ainsi que l'activation de certaines voies de survie (BCR et NFkB
notamment) est élevée dans les ganglions lymphatiques en comparaison aux cellules tumorales circulantes. Ces données suggèrent une forte dépendance des cellules tumorales à leur microenvironnement (Papin et al., 2019; Chiron et al., 2014; Chiron et al., 2016; Saba et al., 2016). Le LCM doit son nom à son site primaire d'expansion : la zone du manteau qui entoure les GC au sein des OLS (ganglions lymphatiques et rate). Cependant, les cellules de LCM se disséminent de façon précoce dès le diagnostic au niveau de la moelle osseuse, du foie et du tractus gastro-intestinal (Silkenstedt et al., 2021). Ces différentes niches tumorales permettent un dialogue entre les cellules tumorales et les cellules stromales et immunitaires. Les cellules de LCM influencent la formation de leur niche tumorale protectrice grâce à l'établissement d'un dialogue soluble qui consiste en un relargage réciproque de divers cytokines, chemokines et vésicules extracellulaires (pouvant transporter de l'ADN, de l'ARN, des microARN et des protéines) mais également grâce à des interactions récepteur-ligand permettant d'activer différentes voies de signalisation. Les interactions entre le LCM et ses microenvironnements contribuent à la résistance à la thérapie de cette pathologie (Papin et al., 2018 ; Puente et al., 2018 ; Hazan-Halevy et al., 2015). L'étude de l'écosystème tumoral et la compréhension du dialogue entre les différentes populations cellulaires représente un axe majeur permettant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à contrecarrer les résistances dépendantes du microenvironnement.

II.5.2) Les différentes populations cellulaires retrouvées dans l'écosystème tumoral

Le microenvironnement tumoral est composé de plusieurs types cellulaires telles que des cellules immunitaires (lymphocytes T, cellules NK, cellules myéloïdes immatures, cellules myéloïdes suppressives (MDSC), macrophages, cellules dendritiques) mais également des cellules stromales (cellules stromales mésenchymateuses (MSC), fibroblastes et cellules endothéliales). Les cellules immunitaires sont reprogrammées par les cellules tumorales afin de contrecarrer l'immunité anti-cancéreuse et les cellules stromales fournissent un support structurel et une signalisation pro-tumorale. Ce microenvironnement représente un écosystème très dynamique et riche en interactions afin de permettre l'immuno-échappement ainsi que la survie et la prolifération tumorale (Figure 11) (Kerkar and Restifo, 2012 ; Mancini et al., 2021).



Figure 11 : Représentation du microenvironnement tumoral. La niche tumorale est infiltrée par des cellules de l'immunité innée et acquise telles que des MDSC, des macrophages, des MSC, des cellules dendritiques, des cellules NK, des lymphocytes B et des lymphocytes T. Cette niche forme un écosystème qui favorise le développement tumoral en induisant un immuno-échappement. D'après **Kerkar and Restifo, 2012**.

II.5.3) Les différents types de microenvironnements retrouvés dans les lymphomes B

Les lymphomes B présentent des différences concernant la composition de leur microenvironnement tumoral. En effet, la composition ainsi que la distribution spatiale en cellules immunitaires, stromales, endothéliales et en matrice extracellulaire est variable en fonction de la pathologie ainsi que du stade de la maladie. Ces différences s'établissent en fonction des altérations génétiques des cellules tumorales ainsi que des différents stimuli dont ces cellules nécessitent pour survivre, proliférer et promouvoir l'échappement immunitaire favorisant le développement de la pathologie. Il existe trois modèles de microenvironnement tumoral : le modèle de « rééducation », le modèle de « recrutement » et le modèle « d'effacement » (Figure 12) (Scott and Gascoyne, 2014).

Le modèle de « rééducation » est retrouvé dans les cancers qui affectent principalement les ganglions lymphatiques. Les cellules tumorales sont dépendantes des signaux de survie et de prolifération communiqués par les cellules infiltrantes telles que les lymphocytes T, cellules dendritiques et macrophages. Ce modèle concerne les lymphomes de type : FL (Lymphome Folliculaire), MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma) et LCM. Le LCM se trouve au centre de la représentation car peu d'études documentent la composition et la nature de son écosystème ainsi que les interactions qui s'y établissent témoignant ainsi d'un besoin d'étudier plus précisément la dynamique de cette niche tumorale.

Le modèle de « recrutement » est observé dans les lymphomes de Hodgkin. Ce microenvironnement est composé essentiellement de cellules non malignes qui restent différentes de la composition du tissu lymphoïde normal et de cellules de Reed-Sternberg qui restent rares.

Le modèle « d'effacement » représente un microenvironnement très pauvre en cellules immunitaires, telles que les lymphocytes T et les macrophages, dans lequel les cellules tumorales présentent des altérations génétiques (translocation de *MYC*) qui leur transmettent des signaux de survie leur permettant de devenir indépendantes de leur microenvironnement. Ce microenvironnement « effacé » est retrouvé dans le Lymphome de Burkitt (BL) **(Scott and Gascoyne, 2014)**.



Figure 12 : Nature des 3 sous-types de microenvironnements retrouvés dans les lymphomes à cellules B. Le modèle de « rééducation » concerne les lymphomes de type : FL, LCM, MALT, le modèle de « recrutement » est observé dans les lymphomes de Hodgkin et le modèle « d'effacement » est retrouvé dans le BL. D'après Scott and Gascoyne, 2014.

II.5.4) Le microenvironnement tumoral du LCM

Peu d'études documentent la composition de l'écosystème tumoral complexe du LCM. Notre équipe a précédemment mis en évidence le rôle majeur des lymphocytes T et des macrophages dans le soutien de la survie, de la prolifération et de la chimiorésistance des cellules primaires de LCM *in vitro* (Chiron et al., 2016 ; Papin et al., 2019). Au cours de ma thèse, je me suis principalement intéressée aux dialogues (contact direct et dialogue soluble) entre le LCM et l'écosystème lymphoïde et myéloïde.

II.5.4.1) Implication d'un réseau de chemokines dans la niche du LCM

La niche du LCM est organisée par un réseau de chemokines permettant de retenir les cellules tumorales dans leur lieu d'expansion, le ganglion, et d'attirer les cellules tumorales circulantes ainsi que des cellules immunitaires et stromales afin de mettre en place une communication intercellulaire (Franciszkiewicz et al., 2012 ; Papin et al., 2018).

L'étude des récepteurs des chemokines a mis en évidence à la surface des cellules de LCM l'expression de CCR5, CCR6, CCR7, CXCR3 mais également de CXCR4 et CXCR5, deux récepteurs qui médient l'entrée des lymphocytes B dans les tissus lymphoïdes secondaires et leur homing vers les zones enrichies en lymphocytes T de la niche (Trentin et al., 2004 ; López-Giral et al., 2004). La migration des cellules de LCM est contrôlée par CXCL12, CXCL13 (produits par les cellules stromales) et CCL19 (produit par les cellules des HEVs), qui se lient aux récepteurs CXCR4, CXCR5 et CCR7 respectivement. Alors que le CXCL12 est un chémoattractant pour les lymphocytes B normaux et les cellules de LCM, le CCL19 est impliqué uniquement dans la migration et la rétention des cellules tumorales dans les OLS (Corcione et al., 2004 ; Papin et al., 2018).

Les chemokines MIP-1β (CCL4) et RANTES (CCL5) sont surexprimées dans les lignées et les tissus des patients atteints de LCM et jouent un rôle dans le recrutement des lymphocytes T **(Ek et al., 2006)**. CCL17 et CCL22 sont présents dans le plasma de patients atteints de LCM et permettent une attraction des lymphocytes T et des cellules accessoires vers les cellules tumorales **(Chang et al., 2013)**. Des concentrations plasmatiques élevées de CCL4 sont associés à un mauvais pronostic dans le LCM **(Sonbol et al., 2014)**.

II.5.4.2) Les différents types cellulaires de la niche du LCM

II.5.4.2.1) Les lymphocytes T

Plusieurs études ont mis en évidence que l'interaction entre les cellules de LCM et les lymphocytes T grâce à l'axe CD40/CD40L favorise la survie, prolifération et la chimiorésistance des cellules tumorales à travers l'activation de la voie classique et alterne de NFkB (Castillo et al., 2000 ; Andersen et al., 2000 ; Chiron et al., 2016).

Les lymphocytes T représentent environ 15% des cellules totales ganglionnaires et un ratio CD4/CD8 ainsi qu'un nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulant dans le sang périphérique et dans l'infiltrat tumoral élevés sont associés à une meilleure survie des patients atteints de LCM. Un ratio CD4/CD8 élevé de lymphocytes infiltrant les ganglions au diagnostic est associés à un LCM indolent et à une faible prolifération des cellules tumorales et corrèle avec une augmentation de la survie globale des patients (X. Zhang et al., 2016 ; Nygren et al., 2014). De plus, les cas SOX11⁺ plus agressifs présentent un nombre moins élevé de lymphocytes T CD4⁺ infiltrant la tumeur en comparaison aux cas SOX11⁻ (Balsas et al., 2021).

Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques

Le nombre ainsi que la localisation des lymphocytes T CD8⁺ infiltrant la tumeur représentent des facteurs prédictifs de la réponse immunitaire anti-cancéreuse (Steele et al., 2018). Ces cellules présentent une activité cytotoxique grâce à la libération de perforine et de granzyme B entrainant la mort des cellules tumorales (Wang et al., 2013). L'interaction FasL/FasR (Fas Ligand/Fas Récepteur) est également importante dans les processus d'élimination des cellules de lymphomes par les lymphocytes T CD8⁺ (Upadhyay et al., 2015). L'expression de Fas est diminuée dans les cellules de LCM favorisant ainsi leur survie CD40-dépendante (Rummel et al., 2004).

Au sein du microenvironnement tumoral, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sont « épuisés » et présentent une diminution de leur fonction afin de permettre le développement tumoral. Une étude récente met en évidence que des ratios élevés de lymphocytes T CD8⁺ ou de cellules NK au repos et des ratios faibles d'éosinophiles sont associés à une faible survie globale dans les cas de LCM **(Esmeray Sönmez et al., 2022)**.

Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) représentent un sous-ensemble de lymphocytes T suppressifs impliqués dans la tolérance et l'homéostasie immunitaire en limitant les réponses auto-immunes médiées par les lymphocytes T (Zou, 2006 ; Elpek et al., 2007). Leur action est souvent détournée par les cellules tumorales pour maintenir la tolérance immunitaire et favoriser la progression tumorale. Ces cellules représentent 5 à 10% des lymphocytes T CD4+ périphériques et ont un phénotype CD4⁺ CD25⁺ (chaine α du récepteur à l'IL-2), expriment le facteur de transcription caractéristique FOXP3 (Forkhead box Protein P3). Il existe deux formes de lymphocytes Treg présentant une activité immunosuppressive : les lymphocytes Treg « naturels » qui agissent par contacts cellulaires et les lymphocytes Treg « induits » qui sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGFB) formant ainsi une boucle de rétroaction positive permettant de transformer des lymphocytes T effecteurs CD4⁺ CD25⁻ en lymphocytes Treg (Elpek et al., 2007; Mittal et al., 2008; Yang et al., 2007). Les lymphocytes Treg CD25⁺ FOXP3⁺ CTLA-4⁺ (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4) sont présents en grand nombre dans les LNH et suppriment la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ infiltrant la tumeur ainsi que leur capacité à produire les cytokines IFNy et IL-4 (Yang et al., 2006).

Ces cellules inhibent également la prolifération et la production de perforine / granzyme B par les lymphocytes T CD8⁺ supprimant ainsi leur activité cytotoxique **(Yang et al., 2006)**. Une augmentation de la concentration en lymphocytes Treg CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ CD127^{low} est observée dans le sang périphérique des patients atteints de LNH et est corrélée à la charge tumorale **(Mittal et al., 2008)**.

Les « immune checkpoints » associés à l'interaction entre les lymphocytes T et les cellules de LCM

Les cellules tumorales sont capables de détourner les actions du système immunitaire grâce à la dérégulation et la surexpression des points de contrôle immunitaires appelés « Immune Checkpoints » (ICP). Ces points de contrôle permettent d'établir un équilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs des cellules immunitaires dans le microenvironnement. En dérégulant ces ICP, les cellules cancéreuses modulent et/ou inhibent la réponse immunitaire antitumorale permettant ainsi le développement tumoral **(Postow et al., 2015 ; Upadhyay et al., 2015)**.

L'expression de l'ICP CD70 par les cellules de LCM agressives SOX11⁺ favorise l'évasion immunitaire en permettant la différenciation et la prolifération des lymphocytes Treg, à travers

l'interaction CD70/CD27, ainsi que l'épuisement et l'apoptose des lymphocytes T (Balsas et al., 2021 ; Yang et al., 2007).

PD1 (Programmed cell Death 1) et ses ligands PD-L1 et PD-L2 (Programmed Death Ligand 1/2) présentent un rôle important dans l'inhibition de l'activité cytotoxique des lymphocytes T et dans l'échappement tumoral. Les cellules de LCM, contrairement à d'autres types de cellules tumorales, expriment à la fois PD1 et son ligand PD-L1 (Ameli et al., 2022). L'expression de PD-L1 par les lignées et cellules primaires de LCM entraine une inhibition de l'action cytotoxique des lymphocytes T participant ainsi à l'immuno-échappement (Wang et al., 2013). L'expression de PD-L1 par les cellules de LCM est induite par l'interaction CD40/CD40L et par l'IFNγ *in vitro*. Cette expression est fortement réduite par un traitement combinant l'Ibrutinib et le Duvelisib, un inhibiteur de PI3K, suggérant un rôle important du BTK et de PI3K dans la régulation de l'expression de PD-L1 dans le LCM (Harrington et al., 2019). Le blocage de l'interaction PD1/PD-L1 restaure la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ infiltrant les sites tumoraux des LNH dont le LCM *in vitro* (Zhang et al., 2016 ; Xu-Monette et al., 2018). De plus, le ciblage de l'axe PD1/PDL-1 entraine également une baisse de la prolifération et de l'activation des cellules de lymphomes B ainsi qu'une augmentation de l'activation des lymphocytes T *in vivo* (Vincent-Fabert et al., 2019).

CTLA-4, TIGIT (T cell Immunoreceptor with Ig and ITIM domains) et LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene 3) sont exprimés par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et constituent des IPC dans le microenvironnement des lymphomes (Figure 13). En effet, la ligation de CTLA-4 et de LAG-3 conduit à une réduction de la prolifération, la cytotoxicité et la production de cytokines par les lymphocytes T entrainant leur épuisement (Harrington et al., 2019). Les lymphocytes T CD8⁺ des patients atteints de LCM ayant rechuté après un traitement avec des CAR-T cells (Chimeric Antigen Receptor T cells, Brexucabtagene Autoleucel) sont moins cytotoxiques et surexpriment TIGIT. Une augmentation de TIGIT et une perte de l'expression de CD19 par les cellules de LCM ont également été observées. Aucune différence d'expression de CTLA-4 et LAG-3 n'a été observée chez ces patients en rechute. TIGIT semble donc être un ICP acteur de la résistance aux CAR-T cells dans le LCM (Jiang et al., 2022).

II.5.4.2.2) Les macrophages associés à la tumeur

Les monocytes sont des cellules mononuclées qui représentent entre 2 et 10% des cellules du sang et qui se différencient en macrophages dans les tissus (Mosser and Edwards, 2008 ; Le et al., 2021 ; Li et al., 2021). Les macrophages associés la tumeurs (TAM) sont retrouvés au niveau des biopsies ganglionnaires des patients atteints de LCM et sont corrélés à un mauvais pronostic (Rodrigues et al., 2021).

Les macrophages sont classés en deux catégories distinctes associées à leurs fonctions : les macrophages classiques (macrophages M1) et les macrophages alternativement activés (macrophages M2). Les macrophages M1 sont activés par l'IFN-γ, des produits microbiens tels que des lipopolysaccharides ou le « Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor » (GM-CSF) également appelé « Colony Stimulating Factor 2 » (CSF2). Ils présentent des propriétés antitumorales et cytotoxiques et expriment des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires : IL-1, IL-6, IL-12 et TNF et des gènes qui codent pour les chemokines *CXCL9* et *CXCL10*. Au contraire, les macrophages M2 sont activés par l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 et le « Macrophage Colony-Stimulating Factor » (M-CSF) également appelé CSF1. Ils expriment les gènes qui codent pour les chemokines *CCL17, CCL18, CCL22* et *CCL23*. Ces cellules sécrètent des chemokines et cytokines qui stimulent la croissance des cellules tumorales de lymphome et favorisent l'angiogenèse, la chimiorésistance ainsi que l'immunosuppression (Pathria et al., 2019 ; Petty and Yang, 2017 ; Xue et al., 2014 ; Li et al., 2021 ; Martinez et al., 2006).

Le nombre absolu de monocytes (AMC) dans le sang périphérique des patients atteints de LCM est corrélé positivement avec une mauvaise survie et, associé au nombre de TAM, il peut refléter l'état du microenvironnement tumoral. Les macrophages sont présents dans les ganglions tumoraux de patients et expriment les deux marqueurs caractéristiques CD68 et CD163 (Koh et al., 2014). Au sein du microenvironnement tumoral, les TAM soutiennent la survie des cellules de LCM et permettent leur prolifération (Pham et al., 2015 ; Pham et al., 2018). Le marqueur CD163, un marqueur des macrophages M2, est surexprimé à la surface des monocytes circulants dans les échantillons sanguins de LCM en comparaison aux échantillons de donneurs sains et présente un impact pronostic négatif dans le LCM (Papin et al., 2019 ; Rodrigues et al., 2021). De plus, le nombre de macrophages M1 CD68⁺ et de macrophage M2 CD68⁺ CD163⁺ est plus élevé dans les cas de LCM avec un index de prolifération KI67 plus élevé en comparaison aux cas avec un faible index Ki67 et est associé à une baisse de la survie globale (Li et al., 2021).

Plusieurs études récentes ont mis en évidence l'existence d'un dialogue soluble entre les macrophages et les cellules tumorales au sein de l'écosystème du LCM. Les cellules de LCM

induisent la différenciation des TAM en phénotype M2 qui sécrètent de l'IL-10 qui active la voie STAT1 dans les cellules tumorales favorisant leur survie in vitro (Le et al., 2021). D'autre part, la culture des cellules primaires de LCM dans des conditions hypoxiques renforce l'activation des TAM entrainant ainsi un maintien de la survie tumorale in vitro (Pham et al., 2018). Notre équipe a montré que la coculture des cellules primaires de LCM avec des monocytes entraine leur polarisation en macrophages « spécifiques » du LCM. Ces macrophages présentent un phénotype M2 caractérisé par l'expression du marqueur CD163 et un sécrétome pro-tumoral spécifique qui favorise la survie et la prolifération des cellules tumorales. Cette polarisation des monocytes en macrophages par les cellules de LCM est induite par la sécrétion d'IL-10 et du CSF1 par les cellules tumorales. Le CSF1 se fixe au CSF1R présent à la surface des monocytes entrainant ainsi le processus de différenciation. L'Ibrutinib rompt le dialogue entre le LCM et les macrophages en empêchant la sécrétion d'IL-10 et de CSF1 par les cellules tumorales ex vivo. Ces données conduites in vitro semblent être confirmées in vivo. En effet, un suivi longitudinal de quatre patients atteints de LCM et traités avec de l'Ibrutinib a mis en évidence une baisse de l'expression de CD163 par les monocytes circulants chez trois patients répondeurs au traitement (Papin et al., 2019).

Concernant les ICP associés aux macrophages dans le microenvironnement tumoral, une forte expression de PD-L1 par les macrophages M1 est associée à une meilleure survie globale. Une expression élevée de PD-L1 par les macrophages M2 est en revanche associé à une baisse de la survie globale (Li et al., 2021). Les expressions des marqueurs CD47, par les cellules tumorales, et SIRP α (Signal Regulatory Protein- α), par les macrophages, constituent également des ICP dans le microenvironnement tumoral (Figure 13). La forte expression de CD47 par les cellules de lymphomes inhibe le processus de phagocytose des macrophages. Une expression élevée de CD47 est associée à un pronostic défavorable chez les patients atteints de LCM. Bien que des études ont montré l'intérêt de bloquer l'interaction CD47/SIRP α dans des lymphomes, aucun essai n'a été encore mené dans le LCM (Chao et al., 2010 ; Chao et al., 2011 ; Chao et al., 2012 ; Upadhyay et al., 2015).



Figure 13 : Mécanismes d'immuno-échappement au sein du microenvironnement tumoral des lymphomes. Les cellules de lymphome interagissent avec divers types cellulaires au sein de leur niche tels que des lymphocytes T effecteurs, Treg, des TAM, des MDSC et des NK. Un dialogue s'instaure au sein de la niche grâce à la libération de facteurs solubles et à des interactions récepteurs ligands faisant intervenir des ICP contribuant à l'immuno-suppression. D'après Upadhyay et al., 2015.

II.5.4.3) Influence du sous-type de LCM sur la composition du microenvironnement tumoral

La composition du microenvironnement immunitaire du LCM est différente en fonction du soustype de la pathologie. Une étude récente menée par l'équipe du Dr Balsas a établi des corrélations entre des analyses transcriptomiques et des analyses immunohistochimiques et a permis de mettre en évidence cette différence d'enrichissement immunitaire. En effet, une diminution des populations immunitaires (lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et Treg, macrophages, NK) ainsi qu'une diminution de l'expression de certains gènes liés à la fonction des lymphocytes T a été mise en évidence dans les LCM SOX11⁺ (**Balsas et al., 2021**).

Dans cette même étude, une augmentation de l'expression de CD70 par les cellules tumorales a été mise en évidence dans les cas de LCM SOX11⁺ de type blastoïde et pléomorphe et est associée à une augmentation de la prolifération et à un mauvais pronostic. Cette expression de CD70 par les cellules tumorales dans les LCM agressifs, contrôlée par *SOX11* ainsi que des facteurs présents dans la niche tumorale tels que CD40L exprimé par les lymphocytes T, entraine l'activation des lymphocytes Treg, à travers l'interaction CD70/CD27, qui empêchent alors l'action cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺. L'expression de *CD70* et de *SOX11* par les cellules de LCM établissent un microenvironnement immunosuppresseur avec une réduction globale des populations immunitaires antitumorales favorisant la progression de la pathologie **(Balsas et al., 2021)**.

Une autre étude met en évidence une augmentation du nombre de lymphocytes T dans les cas présentant un modèle de croissance de la zone du manteau en comparaison aux cas plus diffus suggérant ainsi un changement dans la composition du microenvironnement immunitaire lors du développement vers des sous-types histologiques plus agressifs **(Nygren et al., 2014)**.

II.5.4.4) Autres interactions décrites dans le LCM

II.5.4.4.1) Interactions avec les cellules stromales mésenchymateuses

Les MSC permettent de retenir les lymphocytes B dans les OLS et présentent un rôle dans le développement des lymphomes. En effet, elles entrainent une activation des voies de survie BCR, NFkB, PI3K/Akt et JAK/STAT dans les cellules tumorales (Saleh et al., 2022). Les cellules de LCM expriment des niveaux élevés de CXCR4, CXCR5 et VLA-4 qui se lie au récepteur VCAM-1 présent à la surface des MSC afin de migrer dans les ganglions. En inhibant l'adhésion des cellules de LCM aux MSC ainsi que leur chimiotactisme médié par le BCR, CXCL12 et CXCL13, l'Ibrutinib est responsable de la sortie des cellules des LCM présentes dans la niche ganglionnaire vers le sang périphérique (Chang et al., 2013 ; Chiron et al., 2015).

II.5.4.4.2) Interactions avec les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse

Les cellules de LCM se propagent souvent dans la moelle osseuse et leurs interactions avec les MSC de la moelle (BMSC) favorise leur survie et leur résistance aux médicaments médiée par l'adhésion cellulaire (CAM-DR) (Medina et al., 2012 ; Rudelius et al., 2018).

D'une part, la sécrétion de CXCL12 par les BMSC favorise le maintien de la survie et la prolifération des cellules de LCM dans la moelle à travers l'axe CXCL12/CCR4 (Chen et al., 2016). D'autre part, FAK, fortement exprimée dans les cellules de LCM, est activée par les BMSC. L'activation de FAK mobilise les voies AKT et NFkB classique et alterne permettant la prolifération et la survie des cellules tumorales *in vitro* (Rudelius et al., 2018).

II.5.4.5) Etablissement d'un dialogue soluble au sein de la niche tumorale du LCM

Au sein de l'écosystème tumoral, les cellules de LCM communiquent avec les cellules environnantes grâce à des contacts directs (interaction ligand-récepteur) mais également grâce à l'établissement d'un dialogue soluble. Les facteurs solubles sécrétés par les cellules tumorales, immunitaires et stromales sont présents dans les différentes niches du LCM (Papin et al., 2018).

Dans le sang périphérique des patients atteints de LCM, les cytokines et chemokines telles que l'IL-12, l'IL-8, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL3 et CCL4 mais aussi des récepteurs solubles tels que sIL-2Rα et le sIL-1RA sont présents en concentration élevée. Les concentrations élevées de CXCL9, CCL3, CCL4 et sIL-2Rα sont de mauvais pronostic **(Sonbol et al., 2014)**.

CCL3, CCL4 et CCL5 attirent les lymphocytes et macrophages et sont décrits pour présenter un rôle dans le développement des hémopathies B telles que le LCM (Burger and Gribben, 2014 ; Ek et al., 2006 ; Papin et al., 2018). De plus, l'expression de sIL-2Rα reflète l'activation des lymphocytes T mais corrèle avec un mauvais pronostic dans les LNH agressifs dont le LCM. La présence de ces cytokines et chemokines dans les échantillons sanguins de patients atteints de LCM reflètent une forte interaction entre les lymphocytes T, les macrophages et les cellules tumorales (Niitsu et al., 2001 ; Sonbol et al., 2014). Les cellules de LCM sécrètent également des exosomes dont le contenu n'a pas été décrit (Hazan-Halevy et al., 2015).

Dans le LCM, la stimulation du BCR joue un rôle majeur dans la sécrétion d'IL-1β, d'IL-6, d'IL-8, d'IL-10, de CCL5, TNFα et VEGFα dans la niche tumorale. L'Ibrutinib inhibe la sécrétion de ces facteurs solubles par les cellules tumorales in vitro (Bernard et al., 2015 ; Puente et al., 2018). L'interaction entre les lymphocytes T et les cellules de LCM via l'axe CD40/CD40L soutient la survie et la prolifération tumorale in vitro. Cette prolifération des cellules de LCM dépendante du CD40L est potentialisée par les cytokines IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), IL-6 IL-10 et BAFF (B-cell Activating Factor) suggérant ainsi le rôle de ces cytokines dans l'expansion des cellules tumorales dans la niche (Chiron et al., 2016 ; Castillo et al., 2000 ; Visser et al., 2000). La sécrétion autocrine d'IL-6 et d'IL-10 par les lignées et cellules primaires de LCM entraine une activation de la voie STAT3 conduisant à leur prolifération (Lai et al., 2003 ; Baran-Marszak et al., 2010). En plus d'activer la voie STAT3, l'IL-6 peut entrainer une activation des voies PI3K et NFkB classique permettant d'induire une survie des cellules tumorales en condition de stress aboutissant à une chimiorésistance (Zhang et al., 2012 ; Zhang et al., 2016). La cytokine BAFF est également sécrétée par les BMSC et induit une survie et une prolifération des cellules de LCM dépendantes de l'activation de la voie alterne de NFkB associée à une augmentation de l'expression de BCL2 (Medina et al., 2012). Les BMSC sécrètent également CXCL12 et CXCL13 qui interagissent avec leurs récepteurs CXCR4 et CXCR5 exprimés par les cellules tumorales permettant ainsi l'activation de la voie MAPK entrainant leur survie et leur migration (Medina et al., 2012; Kurtova et al., 2009). D'autres cytokines telles que l'IGF-1 et le VEGF induisent la survie des cellules de LCM dans leur microenvironnement (Vishwamitra et al., 2011; Wang et al., 2013). A l'inverse, la présence d'IL-21 dans le microenvironnement tumoral entraine une augmentation de l'activité cytotoxine des NK conduisant à la mort des cellules de LCM (Bhatt et al., 2015).

II.5.4.6) Régulation des voies de signalisation par le microenvironnement tumoral du LCM

L'étude transcriptionnelle des cellules primaires de LCM a permis de mettre en évidence une activation de certaines voies de signalisation (BCR et NFkB) dans les ganglions des patients en comparaison au sang périphérique. Ces données montrent l'importance de la niche ganglionnaire dans l'activation des voies de survie dans les cellules tumorales (Saba et al., 2016 ; Young and Staudt, 2013).

II.5.4.6.1) La voie du BCR

La signalisation BCR

La voie de signalisation BCR est indispensable pour le développement, l'activation, la maturation, la prolifération ainsi que la survie des lymphocytes B (Burger and Wiestner, 2018). Le BCR est une protéine transmembranaire composée d'une IgM, constituée de deux chaines lourdes associées à deux chaines légères liées entre elles par des liaisons covalentes, associée à l'hétérodimère CD79a/CD79b (Igα/β) permettant la transduction du signal. Lors d'une activation du BCR par un antigène, les motifs ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine based-Activation Motifs) cytoplasmiques des molécules de transduction CD79a/CD79b sont phosphorylés par les tyrosines kinases de la famille SRC telles que LYN, FYN et BLK. Les protéines transductrices phosphorylées recrutent par la suite SYK qui propage le signal du BCR en phosphorylant BLNK (B cell Linker protein) et BCAP (B Cell Adaptor for Phosphoinositide 3-kinase) qui recrutent d'autres protéines afin de former le signalosome au niveau de la membrane cellulaire. En parallèle, LYN et SYK phosphorylent le corécepteur CD19 entrainant un recrutement de PI3K qui participe également à la formation du signalosome. Le signalosome permet le recrutement d'une multitude de protéines telles que

BTK qui phosphoryle et active PLCγ2 qui catalyse le PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5bisphosphate) en IP3 (Inositol Trisphosphate) et en DAG (Diacylglycérols) qui d'augmente le calcium intracellulaire et d'activer la PKC. La stimulation du BCR entraine une activation des voies de signalisation NFkB, NFAT, MAPK, AKT/mTOR et RAS/MEK/ERK résultant en une transcription des gènes impliqués dans la survie et la prolifération des lymphocytes B (Figure 14) (Puente et al., 2018 ; Pal Singh et al., 2018 ; Young et al., 2019 ; Efremov et al., 2020).



Figure 14 : La voie de signalisation du récepteur B (BCR). La stimulation du BCR entraine l'activation d'une cascade de signalisation impliquant des protéines kinases permettant la formation du signalosome. Cette cascade aboutit à l'activation des voies de signalisation NFkB, NFAT, MAPK, AKT/mTOR et RAS/MEK/ERK entrainant une transcription des gènes impliqués dans la survie et la prolifération des lymphocytes B. D'après Balaji et al., 2018.

L'activation du BCR peut être dépendante d'une stimulation antigénique (activation chronique) qui engage l'activation de diverses voies de signalisation dans les lymphocytes B telles que les voies MAPK, PI3K, NKAT et NFkB. L'activation du BCR peut également être indépendante de la stimulation antigénique (activation tonique) ce qui engage uniquement la voie PI3K et induit un signal de survie cellulaire **(Figure 15) (Young and Staudt, 2013)**.



Figure 15 : Les deux modèles d'activation du BCR. (A) Activation chronique du BCR induite par une stimulation antigénique entrainant l'activation des voies de signalisation MAPK, PI3K, NFAT et NFkB. (B) Activation tonique du BCR indépendante d'une stimulation antigénique entrainant l'activation de la voie PI3K. D'après **Young and Staudt, 2013**.

Les anomalies liées à la voie du BCR dans le LCM

La voie du BCR présente un rôle majeur dans la survie, la prolifération, la libération de chemokines des cellules de LCM ainsi que dans leur migration et localisation ganglionnaire (Inamdar et al., 2016; Puente et al., 2018). Des mutations de *CD79A* et *CD79B*, impliqués dans la voie du BCR, ont été identifiées chez des patients mais restent rares (Saba et al., 2016; Kuo et al., 2018).

En aval du BCR, plusieurs kinases telles que LYN, SYK, PKCβ, PKCγ, BTK et AKT sont phosphorylées à l'état basal dans les cellules primaires de LCM (Bernard et al., 2015 ; Roué and Sola, 2020 ; Myklebust et al., 2017). Une amplification et surexpression de SYK et de la sous-unité catalytique de Pl3K ont été identifiées dans un sous-ensemble de patients et dans certaines lignées de LCM (Rinaldi et al., 2006 ; Rizzatti et al., 2005). Les formes activées de SYK, LYN et BLNK sont également retrouvées dans les tissus tumoraux ganglionnaires des patients (Pighi et al., 2011). De plus, PKCβ II est phosphorylé dans les échantillons de cellules primaires de LCM contrairement aux lymphocytes B normaux (Pérez-Galán et al., 2011 ; Boyd et al., 2009). Une étude montre une augmentation de la phosphorylation de BTK en position Y223 dans les cellules primaires de LCM corrélée à une signalisation BCR élevée en comparaison aux lymphocytes B normaux (Chang et al., 2013). Toutes ces données mettent en évidence une activation constitutive du BCR dans les cellules de LCM contrairement aux lymphocytes B normaux lymphocytes B normaux Le BCR ainsi que ses effecteurs en aval représentent des modulateurs centraux du homing, de la survie et de la résistance des cellules de LCM et constituent donc des cibles permettant de lutter contre la progression de la pathologie.

La tyrosine kinase BTK est essentielle à la signalisation chronique du BCR, au développement et à la fonction des lymphocytes B matures ainsi qu'à la prolifération et survie des cellules de LCM. Le développement d'inhibiteurs du BTK a permis de changer les stratégies thérapeutiques dans le LCM en ciblant spécifiquement la voie du BCR essentielle à survie tumorale. L'Ibrutinib inhibe la libération de chemokines et interfère avec le homing des cellules tumorales vers les OLS et la moelle osseuse entrainant ainsi une augmentation des cellules tumorales dans le sang périphérique (lymphocytose) (Pal Singh et al., 2018 ; Chang et al., 2013 ; Chiron et al., 2015). Malgré l'efficacité cet inhibiteur en monothérapie avec des taux de réponse de 68% chez des patients en rechute, plusieurs mécanismes de résistance à l'Ibrutinib ont été décrits dans le LCM (Merolle et al., 2018 ; Silkenstedt et al., 2021). La mutation du C481S au niveau du site de liaison de l'Ibrutinib à BTK a été identifiée chez certains patients en rechute et représente un des mécanismes de résistance à cet inhibiteur. En effet, cette mutation empêche la fixation covalente de l'inhibiteur sur sa cible (Chiron et al., 2014).

Les patients atteints de LCM présentent une activation constitutive de la voie du BCR mais la nature moléculaire de cette activation est peu décrite. L'étude transcriptionnelle des cellules primaires de LCM a permis de mettre en évidence une corrélation entre l'activation de la voie BCR et l'activation de la voie NFkB dans les ganglions des patients qui ne sont pas retrouvées dans le sang périphérique. L'activation du BCR s'établit lorsque les cellules sont dans leur niche ganglionnaire et constitue une activation chronique dépendante d'un antigène **(Saba et al., 2016 ; Young and Staudt, 2013)**.

Les cellules de LCM SOX11⁺ sont des lymphocytes B naïfs mais des mutations et réarrangements du gène *IGHV* retrouvés chez certains patients suggérèrent un rôle d'autoantigène pouvant expliquer l'activation constitutive du BCR (Navarro et al., 2012; Saba et al., 2016; Hadzidimitriou et al., 2011). La protéine LRPAP1 (LDL-Receptor-related Protein-Associated protein-1) et la vimentine ont également été identifiées comme des auto-antigènes du LCM (Hadzidimitriou et al., 2011; Bewarder et al., 2021; Cha et al., 2013). D'autre part, une étude récente établit l'hypothèse selon laquelle les cellules de LCM présentent un BCR auto-réactif issu de l'héritage des lymphocytes B1a pouvant ainsi expliquer l'activation constitutive du BCR (Pieters et al., 2021).

II.5.4.6.2) La voie NFkB

La signalisation NFkB

La voie NFkB joue un rôle important dans la régulation de l'expression des facteurs de croissances, des cytokines, des chemokines, des molécules d'adhésion ainsi que des protéines inhibitrices de l'apoptose. Cette voie régule la réponse inflammatoire ainsi que la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire. Elle est induite par l'activation de la voie du BCR mais aussi par différents stimuli tels que BAFF, TNFα, le LPS, la lymphotoxine ou le CD40L dans les lymphocytes B. Il existe deux voies d'activation de la voie NFkB : la voie classique (canonique) qui implique *NFkB1* (RelA/p50) et la voie alterne (non canonique) impliquant *NFkB2* (RelB/p52) **(Balaji et al., 2018 ; Wang et al., 2020)**.

La voie classique / canonique de NFkB

Parmi les récepteurs impliqués dans l'activation de la voie classique de NFkB, les récepteurs de type TLR (Toll-Like Receptors), TNFR et IL-1R ont été identifiés ainsi que l'interaction entre les lymphocytes B et les lymphocytes T *via* l'axe CD40/CD40L **(Balaji et al., 2018)**.

L'activation du BCR entraine une phosphorylation de PLCy1 et PLCy2 qui médient la catalyse de PIP2 en DAG et IP3. Le DAG active la protéine kinase PKCβ entrainant la phosphorylation d'une série de sérines le long du domaine inhibiteur de CARD11 (Caspase Recruitment Domain Family Member 11, aussi appelé CARMA1) permettant à CARD11 d'adopter une conformation ouverte et active. La conformation ouverte de CARD11 permet la liaison de ses deux partenaires d'interaction BCL10 et MALT1 (Figure 16A, B et C). BCL10 s'associe constitutivement à MALT1 et se lie au domaine de recrutement des caspases CARD de CARD11. MALT1 se lie à CARD11 via la fixation de son domaine paracaspase et du domaine coiled-coil de CARD11. L'interaction entre ces 3 protéines forme le complexe CBM (CARD11-BCL10-MALT1). La protéine MALT1 agit comme une protéine d'échafaudage permettant le recrutement des protéines de la voie NFkB mais présente aussi un rôle de paracaspase. Ce rôle catalytique lui permet de cliver des substrats impliqués dans la régulation des voies NFkB classique et JNK/AP-1 (A20, CYLD et HOIL-1), dans la régulation de l'adhésion cellulaire (BCL10), dans la liaison à l'ADN de RelA et c-Rel (RelB) et la stabilité de l'ARNm (Regnase-1 et Roquin-1/2) (Thys et al., 2018 ; Lu et al., 2018 ; Lork et al., 2019 ; Juilland and Thome, 2018 ; Turvey et al., 2014).

L'assemblage du CBM entraine une ubiquitination de NEMO conduisant à la phosphorylation et l'activation du complexe IKKα et IKKβ. Ce complexe entraine une phosphorylation de IkB permettant ainsi son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome conduisant à une libération de l'hétérodimère p50/p65 (ReIA). Le complexe ReIA/p50 est ensuite transloqué au noyau afin de permettre la transcription des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, la réponse immunitaire et la prolifération cellulaire (Figure 16A) (Thys et al., 2018 ; Lu et al., 2018 ; Balaji et al., 2018).



Figure 16 : Activation de la voie classique de NFkB et structure et activation de CARD11. (A) Activation de la voie classique de NFkB. L'activation de la voie conduit à la formation du complexe CBM composé de CARD11, BCL10 et MALT1. Le CBM entraine la formation du complexe RelA/p50 qui est ensuite transloqué au noyau afin de jouer son rôle de facteur de transcription des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, la réponse immunitaire et la prolifération cellulaire. (B) Structure de CARD11. CARD11 comporte un domaine CARD, LATCH (L), Coiled-coil (CC), un domaine inhibiteur ainsi que des domaines PDZ, SH3, GUK. (C) Activation de CARD11. Au stade basal, CARD11 présente une conformation fermée inactive. La phosphorylation du domaine inhibiteur de CARD11 entraine son activation vers une conformation ouverte lui permettant de recruter ses partenaires d'interactions. Adapté de Lu et al., 2018 et Bedsaul et al., 2018.

La voie alterne / non canonique de NFkB

Sans activation de la voie, la kinase NIK (NFkB Inducing Kinase) forme un complexe avec les protéines TRAF2/TRAF3, deux régulateurs négatifs de la voie. TRAF2/TRAF3 sont des protéines adaptatrices qui recrutent cIAP1/cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis proteins 1/2), des E3 ubiquitine ligases qui entrainent alors une ubiquitination de NIK et sa dégradation par le protéasome (Haselager and Eldering, 2022 ; Valiño-Rivas et al., 2019).

L'activation de la voie alterne est déclenchée par la fixation du TNFα, de BAFF ou de la lymphotoxine sur les récepteurs de type TNFR, BAFFR et LTβR respectivement ou par l'interaction CD40/CD40L. TRAF3 est recruté à la membrane et TRAF2 entraine une ubiquitination de cIAP1/cIAP2 qui en retour induisent l'ubiquitination de TRAF3. La dégradation de TRAF2/TRAF3 permet la libération et la stabilisation de la kinase NIK qui entraine la phosphorylation de IKKα. La kinase IKKα phosphoryle ensuite la protéine p100 entrainant ainsi son clivage par le protéasome afin de générer la protéine p52. La protéine p52 forme alors un complexe avec RelB qui est par la suite transloqué au noyau afin d'activer la transcription des gènes cibles de la voie impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire **(Figure 17) (Haselager and Eldering, 2022 ; Balaji et al., 2018 ; Oeckinghaus and Ghosh, 2009)**.



Figure 17 : Activation de la voie alterne de NFkB. L'activation de la voie conduit à la formation d'un complexe p52/RelB qui est par la suite transloqué au noyau afin d'activer la transcription des gènes cibles de la voie impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire. Adapté de Haselager and Eldering, 2022 et **Oeckinghaus and Ghosh, 2009**.

Anomalies liées à la voie NFkB dans le LCM

L'activation constitutive des voies classique et alterne de NFkB joue un rôle important dans la survie, la prolifération et la résistance aux thérapies des cellules de LCM. L'activation de la voie NFkB conduit à la transcription de gènes cibles codant notamment pour des cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire (TNF α , IL-1, IL6, IL-10, IL12 β , LTA), des chemokines (CCL3, CCL4) des facteurs de croissance (G-CSF, M-GSF) ainsi que des membres de la famille BCL2 (BCL2, BCL-XL) impliqués dans la régulation de l'apoptose **(Oeckinghaus and Ghosh, 2009 ; Saba et al., 2016 ; Pham et al., 2003 ; Chiron et al., 2015)**. L'étude du profil mutationnel des lignées et cellules primaires de LCM a mis en évidence l'existence de mutations de certains gènes impliqués dans la régulation des voies classique et alterne de NFkB.

Anomalies liées à la voie NFkB classique dans le LCM

Dans les cellules de LCM sensibles à l'Ibrutinib, une diminution de l'activation de la voie NFkB témoigne d'un lien direct entre l'activation du BCR et de la voie NFkB in vitro (Rahal et al., 2014). L'activation du BCR entraine la formation du complexe CBM nécessaire à l'activation de la voie classique de NFkB. Les patients atteints de LNH présentent dans 10% des cas des mutations gain de fonction (GOF) de CARD11 au diagnostic entrainant une survie des cellules tumorales et une résistance à l'Ibrutinib in vitro et in vivo, notamment dans le Lymphome Diffus à Grandes Cellules B (DLBCL) et le FL, via l'activation de la voie NFkB médiée par le CBM (Hill et al., 2020 ; Ma et al., 2021 ; Bartlett et al., 2018 ; Caeser et al., 2021 ; Lenz et al., 2008). Concernant le LCM, des mutations du gène CARD11 ont été mises en évidence chez 9% des patients au diagnostic. Certaines des mutations identifiées dans les échantillons de LCM sont identiques à celles observées dans le DLBCL telles que G123S et D230N, localisées respectivement dans les domaines LATCH et Coiled-coil de CARD11 entrainant sa phosphorylation et son dépliement vers une conformation active permettant le recrutement des membres du CBM (Figure 18) (Wu et al., 2016 ; Lu et al., 2018). Les mutations de CARD11 pourraient également moduler les dialogues entre les cellules de LCM et le microenvironnement tumoral. En effet, une étude met en évidence que la mutation L244P dans le domaine Coiled-coil de CARD11 entraine une modulation du dialogue des cellules de lymphomes avec les macrophages (augmentation du CSF1) et les lymphocytes T (augmentation de PD-L1/2) présents dans leur microenvironnement (Reimann et al., 2021).



Figure 18 : Localisation des mutations de CARD11. Les mutations de CARD11 sont retrouvées au niveau des domaines CARD, LATCH et Coiled-coil. D'après Bedsaul et al., 2018.

La protéine MALT1 présente également un rôle important dans la formation du CBM grâce à ses fonctions d'échafaudage et de procaspase. Une étude montre que l'activation constitutive du BCR induit une activation constitutive de la protéine MALT1 chez un sous-ensemble de patients atteints de LCM et entraine une régulation de la stabilisation et de l'expression de *MYC* (Dai et al., 2017).

D'autre part, des mutations perte de fonction fréquentes de *TNFAIP3* codant pour A20 ainsi que des délétions de *NFKBIE* codant pour IKBε (3 à 4% des cas), deux régulateurs négatifs de la voie classique, entrainant l'activation de la voie et sont retrouvées chez des patients atteints de LCM (Burger and Wiestner, 2018 ; Mansouri et al., 2016).

Anomalies liées à la voie NFkB alterne dans le LCM

Des mutations *BIRC3* (22%) et *TRAF2* (15%) sont retrouvées chez des patients atteints de LCM entrainant une activation constitutive de la voie alterne et une résistance à l'Ibrutinib **(Saba et al., 2016 ; Nadeu et al., 2020)**. Ces anomalies ont été retrouvées dans les lignées cellulaires de LCM résistantes à l'Ibrutinib. De plus, certains patients atteints de LCM présentent des mutations du gène *MAP3K14* codant pour NIK. Ces données témoignent d'une dépendance de certaines cellules de LCM à l'activation de la voie alterne de NFkB entrainant des résistances à l'Ibrutinib et identifient NIK comme une cible potentielle dans le traitement des patients réfractaires **(Rahal et al., 2014 ; Vidal-Crespo et al., 2017)**.

II.5.4.6.3) Activation des voies BCR et NFkB induite par le microenvironnement dans le LCM

L'activation des voies BCR et NFkB a lieu principalement dans les ganglions (Puente et al., 2018). L'activation de la voie NFkB induite par le microenvironnement s'établit notamment à travers à l'interaction entre les cellules tumorales et les lymphocytes T (CD40/CD40L) ou les cellules stromales (VCAM-1/VLA-4) mais aussi grâce à la sécrétion de BAFF par les MSC, les cellules dendritiques et les macrophages (Chiron et al., 2016 ; Medina et al., 2012 ; Kurtova et al., 2009 ; Burger and Ford, 2011). En se fixant à son récepteur BAFF-R codé par le gène *TNFRSF13C*, la cytokine BAFF entraine une activation de la voie alterne de NFkB permettant la transcription de gènes cibles tels que *TNFSF13B* codant pour BAFF formant ainsi une boucle de rétroaction positive contribuant à l'activation constitutive de la voie (Fu et al., 2006). De plus, des mutations du gènes *TNFRSF13C* sont retrouvées chez des patients atteints de LNH entrainant une augmentation de l'activation de la voie NFkB (Hildebrand et al., 2010 ; Saba et al., 2016).

II.5.4.7) Dérégulation de l'apoptose par le microenvironnement tumoral du LCM

L'apoptose représente un programme de mort cellulaire important pour le développement et le maintien de l'homéostasie tissulaire. Ce processus est déclenché par des stimuli internes ou externes aboutissant à l'activation de voies distinctes : la voie intrinsèque médiée par les mitochondries et la voie externe médiée par les récepteurs de mort de la famille TNF (Singh et al., 2019).

La dérégulation de l'apoptose constitue une caractéristique du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011). Des études réalisées par notre équipe ont permis de mettre en évidence un déséquilibre entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la familles BCL2 induit par le microenvironnement tumoral (Chiron et al., 2015 ; Chiron et al., 2016).

II.5.4.7.1) La famille BCL2

Les protéines de la famille BCL2 représentent des éléments clés régulant le mécanisme d'apoptose intrinsèque. Les membres de la famille BCL2 possèdent 1 à 4 domaines d'homologie (BH) conservé et partagent toutes un domaine commun : le domaine BH3. Ces protéines sont divisées en deux groupes : les protéines pro-apoptotiques qui vont induire l'apoptose et les protéines anti-apoptotiques qui vont empêcher ce mécanisme de mort cellulaire. Les protéines anti-apoptotiques à multi-domaines sont BCL2, BCL-XL, MCL1, BCL-

W, BFL-1/A1 (également appelé BCL2A1) et BCL-B. Les protéines pro-apoptotiques sont divisées en deux groupes : les protéines sensibilisatrices (BIM, BID et PUMA) et activatrices (BMF, BAD, BIK, HRK et NOXA) de l'apoptose composées d'un domaine BH3 unique (« BH3 only ») et les protéines effectrices à multi-domaines (BAX, BAK et BOK) (Figure 19) (Klener et al., 2021 ; Singh et al., 2019).



Figure 19 : Les protéines de la famille BCL2. La famille BCL2 est composée de protéines anti-apoptotiques à multi-domaines et de protéines pro-apoptotiques « BH3 only » sensibilisatrices et multi-domaine effectrices de l'apoptose. D'après *Klener et al., 2021*.

L'apoptose mitochondriale peut être déclenchée par divers stimuli tels que la privation en nutriments ou en facteurs de croissance, des radiations ionisantes, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou la chimiothérapie. Ces signaux de stress entrainent la libération des protéines pro-apoptotiques « BH3 only » activatrices (BIM, PUMA ou BID clivé en tBID). Ces protéines sont soit séquestrées par les protéines anti-apoptotiques (BCL2, BCL-W, BCL-XL, BCL2A1, MCL1) à la membrane mitochondriale, soit responsables de l'activation des protéines pro-apoptotiques effectrices BAX et BAK. Les signaux de stress peuvent également activer les protéines pro-apoptotiques « BH3 only » sensibilisatrices (BAD, NOXA, HRK) qui se lient aux protéines anti-apoptotiques afin de libérer les protéines « BH3 only » activatrices séquestrées. L'activation des protéines BAX et BAK entraine leur oligomérisation et la

formation de pores permettant ainsi la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) et le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c se lie à la protéine APAF1 afin de former l'apoptosome qui se lie à la caspase 9 et l'active. La caspase 9 clive et active les caspases 7 et 3 entrainant ainsi la mort cellulaire (Figure 20) (Singh et al., 2019 ; Klener et al., 2021 ; Nagata, 2018).



Figure 20 : La voie intrinsèque / mitochondriale de l'apoptose. (A) Divers stimuli apoptotiques peuvent entrainer la libération des protéines pro-apoptotiques « BH3 only » conduisant à une inhibition des protéines anti-apoptotiques et une activation des protéines pro-apoptotiques effectrices BAK et BAX. Le complexe BAX/BAK entraine la formation de pores à la membrane externe mitochondriale et le relargage du cytochrome c formant ainsi l'apoptosome qui active la voie des caspases et entraine la mort cellulaire. (B) Les protéines pro-apoptotiques « BH3 only » sensibilisatrices se lient aux protéines anti-apoptotiques afin de libérer les protéines « BH3 only » activatrices séquestrées qui vont entrainer une activation des protéines effectrices. L'activation des protéines effectrices entraine la formation de pores au niveau de la membrane externe mitochondriale entrainant ainsi le relargage du cytochrome c et l'apoptose des cellules. Adapté de **Singh et al., 2019** et **Jullien et al., 2020**.

II.5.4.7.2) Dérégulation de la famille BCL2 par le microenvironnement dans le LCM

Concernant les membres anti-apoptotiques, des amplifications ou une surexpression du gène *BCL2* codant pour BCL2 (jusqu'à 17% des cas) et une surexpression des protéines BCL-XL liée à l'activation constitutive de la voie NFkB sont décrites chez des patients. Une surexpression de MCL1 dépendante de la voie AKT/mTor est retrouvée dans les cas plus agressifs (Navarro et al., 2020 ; Pérez-Galán et al., 2011 ; Shishodia et al., 2005). La niche ganglionnaire du LCM présente un rôle dans la régulation des membres anti-apoptotiques. En effet, une étude transcriptomique menée par notre équipe a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de *BCL2*, *BCL2L1*, *BCL2L2* (codant pour BCL-W), *MCL1* et *BCL2A1* dans les cellules issues des ganglions en comparaison aux cellules du sang périphérique (Tessoulin et al., 2019).

Concernant les membres pro-apoptotiques, des délétions du gène BCL2L11 codant pour BIM sont retrouvées dans 50% des lignées de LCM mais n'ont pas été identifiées dans 95 échantillons primaires testés (Papin et al., 2018; Le Bris et al., 2020). L'analyse d'échantillons tissulaires primaires en immunohistochimie a mis en évidence une absence d'expression de BIM dans 32% des cas. De plus, une analyse transcriptomique a permis de confirmer la diminution de l'expression de BCL2L11 dans les cellules issues des ganglions en comparaison aux cellules circulantes (Mestre-Escorihuela et al., 2007; Tessoulin et al., 2019). La délétion de BCL2L11 dans les lymphocytes B des souris surexprimant CCND1 entraine le développement du LCM avec une expansion des cellules tumorales dans la zone du manteau de la rate des souris (Katz et al., 2014). L'ensemble de ces données témoigne de l'importance de la protéine pro-apoptotique BIM dans la pathogenèse du LCM. L'analyse transcriptomique menée par l'équipe a également mis en évidence une diminution de l'expression du gène *PMAIP1* qui code pour NOXA et une augmentation de l'expression de BID et BIK dans les ganglions (Tessoulin et al., 2019). D'autre part, une analyse de ganglions de patients en immunohistochimie a montré une faible expression des protéines proapoptotiques effectrices BAK et BAX dans le microenvironnement (Agarwal and Naresh, 2002).

Ces données confirment le rôle de la niche ganglionnaire dans la régulation des membres de la famille BCL2 et dans la chimiorésistance du LCM notamment médiée par la surexpression de *BCL2L1* et la diminution de l'expression de *BCL2L11* (Chiron et al., 2016). L'émergence de nouvelles molécules, les BH3 mimétiques, qui se lient de façon spécifique aux protéines anti-apoptotiques neutralisant ainsi leur activité fonctionnelle de séquestration des protéines pro-apoptotiques, représente une stratégie pour induire le processus d'apoptose BAX/BAK dépendant (Weniger and Wiestner, 2011 ; Inamdar et al., 2016). Une étude récente montre

que le Venetoclax (ABT-199), un BH3 mimétique, entraine une sélection de clones avec une perte ou une réduction des amplifications du gène *BCL2 in vitro* dans des échantillons primaires de LCM mais également *in vivo* dans des PDX (xénogreffes de cellules primaires de patients dans des souris) (**Zhao et al., 2019**). D'autre part, notre laboratoire a mis en évidence que l'activation de la voie NFkB dépendante de l'interaction CD40/CD40L entraine une augmentation de l'expression de MCL1 et BCL-XL et une résistance au Venetoclax dans les cellules de LCM. L'utilisation de l'Ibrutinib en combinaison avec le Venetoclax entraine une libération des cellules tumorales ganglionnaires dans le sang périphérique (lymphocytose) permettant ainsi de contrecarrer cette résistance (**Chiron et al., 2016**).

La famille BCL2 semble être au centre de la résistance des cellules de LCM. Notre équipe a défini le ratio d'expression transcriptionnel *BCL2* / (*BCL2L1* + *MCL1*) comme prédicteur de la sensibilité et de la réponse au Venetoclax dans le LCM (**Tessoulin et al., 2019**). BCL2, BCL-XL et MCL1 représentent donc des cibles pertinentes pour contrecarrer les résistances retrouvées chez les patients atteints de LCM. Une étude récente montre que la combinaison entre le Venetoclax et le S63845, un inhibiteur de MCL1, présente une synergie en comparaison aux molécules seules (**Prukova et al., 2019**).

D'autre part, les mécanismes épigénétiques semblent jouer un rôle dans la régulation des membres pro-apoptotiques de la famille BCL2. L'acétylation des histones au niveau du promoteur des membres pro-apoptotiques de la famille BCL2 semble importante dans leur régulation. L'utilisation du Vorinostat, un inhibiteur des histones désacétylases, entraine une acétylation des promoteurs de *BCL2L11*, *PMAIP1* et *BMF* permettant leur activation transcriptionnelle et leur expression protéine dans les cellules de LCM (Xargay-Torrent et al., 2011). Dans les cellules de LCM, l'expression de *BIK* est induite ou augmentée par la déméthylation de son promoteur et le gène *BCL2L11* est réprimé par l'expression des miRNA 17-92 et 181a (Brosseau et al., 2014 ; Rao et al., 2012 ; Lwin et al., 2010).

II.6) Stratégies thérapeutiques intégrant le LCM dans son écosystème

Il y a quelques années, la chimiothérapie était la seule option thérapeutique pour les patients atteints de LCM. Actuellement, la chimiothérapie est souvent utilisée en première ligne. Le traitement administré aux patients dépend de l'âge et de l'agressivité de la pathologie.

Les jeunes patients (< 65 ans) peuvent recevoir deux types de traitements de première ligne. Dans le premier cas, les patients sont traités avec de la cytarabine associée à du Rituximab, un anti-CD20. Ce traitement est suivi d'une autogreffe de cellules souches puis d'un entretien au Rituximab. Dans le deuxième cas, les patients sont traités avec la combinaison R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone) avant de recevoir une autogreffe suivie d'un entretien au Rituximab (Le Gouill et al., 2017 ; Hermine et al., 2016 ; Castellino et al., 2022). Pour les patients plus âgés (> 65 ans), le traitement de première ligne est généralement la combinaison R-CHOP suivie d'un traitement d'entretien au Rituximab. Dans certains cas, les patients peuvent recevoir un traitement à base de Bendamustine, un agent alkylant, suivi d'un traitement d'entretient au Rituximab. Malgré des taux de réponse élevés, seule une minorité des patients, jeunes ou âgés, obtient une rémission complète. Une rechute ou une progression de la maladie sont souvent observées dans les 3 ans après traitement ce qui entraine une survie globale inférieure à 5 ans (Kluin-Nelemans et al., 2012).

Les patients atteints d'un LCM leucémique non nodal ne sont pas traités et sont sujets à une surveillance. Si la pathologie évolue vers un stade plus agressif, le même arbre décisionnel rentre en jeu (Jain et al., 2019).

II.6.1) Thérapie ciblée

Ces dernières années, la caractérisation du profil moléculaire des cellules de LCM ainsi que la compréhension des multiples interactions qui se produisent dans la niche tumorale ont permis d'identifier de nouvelles vulnérabilités tumorales. Ces découvertes ont permis l'émergence de nouvelles perspectives thérapeutiques visant à cibler la tumeur dans son écosystème (Saleh et al., 2022 ; Yi et al., 2022). Parmi les dérégulations identifiées, une expression élevée de CD20 à la surface des cellules tumorales ainsi qu'un déséquilibre de la famille BCL2 et une activation constitutive du BCR dans les cellules tumorales ont été identifiées et représentent des cibles prometteuses (Prevodnik et al., 2011 ; Tessoulin et al., 2019 ; Chang et al., 2013).

Pour cibler CD20, le Rituximab est utilisé de façon combinée à la chimiothérapie et en traitement de maintenance (Le Gouill et al., 2017). Des mécanismes de résistances au Rituximab ont été mis en évidence notamment la diminution de l'expression de CD20 suite au traitement combinant le Rituximab, le Vorinostat, un inhibiteur des HDAC, et la Cladribine, un analogue de la purine ayant des propriétés hypométhylantes, chez les patients atteints de LCM. Malgré l'efficacité de cette combinaison qui a permis d'augmenter la survie des patients de 40 mois, la diminution de l'expression du CD20 constitue un indicateur de mauvais pronostic pour les patients (LeBlanc et al., 2022). L'Obinutuzubab, un autre anti-CD20, s'est avéré plus efficace que le Rituximab pour réduire le volume tumoral in vivo dans des modèles de PDX de DLBCL et LCM (Mössner et al., 2010). Notre laboratoire a également mis en effidence la une meilleure efficacité de l'Obinutuzubab sur la diminution de l'expression de BCL-XL microenvironnement-dépendante induite par l'activation de la voie NFkB in vitro dans des échantillons primaires de LCM en comparaison au Rituximab (Chiron et al., 2016). En monothérapie, l'Obinutuzubab a permis d'augmenter la survie globale de 27% chez les patients atteints de LCM inclus dans l'essai clinique GAUGUIN de phase 2. Chez des patients résistants au Rituximab, le traitement avec de l'Obinutuzumab a permis d'obtenir une réponse complète (CR) dans 12% des cas (Morschhauser et al., 2013).

Le Venetoclax a montré une activité notable en monothérapie chez les patients de LCM avec un taux de réponse global (ORR) de 75% et une CR de 21% (Davids et al., 2017). Le Venetoclax entraine une sélection de clones avec une perte ou une réduction des amplifications du gène *BCL2 in vitro* dans des échantillons primaires de LCM mais également *in vivo* dans des PDX (Zhao et al., 2019). Des modulations de la famille BCL2 microenvironnement-dépendantes ont été décrites dans le LCM. En effet, l'interaction CD40/CD40L active la voie NFkB entrainant une augmentation de l'expression de MCL1 et BCL-XL, une diminution de l'expression de BIM et une résistance au Venetoclax dans les cellules de LCM. Notre laboratoire a montré l'importance du ratio d'expression de l'ARN *BCL2* / (*BCL2L1* + *MCL1*) qui est prédicteur de la sensibilité et de la réponse au Venetoclax dans le LCM. Alors que les cellules circulantes sont dépendantes de BCL2 pour leur survie et donc sensibles au Venetoclax, le déséquilibre de la famille BCL2 induit par le microenvironnement avec notamment l'augmentation de l'expression de BCL-XL pourrait être à l'origine des rechutes (Chiron et al., 2016 ; Chiron et al., 2015).

L'Ibrutinib, un inbibiteur de BTK essentiel à l'activation de la voie du BCR, a montré une efficacité en monothérapie chez des patients présentant des LCM récidivants ou réfractaires avec un ORR de 68% et une CR de 21% (Wang et al., 2013). L'Ibrutinib, en combinaison avec le Rituximab et la Bendamustine, un agent alkylant, suivi d'une maintenance au Rituximab, s'est également avérée efficace chez des patients récidivants ou réfractaires. En effet, une CR

a été observée chez 76% des patients (Wang et al., 2022). Malgré l'efficacité de cet inhibiteur, plusieurs mécanismes de résistance à l'Ibrutinib ont été décrits dans le LCM (Merolle et al., 2018 ; Silkenstedt et al., 2021). En effet, la mutation C481S au niveau du site de liaison de l'Ibrutinib à BTK a été identifiée chez certains patients en rechute et présente une implication dans la résistance à cet inhibiteur. En effet, cette mutation conduit à une activation chronique des voies BTK et AKT/mTOR en aval du BCR conduisant au maintien de la survie des cellules tumorales (Chiron et al., 2014). D'autre part, 15% des patients présentent des mutations de TRAF2 associées à une activation constitutive de la voie alterne de NFkB également impliquées dans la résistance du LCM à l'Ibrutinib (Saba et al., 2016 ; Hill et al., 2020). Cette activation de la voie alterne de NFkB impliquée dans la résistance à l'Ibrutinib est également induite par le microenvironnement du LCM et notamment via l'axe CD40/CD40L (Rauert-Wunderlich et al., 2018). L'Ibrutinib joue un rôle direct sur les cellules de LCM mais aussi sur leurs interactions avec le microenvironnement tumoral. En effet, cet anti-BTK inhibe l'adhésion des cellules de LCM aux MSC et leur chimiotactisme médié par le BCR, CXCL12 et CXCL13 entrainant ainsi sortie des cellules des LCM présentes dans les ganglions et leur redistribution vers le sang périphérique (Chang et al., 2013). L'Ibrutinib inhibe également la sécrétion BCRdépendante de l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, de CCL5, TNFα et VEGFα par les cellules tumorales in vitro limitant ainsi leurs interactions avec les cellules environnantes (Bernard et al., 2015).

Le Rituximab, le Venetoclax et l'Ibrutinib se sont révélés efficaces associés avec la chimiothérapie et également en tant qu'agents uniques mais la grande hétérogénéité inter et intra-patient limite l'efficacité à long terme de la monothérapie ciblée (Le Gouill et al., 2017; Eyre et al., 2019; P. Martin et al., 2016). Des combinaisons alliants ces agents thérapeutiques ont été développées ces dernières années. En effet, l'association de l'Ibrutinib avec le Venetoclax s'est avérée efficace chez les patients atteints de LCM inclus dans l'essai clinique AIM de phase 2 : 20% des patients ont présenté une résistance primaire et 10% ont par la suite rechuté avec une résistance acquise. Des mutations d'*ATM* ont été identifiées chez les patients répondeurs et des mutations dans le complexe de remodelage de la chromatine SWI-SNF ont été retrouvées chez les patients réfractaires et chez 2/3 des patients en rechute. Cette résistance thérapeutique pourrait être causée par l'augmentation de l'expression de BCL-XL (Agarwal et al., 2019).

Un essai clinique mené au CHU de Nantes par le Professeur Le Gouill nommé OAsls vise à évaluer la faisabilité d'un traitement séquentiel « chemo-free » ciblant le CD20 et le BTK puis BCL2. Cet essai a intégré dans son rationnel les données fondamentales du laboratoire à savoir le fait que l'inhibition sélective de BTK par l'Ibrutinib favorise la sortie des cellules de LCM hors de leur niche ganglionnaire protectrice vers le sang périphérique **(Chiron et al.,**

2015) et que l'anti-CD20 Obinutuzumab inhibe *in situ* l'expression de BCL-XL dépendante de la voie NFkB (Chiron et al., 2016). Les cellules circulantes ayant diminué leur expression de BCL-XL sont particulièrement sensibles aux inhibiteurs de BCL2 tel que le Venetoclax. Cette combinaison est administrée aux patients réfractaires à la chimiothérapie (R-CHOP) mais également en première ligne. Cette triple combinaison est bien tolérée et a conduit à des ORR de 67% et 86,6% chez les patients en rechute et non traités respectivement. Malgré des taux de réponses élevés, 1/3 des patients présentent des résistances primaires ou acquises à ce traitement (Le Gouill et al., 2021).

Le Lénalidomide, une molécule immunomodulatrice qui cible l'ubiquitine ligase Cereblon des cellules tumorales, présente un effet modéré sur la réponse des patients en monothérapie (ORR : 28%, réponses complètes : 8%). De bons résultats en combinaison avec le Rituximab sont également observés (ORR : 57%, réponses complètes : 36%) (Trněný et al., 2016; Wang et al., 2012; Zaja et al., 2012; Jain and Wang, 2022; Gribben et al., 2015).

Le Bortezomib, un inhibiteur du protéasome qui inhibe indirectement la voie NFkB, est également approuvé dans le traitement des patients atteints de LCM en première ligne associé à la chimiothérapie mais également chez les patients en rechute ou réfractaires (**Robak et al., 2015**).

II.6.2) Immunothérapie

De nouveaux traitements visant à rompre les interactions entre les cellules de LCM et le microenvironnement immunitaire sont en cours de développement. Parmi eux, des inhibiteurs des ICP, des anticorps bispécifiques ainsi que des thérapies à base de CAR-T cells sont actuellement en cours de développement.

II.6.2.1) Les inhibiteurs des « immune checkpoints »

Le blocage de PD1/PD-L1 a montré son efficacité en restaurant la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ infiltrant les sites tumoraux du LCM *in vitro* (Zhang et al., 2016 ; Xu-Monette et al., 2018). Néanmoins, le blocage de cet axe à l'aide du Nivolumab, un anti-PD1, lors d'un essai clinique de phase 1 n'a pas montré d'activité clinique significative en monothérapie chez les patients atteints de lymphomes B réfractaires dont le LCM (Lesokhin et al., 2016). La combinaison du Pembrolizumab (anti-PD1) en association avec l'Ibrutinib est actuellement en essai clinique de phase 1/2 ainsi que la combinaison du Nivolumab et du Lénalidomide chez les patients atteints de LCM (Saleh et al., 2022).

L'expression de CD70 par les cellules de LCM plus agressives SOX11⁺ favorise l'évasion immunitaire en permettant la différenciation et la prolifération des lymphocytes Treg ainsi que l'épuisement et l'apoptose des lymphocytes T (Balsas et al., 2021 ; Yang et al., 2007). Une étude clinique de phase 1 vise à utiliser un anticorps conjugué ciblant CD70 et lié à un dimère de pyrrolobenzodiazépine (SGN-CD70A) chez les patients atteints de LNH CD70⁺ récidivants ou réfractaires dont le LCM. Un ORR de 20% a été obtenu chez les patients. Bien que le ciblage du CD70 soit une stratégie thérapeutique intéressante dans le LCM, l'applicabilité du SGN-CD70A est limitée à cause des effets secondaires de thrombopénie constatés (Phillips et al., 2019).

Des inhibiteurs de SOX11 visant à bloquer la signalisation du BCR dans les cellules de LCM sont en cours de développement préclinique. En combinaison avec l'Ibrutinib, les inhibiteurs de SOX11 induisent une cytotoxicité des cellules de LCM *in vitro*. Cette combinaison pourrait donc représenter une stratégie thérapeutique (Jatiani et al., 2021).

D'autre part, l'expression élevée de l'ICP CD47 est associée à un pronostic défavorable chez les patients atteints de LCM **(Chao et al., 2011 ; Chao et al., 2012)**. L'efficacité thérapeutique d'un anti-CD47 en combinaison au Rituximab a été mis en évidence dans les LNH agressifs ou indolents **(Advani et al., 2018)**. Cet axe CD47-SIRPα n'a pas encore été étudié dans le LCM mais le blocage de CD47 pourrait représenter une stratégie thérapeutique.

II.6.2.2) Les anticorps bispécifiques

Les anticorps bispécifiques forment un lien entre un antigène cible présent à la surface des lymphocytes B tumoraux (CD19 ou CD20) et le CD3 exprimé par les lymphocytes T. Ce rapprochement entre les deux types cellulaires entraine alors l'activation cytotoxique des lymphocytes T et la destruction des cellules tumorales (Figure 21). Les principaux anticorps bispécifiques actuellement en étude chez les patients atteints de LCM sont les anti-CD20-CD3 tels que le Glofitamab, l'Epcoritamab, l'Odronextamab ainsi qu'une combinaison alliant le Mosunetuzumab et le Polatuzumab, un anti-CD79b (Jain and Wang, 2022 ; Phillips et al., 2021).

L'Epcoritamab a montré une cytotoxicité des cellules de LCM primaires induite par les lymphocytes T *in vitro* (van der Horst et al., 2021). Un essai clinique de phase 1 visant à étudier l'effet du Glofitamab chez les patients réfractaires ayant reçu des inhibiteurs de BTK a permis d'obtenir un ORR de 83% avec une CR de 65% (Jain and Wang, 2022 ; Phillips et al., 2021). Une étude récente menée chez deux cas de LCM en rechute après un traitement à base de CAR-T cells met en évidence l'efficacité du Glofitamab sur l'expansion des CAR-T

circulants dans le sang périphérique chez les patients (Heini et al., 2022). Un essai clinique de phase I chez des patients atteints de LNH récidivants ou réfractaires dont le LCM impliquant le Blinatumomab, un anticorps bispécifique anti-CD19-CD3 a montré une efficacité antitumorale en monothérapie avec un ORR de 69% et une CR de 37% (Goebeler et al., 2016).



Figure 21 : Action des anticorps bispécifiques. Les anticorps bispécifiques entrainent un rapprochement des lymphocytes T exprimant le CD3 et des cellules tumorales exprimant plusieurs types d'antigènes tels que CD19 et CD20. D'après **Shin et al., 2022**.

II.6.2.3) Les CAR-T cells

Parmi les immunothérapies en cours de développement, l'utilisation d'un traitement à base de CAR-T cells représente une stratégie efficace. L'essai clinique ZUMA-2 de phase 2 visant à traiter les cas de LCM en rechute ou réfractaires après un traitement avec des inhibiteurs de BTK avec des CAR-T cells anti-CD19 (Brexucabtagene Autoleucel (BA)) s'est avéré concluant. En effet, un ORR de 91% avec une CR de 68% ont été observé. Après 6 mois, 40% des patients étaient toujours en CR et 79% des patients présentaient une maladie résiduelle (MRD) négative. Néanmoins, des effets indésirables ont été rapportés tels qu'une cytopénie (69% des cas), des infections (32%) et une neurotoxicité (31% des cas) (Jain and Wang, 2022 ; Wang et al., 2021 ; Wang et al., 2020). Malgré l'efficacité du BA, certains patients rechutent après la thérapie. Il est donc nécessaire de mettre en évidence les mécanismes de résistances des patients triplement résistants aux inhibiteurs de BTK, au Venetoclax et au BA.

Certaines hypothèses ont été établies telles que des variantes d'épissage, des mutations ou la perte de l'antigène CD19, une production ou expansion défectueuse de lymphocytes T, une augmentation de régulation des récepteurs négatifs, des mutations dans les récepteurs de mort ou la mise en place d'un microenvironnement cytokinique altéré. L'établissement de combinaisons du BA avec d'autres agents tels que l'Ibrutinib ou à des agents permettant de rompre les interactions entre le LCM et les macrophages tels qu'un anti-CSF1 comme le Pexidartinib ou un anti-GM-CSF comme le Lenzilumab semble représenter une stratégie pertinente pour réduire la progression de la pathologie **(Jain et al., 2021)**.

Le lisocabtagene maraleucel, composé de CAR-T anti-CD19 autologue contenant un domaine de signalisation 4-1BB (CD137), en tant que molécule co-stimulatrice, est actuellement en essai clinique chez les patients atteints de LCM en rechute ou réfractaires après un traitement avec des anti-BTK. Un ORR de 84% avec une CR de 59% ont été observés mais une neurotoxicité (34% des cas) et une cytopénie (31% des cas) ont été mises en évidence (Palomba et al., 2020 ; Bond et al., 2021 ; Eyre et al., 2019).

Afin de contrecarrer les résistances induites par la baisse de l'expression des cibles, des CAR-T cells autologues anti-CD20 ainsi que des CAR-T cells bispécifiques anti-CD19/CD20 sont également en cours de développement dans le LCM **(Saleh et al., 2022)**.
OBJECTIFS DU TRAVAIL

Ces dernières années, le développement de nouvelles technologies à haut débit dites « omiques » a permis de mieux caractériser les anomalies intrinsèques à la cellule tumorale permettant ainsi de définir la carte d'identité du LCM. Des études plus récentes ont démontré l'importance des cellules du microenvironnement tumoral dans le soutien de la survie, de la prolifération et de la résistance aux thérapies du LCM. Ces données soulignent l'importance de considérer la tumeur comme un écosystème très dynamique où s'établie une communication intercellulaire à travers des contacts directs entre les différents types cellulaires ainsi que l'établissement d'un dialogue soluble.

Dans des études précédentes, notre équipe a souligné le rôle des signaux lymphoïdes et myéloïdes dans la survie et la prolifération du LCM. En effet, notre équipe a montré l'importance de l'axe CD40-CD40L associé à des facteurs solubles pro-tumoraux (IL-6, IL-10, IGF-1 et BAFF) dans le soutien de la survie et la prolifération des cellules primaires de LCM à travers l'élaboration d'un modèle de coculture *ex vivo* 2D « CD40L + Ck » (Chiron et al., 2016). De plus, l'établissement de systèmes de cocultures des cellules primaires de LCM avec des monocytes a permis à notre équipe de mettre en évidence que la sécrétion de CSF1 et d'IL-10 par les cellules de LCM entraine la polarisation des monocytes en macrophages « spécifiques » du LCM (M¢MCL). Ces M¢MCL présentent un phénotype M2 caractérisé par l'expression du marqueur CD163 et un sécrétome pro-tumoral qui favorise la survie et la prolifération des cellules tumorales (Papin et al., 2019).

Mon premier objectif de thèse a consisté en l'étude du microenvironnement immunitaire du LCM :

Dans un premier temps, nous avons étudié les modulations moléculaires induites par le microenvironnement en comparant les gènes différentiellement exprimés dans des biopsies de ganglions tumoraux et des échantillons de sang périphérique aux gènes induits dans les cellules tumorales en coculture avec le modèle « CD40L + Ck ». Cette première analyse nous a permis d'identifier l'IL-32 comme un facteur régulé par le microenvironnement et de façon spécifique à la tumeur. Nous avons ensuite étudié le dialogue soluble au sein de la triade LCM / lymphocytes T / macrophages à travers l'utilisation des systèmes de cocultures *ex vivo* préalablement établis par l'équipe. Ce premier projet nous a permis de mettre en évidence le rôle pro-tumoral de l'axe IL32/BAFF contrôlé par la voie NFkB2 au sein de l'écosystème myéloïde et lymphoïde du LCM. A travers cette étude, nous avons montré que le ciblage de la kinase NIK, impliquée dans l'activation de la voie alterne de NFkB, pourrait représenter une stratégie thérapeutique pertinente pour contrecarrer la survie tumorale induite par les interactions avec l'écosystème (Decombis et al., 2022).

En parallèle, à partir d'échantillons de ganglions de patients atteints de LCM classique ou blastoïde inclus en paraffine (FFPE), nous avons réalisé une étude *in situ* de la composition et de la disposition spatiale des cellules immunitaires présentes au sein du microenvironnement ganglionnaire. A travers la mise au point de plusieurs multimarquages en immunohistochimie multiplex, l'objectif était de mieux caractériser les infiltrats myéloïdes (CD68) et lymphoïdes (CD3, CD4, CD8, FOXP3) au contact des cellules de LCM (Cycline D1, Ki67). Les résultats préliminaires obtenus nous ont permis de mettre en évidence une infiltration des lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et FOXP3⁺ et des macrophages CD68⁺ ainsi qu'une proximité entre les cellules tumorales Cycline D1⁺ et les différents types de lymphocytes T au sein de la niche ganglionnaire du LCM.

Les résultats des travaux de l'équipe basés sur l'étude du microenvironnement du LCM (Chiron et al., 2016) ont participé au rationnel de l'essai clinique de phase 1 OAsIs (Prof. S. Le Gouill NCT#02558816). Ce dernier a permis d'évaluer la faisabilité d'un traitement séquentiel avec l'Ibrutinib, favorisant la migration des cellules de LCM de la niche ganglionnaire vers le sang, et l'Obinutuzumab, inhibant in situ BCL-XL, suivi du Venetoclax, très efficace dans les cellules circulantes et/ou exprimant faiblement BCL-XL. Malgré une bonne tolérance de cette trithérapie ainsi que des résultats prometteurs de cette approche sans « chimiothérapie », environ 1/3 des patients progressent ou rechutent rapidement (Le Gouill et al., 2021).

Mon deuxième objectif de thèse a consisté en l'étude des mécanismes de résistance du LCM à la trithérapie OAsIs. En intégrant des analyses génomiques, transcriptomiques à la résolution de la cellule unique et fonctionnelles, nous avons identifié des mutations gain de fonction (GOF) de *CARD11* à la rechute après la trithérapie et nous avons démontré l'implication de l'axe CARD11/NFkB1/BCL2A1 dans la résistance à OAsIs. A travers cette étude, nous proposons une nouvelle stratégie thérapeutique qui consiste à cibler MALT1 et BCL2 afin de contrecarrer les résistances induites par les mutations de *CARD11*. Ce projet, dont je suis première auteure, est en cours de soumission **(Figure 22)**.



Figure 22 : Rôle central des voies NFkB dépendantes de l'écosystème tumoral et d'anomalies génomiques dans la survie et la résistance du LCM. Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude du microenvironnement immunitaire du LCM in vitro afin de comprendre le dialogue soluble au sein de la triade LCM / lymphocytes T / macrophages et in situ dans le but de décrire l'architecture de la niche ganglionnaire du LCM. Dans un second temps, nous avons étudié les anomalies génomiques impliquées dans la résistance à la thérapie OAsIs. Nos données mettent en évidence un rôle central des voies NFkB classique et alterne, dépendantes de l'écosystème tumoral et d'anomalies génomiques, dans la résistance du LCM. L'étude de ces anomalies d'origines microenvironnementales et génomiques nous a permis de proposer des stratégies thérapeutiques alternatives basées sur les mécanismes de résistance et ciblant les protéines NIK (NFkB alterne) et MALT1 (NFkB classique).

RESULTATS

Au cours de ma thèse, j'ai étudié les mécanismes moléculaires de survie et de résistance du LCM en intégrant la tumeur au sein de son écosystème. J'ai ainsi identifié des mécanismes résultant :

- du dialogue soluble pro-tumoral au sein de la triade LCM / lymphocytes T / macrophages
- > des anomalies intrinsèques à la tumeur

Ces deux axes d'étude ont mis en évidence le rôle central des voies NFkB classique, à travers l'identification de mutations gain de fonction (GOF) de *CARD11*, et alternative, impliquant la signalisation CD40/CD40L et BAFF/BAFFR, dans la biologie du LCM.

I) Etude du microenvironnement immunitaire du LCM

Un rôle central du microenvironnement immunitaire (lymphoïde et myéloïde) dans l'émergence du LCM a été mis en évidence par notre équipe ces dernières années (Chiron et al., 2016 ; Tessoulin et al., 2019 ; Papin et al., 2019).

Au cours de la thèse, j'ai continué à documenter les interactions et les dialogues cellulaires et moléculaires au sein de la niche tumorale du LCM.

Dans un premier temps, j'ai étudié les modulations moléculaires induites par le microenvironnent du LCM ainsi que le dialogue soluble qui s'établit au sein de la triade LCM / lymphocytes T / macrophages en utilisant des modèles de cocultures de cellules primaires *ex vivo*.

En parallèle, j'ai étudié la composition de l'écosystème immunitaire tumoral *in situ* à travers la mise au point de la technologie d'immunohistochimie multiplex sur des coupes de ganglions. Cette technique permet d'étudier la disposition spatiale des cellules du microenvironnement immunitaire du LCM afin d'évaluer la proximité cellulaire, les interactions et l'enrichissement immunitaire.

I.1) Etude du dialogue soluble au sein du microenvironnement immunitaire du LCM: Article « The IL32/BAFF axis supports prosurvival dialogs in the lymphoma ecosystem and is disrupted by NIK inhibition »

Le LCM, contrairement aux autres lymphomes B, est caractérisé par une dissémination précoce et fréquente des cellules tumorales dans la moelle osseuse et le sang périphérique. Cette caractéristique biologique permet de recueillir des cellules de LCM circulantes afin de comparer les cellules tumorales dans plusieurs tissus et d'identifier les régulations spécifiques des écosystèmes tumoraux. Notre équipe a montré l'importance de l'activation de CD40 dans la prolifération et la survie des cellules de LCM *in vitro* suggérant un rôle essentiel du signal lymphoïde au sein du microenvironnement ganglionnaire. Sur la base de l'interaction CD40/CD40L associée à des facteurs solubles pro-tumoraux (IL-6, IL-10, IGF-1 et BAFF), un modèle de coculture *ex vivo* 2D « CD40L + Ck » a été élaboré par l'équipe afin de mimer les signaux émanant de l'écosystème ganglionnaire. Cette coculture soutien la survie et l'expansion des cellules tumorales périphériques arrêtées en phase G1 (Chiron et al., 2016).

Afin de déchiffrer les modulations moléculaires qui se produisent dans les niches ganglionnaires du LCM, nous avons analysé l'expression différentielle des gènes dans des biopsies de ganglions tumoraux et des échantillons de sang périphérique. Etant donné que les biopsies ganglionnaires présentent des infiltrations hétérogènes en cellules immunitaires et tumorales, nous avons comparé les modulations transcriptomiques issues des ganglions tumoraux avec les modulations observées dans les cellules de LCM triées (CD19⁺) en coculture avec le modèle « CD40L + Ck ». Cette analyse a permis dans un premier temps de confirmer la pertinence du modèle d'étude *ex vivo* « CD40L + Ck », 70% des gènes induits *ex vivo* étant surexprimés *in situ* dans les ganglions par rapport aux cellules tumorales circulantes. Par la suite, en comparant les gènes dépendants du microenvironnement (*in vivo* et *ex vivo*) avec les gènes exprimés par les lymphocytes B normaux en coculture avec le même modèle « CD40L + Ck », nous avons identifié les régulations héritées des lymphocytes B normaux (61% des gènes) et spécifiques à la tumeur (39% des gènes). A travers cette analyse, nous avons identifié l'*IL32* au premier rang des gènes régulés par le microenvironnement et de façon spécifique à la tumeur.

L'IL-32 possède plusieurs isoformes avec des fonctions différentes. L'IL-32β est la forme la plus décrite en cancérologie et représente la forme majoritaire identifiée dans le LCM *via* une analyse bioinformatique d'épissage issue de nos données de RNA-seq (5'seq, full lenght). A travers cette étude, nous avons évalué le rôle de cette cytokine au sein de l'écosystème du LCM. J'ai dans un premier temps confirmé l'expression transcriptomique et protéique de l'IL-

 32β dans les cellules au sein des ganglions et également *in situ* dans des coupes de ganglions de patients. Grâce à une technique d'immunohistochimie multiplex, nous avons montré que l'IL- 32β est plus exprimée par les cellules de LCM à proximité des lymphocytes T que dans des zones exclusives à la tumeur. Ces données suggèrent que l'expression de l'IL- 32β résulte d'une interaction entre les cellules tumorales et les lymphocytes T.

J'ai mis en évidence que la sécrétion d'IL-32 β par les cellules de LCM est sous le contrôle de la voie alterne de NFkB (*NFKB2*), elle-même activée lors de l'interaction CD40/CD40L. Cette interaction CD40/CD40L induit l'activation de la voie alterne de NFkB dans les lymphocytes B normaux et tumoraux mais l'expression de l'IL-32 β est spécifique de la tumeur. Nous avons mis en évidence que dans les lymphocytes B tumoraux, mais pas dans les lymphocytes normaux, des îlots CpG du promoteur de l'*IL32* sont hypométhylés ce qui expliquerait l'expression de l'IL-32 β restreinte à la tumeur.

Nous avons ensuite évalué le rôle fonctionnel de l'IL-32β au sein de l'écosystème tumoral du LCM. Nous n'avons pas observé de rôle autocrine sur la survie ou la prolifération des cellules tumorales stimulées par cette cytokine. En revanche, nous avons montré que l'IL-32β modifie la capacité des monocytes et des macrophages à produire des facteurs solubles pro- et antiinflammatoires, suggérant un potentiel rôle paracrine de cette cytokine au sein de l'écosystème tumoral. Parmi les facteurs sécrétés par les macrophages stimulés par l'IL-32β (Mφ32), nous avons montré une sécrétion d'IL-6, IL-10 et de BAFF. Seul BAFF a montré un soutient de la survie des cellules primaires de LCM sur le long terme (7 jours *ex vivo*), à un niveau similaire à celui du surnageant des Mφ32, en activant la voie alterne de NFkB. Nous avons ensuite mis en évidence que la plupart des échantillons de LCM expriment le récepteur de BAFF (BAFFR). En utilisant un anticorps anti-BAFFR, nous avons observé une baisse de l'activation de la voie alterne de NFkB et de la survie tumorale. Ces données témoignent du rôle important de BAFF dans le soutien de la survie tumorale dépendante de la voie alterne de NFkB.

La kinase NIK possède un rôle central dans l'activation de la voie alterne de NFkB. En effet, cette kinase entraine la phosphorylation de IKK α qui phosphoryle à son tour la protéine p100 conduisant à son clivage par le protéasome afin de générer la protéine p52 qui, complexée à RelB, va être transloquée au noyau pour activer la transcription de gènes cibles. Nous avons montré que l'inhibition spécifique de la voie alterne de NFkB par le ciblage de la kinase NIK entraine une baisse de l'expression de l'IL-32 β dans les cellules de LCM mais également une diminution de la survie BAFF-dépendante des cellules tumorales (**Figure 23**).

Des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BTK, tels que l'Ibrutinib, ont été précédemment identifiés (délétion bi allélique de *TRAF3* et une mutation non-sens de *TRAF2*)

et impliquent l'activation de la voie alterne **(Rahal et al., 2014)**. Le ciblage spécifique de la voie alterne de NFkB à travers l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de NIK pourrait représenter une stratégie thérapeutique intéressante pour les patients résistants aux inhibiteurs du BTK et présentant une voie alterne constitutivement activée.



Figure 23 : Implication de l'axe IL32/BAFF dans les dialogues au sein de l'écosystème tumoral du LCM perturbé par l'inhibition de NIK. Les interactions entre les cellules de LCM et les lymphocytes T, par l'intermédiaire de l'axe CD40/CD40L, entraînent l'activation des voies NFκB (NFκB1/2) et la sécrétion d'IL-32 par les cellules tumorales dans leur écosystème. Le promoteur de l'IL32 est hypométhylé dans les cellules LCM par rapport aux lymphocytes B normaux (NBC) entrainant ainsi une expression d'IL-32 restreinte à la tumeur. Cette cytokine est impliquée dans la différenciation des monocytes en macrophages CD163⁺ associés aux lymphomes (Mφ32). Les Mφ32 sont caractérisés par un sécrétome spécifique contenant la cytokine BAFF qui soutient la survie tumorale dépendante de l'axe BAFFR/NFkB2. L'inhibition sélective de NIK contrecarre à la fois la sécrétion d'IL-32 par les cellules de LCM et la survie tumorale dépendante de BAFF.

J'ai présenté ces résultats lors d'une communication orale au congrès de l'American Society of Hematology à Atlanta en décembre 2021 **(Annexe 1)**. Notre article intitulé : « The IL32/BAFF axis supports prosurvival dialogs in the lymphoma ecosystem and is disrupted by NIK inhibition » a été publié dans le journal Haematologica en mars 2022 **(Decombis et al., 2022)**.

The IL32/BAFF axis supports prosurvival dialogs in the lymphoma ecosystem and is disrupted by NIK inhibition

Salomé Decombis,^{1,2,3} Antonin Papin,^{1,2,3} Céline Bellanger,^{1,2,3} Clara Sortais,^{1,2,3,4} Christelle Dousset,^{1,2,3,4} Yannick Le Bris,^{1,2,3,5} Thiphanie Riveron,^{1,2,3} Stéphanie Blandin,⁶ Philippe Hulin,⁶ Benoit Tessoulin,^{1,2,3,4} Mathieu Rouel,^{1,2,3} Steven Le Gouill,^{1,2,3,4} Agnès Moreau-Aubry,^{1,2,3} Catherine Pellat-Deceunynck^{1,2,3} and David Chiron^{1,2,3}

¹Nantes Université, INSERM, CNRS, Université d'Angers, CRCI2NA; ²L'Héma-NexT, i-Site NexT; ³GDR3697 Micronit, CNRS; ⁴Service d'Hématologie Clinique, Unité d'Investigation Clinique, CHU; ⁵Service d'Hématologie Biologique, CHU and ⁶SFR-Santé, INSERM UMS016, CNRS UMS 3556, FED 4202, Nantes Université, CHU, Nantes, France

Correspondence: D. Chiron david.chiron@univ-nantes.fr

Received: Accepted:

August 11, 2021. February 9, 2022. Prepublished: March 10, 2022.

https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279800

©2022 Ferrata Storti Foundation Published under a CC BY-NC license 💽 🛈 🟵

Abstract

Aggressive B-cell malignancies, such as mantle cell lymphoma (MCL), are microenvironment-dependent tumors and a better understanding of the dialogs occurring in lymphoma-protective ecosystems will provide new perspectives to increase treatment efficiency. To identify novel molecular regulations, we performed a transcriptomic analysis based on the comparison of circulating MCL cells (n=77) versus MCL lymph nodes (n=107) together with RNA sequencing of malignant (n=8) versus normal B-cell (n=6) samples. This integrated analysis led to the discovery of microenvironment-dependent and tumor-specific secretion of interleukin-32 beta (IL32 β), whose expression was confirmed *in situ* within MCL lymph nodes by multiplex immunohistochemistry. Using ex vivo models of primary MCL cells (n=23), we demonstrated that, through the secretion of IL32 β , the tumor was able to polarize monocytes into specific MCL-associated macrophages, which in turn favor tumor survival. We highlighted that while IL32β-stimulated macrophages secreted several protumoral factors, they supported tumor survival through a soluble dialog, mostly driven by BAFF. Finally, we demonstrated the efficacy of selective NIK/alternative-NFκB inhibition to counteract microenvironment-dependent induction of IL32β and BAFF-dependent survival of MCL cells. These data uncovered the IL32β/BAFF axis as a previously undescribed pathway involved in lymphoma-associated macrophage polarization and tumor survival, which could be counteracted through selective NIK inhibition.

Introduction

Although for years most studies have focused on tumor cells, allowing the discovery of numerous key (epi)-genetic aberrations and oncogenic pathways, it is now widely accepted that ecosystem integration is also critical for the understanding of cancer progression. Evidence demonstrating that the tumor ecosystem plays a central role in tumoral expansion and treatment resistance has continued to accumulate since the emergence of the tumor microenvironment concept more than a century ago.¹ Indeed, the tumor ecosystem has shown multiple facets, from its critical role in cancer metabolism to the influence of mechanical constraints, not to mention the diversity of immune infiltrates.² A better understanding of the tumor microenvironment now supports the development of next-generation therapeutic strategies, such as rational targeted therapy combinations to bypass microenvironment-dependent resistance,³ immune checkpoint inhibitors and bi-specific antibodies.⁴

Mantle cell lymphoma (MCL) is a rare and mostly incurable B-cell malignancy and strategies to overcome resistance and treat MCL relapses are an unmet medical need.⁵ Over the past decades, most studies have focused on structural and functional genomic anomalies which have led to important discoveries regarding the molecular origin of MCL (e.g., t(11;14)), factors involved in the highly heterogeneous clinical course of this disease (e.g., SOX11, TP53, and CDKN2A),⁶⁻⁸ as well as markers of drug resistance.9-11 In contrast to intrinsic tumoral anomalies, the dialog between MCL and its tumor microenvironment was largely ignored. Nevertheless, we, and others, have suggested a dynamic dialog within lymph nodes, which are the primary zone of MCL expansion. MCL cells are able to shape their microenvironment,¹² whereas the latter is necessary to trigger cell cycle activation,¹³ inhibition of apoptosis and drug resistance¹⁴ as well as activation of oncogenic pathways, such as nuclear factor kappa B (NF κ B) and B-cell receptor (BCR) pathways.¹⁵ These findings confirmed the need to consider the biology of the tumor microenvironment in MCL and encourage further studies to understand the complexity of its dialogs and the supporting molecular regulations.

Unlike other B-cell lymphomas, MCL is characterized, as promptly as at diagnosis, by early dissemination in virtually all patients, with a significant number of circulating lymphoma cells, mostly in the bone marrow and peripheral blood (PB).¹⁶ This characteristic allows the comparison of tumor cells within several organs and the identification of regulations specifically induced in the lymphoid niches. To identify tumor microenvironmentdependent molecular regulations in MCL, we first performed a global unbiased transcriptomic analysis integrating samples from PB and lymph node (LN) tissue and cells from ex vivo models. Our analysis uncovered the microenvironment-dependent and tumor-specific expression of interleukin-32 (IL32), a soluble factor whose role in lymphomas is unknown. We showed that tumorspecific IL32 plays a major role in the corruption of the immune ecosystem that supports MCL survival and identified druggable therapeutic targets involved in these interplays.

Methods

Primary cell culture

MCL cells were obtained after informed consent from patients according to protocols approved by local institutional review boards (REFRACT-LYMA cohort; ethical approval GNEGS-2015-09-13¹⁷) and in accordance with the Declaration of Helsinki. The patients' characteristics are summarized in *Online Supplementary Table S1*. For comparison with normal naïve CD5⁺ B cells (NBC), cord blood B cells were isolated and cultured using the same protocol. As previously described, MCL and NBC were cultured with growth factors (interleukin [IL]10: 50 ng/mL, B-cell activating factor [BAFF]: 50 ng/mL, insulin-like growth factor-1 [IGF1]: 10 ng/mL, IL6: 1 ng/mL) on adherent CD40L-expressing fibroblasts previously treated with mitomycin-C.¹³ The ratio of adherent cells to MCL cells was 1:10.

PB was obtained from age-matched (>60 years) healthy donors. Monocytes were obtained by elutriation and T cells were separated using anti-human CD3 magnetic beads. M1 and M2-10 monocyte-derived macrophages (M ϕ) were generated *in vitro* as previously described.¹² Regarding M ϕ -32, monocytes were differentiated with CSF1 (M-CSF, 50 ng/mL, for 5 days) before activation with recombinant human (rh)IL32 β (100 ng/mL, for 2 days).

Bioinformatics analysis

Gene expression profiling

Publicly available datasets for MCL cells in LN (n=107) or PB (n=77) were collected from the Gene Expression Omnibus database (GSE70910, GSE16455, GSE21452, GSE35426, GSE36000, GSE124931 and GSE95405) and analyzed as previously described.¹⁴

Full-length RNA-sequencing

CD19⁺CD5⁺ MCL cells from PB (n=4) and CD19⁺CD5⁺ B cells from cord blood (NBC, n=3) were cultured *ex vivo* on CD40L-expressing fibroblasts with growth factors for 7 days.¹³ RNA was sequenced at baseline (day 0) and after 7 days of culture. "Tumor-specific" and "Shared with NBC" genes were determined by comparing the transcriptome of MCL cells with that of NBC. "Tumor-specific" genes were found to be upregulated in culture *ex vivo* and in LN *in vivo* but not in NBC samples.

3'seq-RNA profiling¹⁸

Briefly, raw counts were normalized and transformed and differential gene expression was assessed with the DESeq2 package in R. Similar results were obtained using the EdgeR package in R. Principal component analysis was performed by FactoMineR and factoextra packages. A hierarchical ascendant clustering was performed using Euclidean distances and the Ward.D2 method. Heatmaps were created using the ComplexHeatmap package. All datasets were deposited in the Gene Expression Omnibus database (GSE179636 and GSE179766).

Multiplex immunohistochemistry

Formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections were subjected to pretreatment involving antigen retrieval by heating in EDTA buffer at the beginning of the experiment and to a TR1 retrieval between each staining. Tissue sections were then stained for Cyclin D1, IL32, CD68 and CD3 with polymer enhancer and HRP 2-Step polymer and the buffer 1X Plus Amplification Diluent with Opal 570, 650, 520 and 690 for the detection of Cyclin D1, IL32, CD68 and CD3, respectively. We used DAPI (1:4000) to stain the nuclei. The experiment was conducted in an automated lmpath36. Images were acquired on a Nikon A1 RSi confocal fluorescence microscope with spectral module. Additional methods are detailed in the *Online Supplementary Methods* section and *Online Supplementary Table*

S2.

Results

Microenvironment-dependent IL32 expression in mantle cell lymphoma cells is tumor specific We first analyzed differential gene expression between

unpaired MCL samples from LN (n=107) and PB (n=77): 6,887 genes were differentially expressed ($\log_2 Fc > 0.5$ and <-0.5; adjusted *P*-value <0.05) suggesting a central role of the LN ecosystem in MCL transcriptional programs (Figure 1A). The 22 most differentially expressed genes ($\log_2 Fc > 5$ and <-5) were predicted to belong to the extracellular region (*Online Supplementary Figure S1A*), and this was also highlighted by top functional annotations, including extracellular matrixreceptor interactions (hsa#04512), cytokines-cytokine receptor interactions (hsa#04060) and cell adhesion molecules (hsa#04514), reflecting active cellular communication between tumor cells and their ecosystems (*Online Supplementary Figure S1B*).

Because LN sections used for gene expression profiling displayed heterogeneous tumor and immune cell infiltrations, we needed to perform additional analyses to identify MCL-specific transcriptomic regulations. To this end, we compared transcriptomic data from LN with transcriptomic data from CD19⁺ circulating MCL cells cultured on CD40L-expressing cells (Figure 1B). This *ex vivo* culture model was designed to mimic signals occurring in the LN and was composed of CD40L-expressing cells complemented by several protumoral growth factors.¹³ More than 70% of the genes upregulated *ex vivo* in the culture model were also overexpressed in LN as compared with MCL PB (n=3217/4524) (Figure 1B). Accordingly, an MCL "LN signature", as well as previously described signatures enriched in MCL tissue, such as "NF κ B", "BCR" or "NF κ B-inducing kinase (NIK)",¹⁵ were significantly upregulated in the *ex vivo* culture model (*Online Supplementary Figure S1C*).

By comparing the upregulated gene set (upregulated in both LN and culture, n=3,217) with CD40L-stimulated CD5⁺ NBC, we identified that 39% of the differentially expressed genes were tumor-specific (i.e., were not upregulated in NBC) (Figure 1B). Functional annotations showed that the soluble dialog (hsa#04060) was specifically enriched in the tumor ecosystem, in contrast to extracellular matrix-receptor interactions or cell cycle activation, which were shared with NBC (*Online Supplementary Figure S1D*). Scoring of the top genes revealed that *CCL22* and *IL32* were the most upregulated genes within "Shared with NBC" and "Tumor-specific" transcriptional programs, re-



Figure 1. Microenvironment-dependent and tumor-specific IL32 expression in mantle cell lymphoma. (A) Volcano-plot representation of whole transcriptome analysis (publicly available Affimetrix U133, see Methods) from samples of mantle cell lymphoma (MCL) lymph nodes (LN, n=107) compared to MCL peripheral blood samples (PB, n=77). Dotted lines indicate the cut-off for significance (adjusted *P* value <0.05, \log_2 Fc >0.5 or <-0.5). The most greatly modulated genes (\log_2 Fc >5 or <-5) are annotated on the graph. (B) The diagram represents the comparison of the gene set induced in CD19⁺-sorted PB MCL cultured on CD40L *ex vivo* (RNA-sequencing, see Methods) with the gene set differentially expressed between MCL LN and PB (panel A). Common *in vivo* and *ex vivo* upregulation (n=3,217 genes) were compared to the genes induced in normal CD5⁺ B cells (NBC) cultured similarly in order to determine "Shared with NBC" and "Tumor-specific" gene sets. (C) The graphs represent the top 15 genes of "Shared with NBC" and "Tumor-specific" gene sets. (C) The graphs represent the top 15 genes of "Shared with NBC" and "Tumor-specific" gene sets. (C) integrates both *ex vivo* and *in vivo* modulations (\log_2 FC(*ex vivo*)+ \log_2 FC(*in vivo*)). (D) IL32 expression was determined at the RNA level by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis (RT-qPCR, upper panel) and at the protein level (immunoblotting, lower panel) in MCL cell lines.

ARTICLE - MCL protumoral ecosystem

spectively (Figure 1C). While CCL22 production has been previously characterized as microenvironment-dependent in several B-cell malignancies,¹⁹ the mechanisms of regulation and the biological role of IL32 have remained unknown. Constitutive expression of IL32 in three of nine cell lines first confirmed that MCL does indeed have the ability to produce and secrete IL32 (Figure 1D, *Online Supplementary Figure S2A*). Finally, splicing analysis of RNA-sequencing data showed that the predominant isoform in MCL was IL32 β (*Online Supplementary Figure S2B*).

IL32 is expressed in mantle cell lymphoma lymph nodes and is induced *in vitro* upon CD40 triggering

We showed that PB MCL displayed a slight, but significant, overexpression of IL32 when compared to NBC, and high expression was observed in most LN MCL studied (Figure 2A). IL32 induction in LN was confirmed in paired samples both at the RNA (n=8) and protein (n=3) levels (Figure 2B). Consistently with our observation in cell lines, constitutive RNA expression was detected in 24% of PB MCL samples (5 out of 21), independently of p53 status or disease subtype (*Online Supplementary Table S1*). CD40L induced IL32 expression in ten out of 13 MCL samples but not in NBC (Figure 2C, D). Of note, the three samples in which IL32 induction was not detected were all from the indolent leukemic non-nodal subtypes of MCL. A similar CD40-dependent induction of IL32 was observed in MCL cell lines (*Online Supplementary Figure S2C, D*).

To further characterize the pattern of IL32 expression *in situ*, we performed immunohistochemistry on four MCL tissue samples. Figure 3A shows IL32⁺ cells in all four of the four MCL samples. We further used multiplex immunohistochemistry in two samples for the concurrent detection of MCL cells (Cyclin D1), macrophages (CD68), T cells (CD3) and IL32. We observed that IL32 expression was enriched *in situ* in tumor zones infiltrated with T cells (ROI#1 and ROI#2 of sample LN#2, ROI#1 of sample LN#3), compared to areas containing only tumor cells (ROI#2 of LN#3) (Figure 3B, C). Taken together these results show that IL32 is expressed *in situ* by MCL cells in the vicinity of T cells.

CD40L-dependent IL32 expression in mantle cell lymphoma cells depends on the alternative NFKB pathway

We next determined whether NF κ B pathways controlled IL32 induction. CD40 triggers activation of both the classical (ser32/34 I κ B α phosphorylation, pI κ B) and the alter-



Figure 2. IL32 is expressed in mantle cell lymphoma lymph nodes and induced *in vitro* **upon CD40 triggering.** (A) *IL32* gene expression in normal B cells (NBC, n=24) and mantle cell lymphoma (MCL) cells from peripheral blood (PB, n=81) or lymph nodes (LN, n=165) was assessed by gene expression profiling (GEP). Mann-Whitney test. ****P*<0.0005, *****P*<0.0001. (B) IL32 expression was analyzed by GEP in paired MCL cells from PB (n=8) or LN (n=8) and by immunoblot in paired PB and LN tissues (frozen sections) from MCL patients (n=3). *Represents higher exposure for immunoblotting. Wilcoxon-matched pairs sign-rank test. ***P*<0.008 (C) Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis of *IL32* gene was performed in CD5⁺ NBC (n=3) or MCL cells (n=13) cultured on CD40L-expressing cells for 7 days. Wilcoxon-matched pairs sign-rank test. ****P*<0.0005. (D) Immunoblot analysis of IL32 protein expression was performed in CD5⁺ NBC (n=1) or MCL cells (n=4) cultured on CD40L-expressing cells for 7 days.



Figure 3. Protein expression of IL32 in mantle cell lymphoma lymph nodes *in situ.* (A) Expression of IL32 was determined using immunohistochemistry on one spleen (SPL) and three lymph node (LN) sections from four patients with mantle cell lymphoma (MCL). Scale bars, 50 μ m. (B, C) Multiplex immunohistochemistry staining for Cyclin D1 (opal 570; white), CD3 (opal 690; green), CD68 (opal 520; magenta) and IL32 (opal 650; red) was performed on LN sections from two MCL patients (MCL_LN#2, MCL_LN#3). Individual stains and DAPI are shown in *Online Supplementary Figure S9*. For MCL-LN#2, the left panel represents a mosaic, the middle panel (region of interest, ROI#1) a zoom on the sample (scale bars, 50 μ m) and the right panel (ROI#2) represents a projection of 26 Z stacks (range 10 μ m; scale bar 10 μ m). For MCL-LN#3, the left panel represents a large area (scale bar, 100 μ m), the middle panel (ROI#1) shows a CD3-infiltrated area and the right panel (ROI#2) represents a tumor-only area (scale bars, 50 μ m).

native (p52 increase) NF κ B pathways (Figure 4A). Inhibition of I κ B kinases IKK-1/2, using BMS-345541,²⁰ dramatically reduced the activation of both NF κ B pathways and resulted in the complete inhibition of IL32 (*Online Supplementary Figure S3A*). However, siRNA against *NFKB1* failed to reduce IL32 expression in Mino cells (*Online Supplementary Figure S3B*), suggesting that the classical NF κ B pathway was not involved. To confirm the role of the alternative pathway, we used the NIK inhibitor SMI-1, which was recently described as selectively inhibiting the alternative NF κ B pathway.²¹ This NIK inhibitor, which inhibited p52 processing from p100 without inducing any modulation of plkB, resulted in the inhibition of both constitutive (Mino) and CD40L-induced (NTS3, REC1 and primary MCL) IL32 (Figure 4B,C). Of note, the detection of high p52 expression in LN tissue further confirmed the activation of an alternative NFkB pathway *in vivo* (*Online Supplementary Figure S3C*). Nevertheless, even though IL32 induction was restricted to tumor cells, activation of the alternative NFkB pathway was observed in both NBC and MCL cells upon CD40 triggering (Figure 4D). Moreover, p52 constitutive cell lines did not necessarily express IL32 (Figure



Figure 4. CD40L-dependent IL32 expression depends on the alternative NFκB signaling pathway. (A) Immunoblotting of the classical (plκB) and alternative (p52) NF-κB pathways and IL32 protein was performed in mantle cell lymphoma (MCL) cell lines cultured on CD40L-expressing cells for the indicated time. (B, C) Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis of the *IL32* gene (B) and immunoblotting of the indicated proteins (C) were performed in MCL cell lines cultured on CD40L-expressing cells for 96 h in the presence or absence of the NIK inhibitor SMI-1 (NIK-i, 10 μM). (D, E) Immunoblotting of p52 and IL32 proteins in: (D) CD19⁺CD5⁺ NBC (n=2) or CD19⁺CD5⁺ MCL cells (n=3) at day 0 and after culture on CD40L-expressing cells for 7 days and (E) MCL cell lines (n=10).

4E), suggesting that the alternative NF κ B pathway may not be sufficient for IL32 induction, leading us to investigate another layer of regulation.

IL32 is hypomethylated in mantle cell lymphoma cells

We wondered whether the IL32 locus could also be epigenetically regulated. Indeed, decitabine induced IL32 expression in IL32-negative MCL cells (Online Supplementary Figure S4A). Bisulfite sequencing showed that IL32-positive and negative MCL cells displayed a significantly different methylation pattern in both the promoter and CpG islands of the IL32 gene locus (40.5% vs. 73% and 24% vs. 97%, respectively), suggesting that hypomethylation favored IL32 expression (Online Supplementary Figure S4B). Similarly, the IL32 promoter was hypermethylated in NBC compared to MCL cells (100% vs. 40.5%, respectively) and this pattern remained stable even after the NBC were stimulated with CD40L (Online Supplementary Figure S4C, D). Collectively our data argue for epigenetic-driven expression of IL32, explaining the tumor-restricted expression.

Myeloid cells respond strongly to IL32

We next decided to assess the biological consequences of IL32 β production within the MCL ecosystem. We first addressed the role of rhIL32 β on the tumor itself, but did not observe any changes, either on MCL cell survival and proliferation *ex vivo* or on previously-described IL32-induced signaling pathways and expression of protumoral factors²² (Figure 5A, B and *data not shown*). As the IL32 receptor has yet to be identified, we performed functional annotations of IL32 co-regulated genes within lymphoma LN to decipher the cell types that could respond to MCL-produced IL32 β . We observed enrichment in pathways such as phagosome (hsa#04145), chemokine (hsa#04062) and Th17 differentiation (hsa#04659), suggesting myeloid and T-cell involvement in MCL-related IL32β functions (Online Supplementary Figure S5A). In addition, the top IL32 co-regulated genes were enriched with key regulators of macrophage function as well as the T-cell-related marker CD2 (adjusted P value <0.0001) (Online Supplementary Figure S5B). Consistently, the induction of STAT3 phosphorylation on Tyr705 (pSTAT3) in both cell types confirmed the cells' ability to respond to IL32, with monocytes also displaying additional induction of NFκB pathways (Figure 5C). We next analyzed the transcriptome of rhIL32 β -stimulated monocytes (Mono, n=3), monocyte-derived macrophages ($M\phi$, n=3) and T cells (T, n=3). As shown in the principal component analysis, IL32 β greatly modulated both monocytes and $M\phi$, but only slightly the T-cell transcriptome (Figure 5D). Consistently, hierarchical clustering was able to discriminate myeloid cells according to IL32 β stimulation by not T cells (Figure 5E).

We then focused on common modulations and their resulting functional annotations, arising from IL32 β -stimulated monocytes and M ϕ (*Online Supplementary Figure S5C,D*). Consistent with the activation of STAT3 and NF κ B pathways at the protein level (Figure 5C), we observed a significant enrichment in JAK-STAT (hsa#04630) and NF-



Figure 5. Myeloid cells, but not mantle cell lymphoma cells, respond to IL32 β . (A) Survival of mantle cell lymphoma (MCL) cells (n=8) cultured with or without recombinant human (rh)IL32 β (100 ng/mL) for 7 days was measured by lack of annexin-V staining. Wilcoxon-matched pairs sign-rank test: n.s: not significant. (B, C) Immunoblotting of the indicated proteins was performed in (B) MCL cell lines cultured with or without (rh)IL32 β for 6 h or (C) CD14⁺ monocytes and CD3⁺ T cells isolated from healthy donors and cultured with 100 ng/mL of (rh)IL32 β for the indicated times. (D) The figure represents the principal component analysis of monocytes (Mono, n=3), macrophages (M ϕ , n=3) and T cells (T, n=3) cultured for 24 h with or without 100 ng/mL of (rh)IL32 β . M ϕ were first polarized with macrophage colony-stimulating factor (50 ng/mL, for 5 days) and then stimulated during 48 h with 100 ng/mL of (rh)IL32 β . Colored ellipses are drawn around the mean of the group (barycenter), with the 95% confidence interval of the mean in the corresponding plan. (E) An ascendant hierarchical clustering based on 19,203 genes was constructed with the ward.D2 method of Euclidiean distances.

 κ B (hsa#04064) pathways (*Online Supplementary Figure S5D*). In addition, enrichment of several pathways related to soluble factors, such as IL17 (hsa#04657), TNF (hsa#04668), chemokine and cytokine signaling (hsa#04062, hsa#04060), suggested that IL32 β might regulate the secretome of monocytes/M ϕ (*Online Supplementary Figure S5D*). Taken together these results suggested that IL32 β secreted by MCL in its ecosystem would result in the stimulation of monocytes/M ϕ and potentially influence their secretome.

Mantle cell lymphoma-secreted IL32 led to specific differentiation of monocytes into protumoral CD163⁺ macrophages $M\phi$ -32

To determine the nature of the secretome modifications in monocytes/macrophages stimulated by IL32 β , we further focused our analysis on a list of 370 cytokines and chemokines (annotated in GO#0008009 and #0005125). Among them 108 were expressed in at least one sample and many of them were induced after IL32B stimulation in monocytes (n=48) or macrophages (n=40) (Figure 6A). Most of these modulations were observed in both monocytes and macrophages (n=29) and were validated by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction and cytokine array (Online Supplementary Figure S6). To confirm these results with MCL-secreted IL32 β , we generated IL32^{-/-} Mino cells (Online Supplementary Figure Figure S7A, B) and evaluated the ability of their supernatant to induce the validated rhIL32β-modulated genes on monocyte/macrophages (IL1A, IL1B, IL6, IL24, CXCL8, TNFSF13B, and IL32). As expected, IL32-/- MINO supernatant was characterized by a lesser ability to induce these genes in monocytes/macrophages compared to IL32^{+/+} cells (Figure 6B). These results were confirmed with CD40L-stimulated IL32-/- NTS3 cells (Online Supplementary Figure S7C).

Using previously published macrophage subtype characterization,¹² we determined that IL32 β -induced soluble



Figure 6. IL32β secreted by mantle cell lymphoma cells induces differentiation of monocytes into protumoral Mφ-32. (A) Heatmaps of soluble factor transcripts modulated ($\log_2Fc > 0.1$) in monocytes (Mono, n=3) and monocyte-derived macrophages (Mφ n=3) cultured with or without recombinant human (rh)IL32β as described in Figure 5D. For each cell type, the median gene expression was calculated on normalized and transformed data (DESeq2 package). The colors indicate the intensity of the median gene expression as indicated (\log scale). *Indicates that gene expression was confirmed by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) as represented in *Online Supplementary Figure S6A*. (B) The left panel details the experimental protocol related to the right panel. The right panel represents RT-qPCR analysis of seven genes (*IL1A, IL1B, IL6, IL24, CXCL8, IL32* and *BAFF*) in Mono or Mφ cultured, for 24 h or 48 h, respectively, with wild-type (-) or *IL32^{-/-}* (Cr#1) Mino supernatant. (C) Forty-eight IL32β-induced soluble factors on Mono or Mφ were classified as M1-like, M2-like (upper panel) or MφMCL-like (lower panel) as previously reported.¹² (D) CD163 mean fluorescence intensity ratio was determined by flow-cytometry for M1 (n=3), M2-10 (n=4) and Mφ32 (monocyte-derived macrophages differentiated with 50 ng/mL CSF1 for 5 days and then stimulated with 100 ng/mL rhIL32β for 48 h, n=3) and MφMCL (monocyte-derived macrophages in the presence of MCL cells, n=3). M1, M2-10 and MφMCL were generated as previously described.¹² (E) The percentage of MCL live cells was assessed by lack of annexin-V staining after 3 days of culture alone (-) or with Mφ32 and separated by transwell inserts (n=10). Wilcoxon-matched pairs sign-rank test. **P<0.005.

factors were associated with both M1-like (53%) and M2like (47%) secretomes. We recently described such a dual M1/M2 profile in MCL-associated macrophages (M ϕ -MCL) and accordingly 85% of IL32 β -induced factors were found to be expressed by M ϕ -MCL (Figure 6C).¹² In addition, these macrophages (M ϕ -32) displayed similar CD163^{mid} expression, a marker of protumoral macrophages, which we previously described regarding M ϕ -MCL (Figure 6D). Finally, using culture inserts, we confirmed that the M ϕ -32 secretome was protumoral, inducing a 3-fold increase in MCL cell survival compared to that of MCL cells alone (median survival 12.5% *vs.* 38%; *P*<0.01) (Figure 6E). Collectively these results showed that monocytes/macrophages responded to MCL-secreted IL32 β , resulting in their polarization into protumoral CD163^{mid} M ϕ -32 expressing both an M1 and an M2-associated secretome, which was similar to that of M ϕ -MCL.

BAFF is involved in M ϕ -32 prosurvival dialog through activation of the alternative NF κ B pathway in mantle cell lymphoma cells

Lastly, we aimed to discover the factors involved in the prosurvival soluble dialog between M ϕ -32 and MCL cells. We first tested a panel of nine growth factors induced by

IL32 β for their capacity to support long-term (7 days) survival of MCL cells (Figure 7A). Remarkably, only BAFF was able to support MCL-cell survival alone (n=9) at a level similar to that of M ϕ -32 supernatant (s_ M ϕ -32) (Figure 7B).

BAFF binds to three receptors, BAFF-R, TACI and BCMA, the last two being shared with the growth factor, A proliferation-inducing ligand (APRIL). In contrast to BAFF, APRIL did not support MCL survival (Figure 7B), suggesting that TACI and BCMA were not involved in the protumoral dialog studied here. We showed that most MCL cells highly expressed BAFFR and that TNFSF13B expression was enriched in MCL LN when compared to PB (P<0.0001), suggesting a key role of this growth factor in MCL tissue (Online Supple*mentary Figure S8A, B*). We also confirmed that $M\phi$ -32 were able to secrete a significant amount of BAFF, in contrast to MCL (Figure 7C), and showed that rhBAFF induced the selective activation of the alternative NF κ B pathway in MCL cells and cell lines (processing of p52) (Online Supplementary Figure S8C). Accordingly, NIK inhibition was able to counteract the survival support provided by rhBAFF in MCL cells (median reduction of 95%, n=4, P<0.05) (Online Supplementary Figure S8D). NIK inhibition also reduced the survival support provided by $M\phi$ -32 supernatant, with a median reduction of 47% (n=6, P<0.05) and almost complete reduction in three of six samples, suggesting an involvement of BAFF in M ϕ -32 supernatant (Figure 7D). Indeed, in these NIK-inhibitor-sensitive samples, BAFF-R-neutralizing antibodies resulted in the inhibition of $M\phi$ -32 supernatnat protumoral support with a level similar to that of the NIK inhibitor (Figure 7E). Accordingly, Mø-32 supernatant resulted in activation of the alternative NF κ B pathway, which was counteracted using BAFF/BAFF-R-neutralizing antibodies (Figure 7F, Online Supplementary Figure S8E). Taken together, these data showed that BAFF secreted by $M\phi$ -32 was involved in the protumoral dialog with MCL, which can be counteracted by a selective NIK inhibitor or BAFF-R-neutralizing antibodies.

Discussion

IL32 is a newly characterized cytokine of which there are



Figure 7. BAFF supports the M ϕ -32 prosurvival effect through activation of the alternative NF κ B pathway. (A) Schematic representation of the protocol used. (B) Mantle cell lymphoma (MCL) cells (5x10⁵ cells/mL) were cultured with macrophages polarized with IL32 supernatant (s_M ϕ -32, n=6) or growth factors: BAFF (100 ng/mL), IL6 (20 ng/mL), IL10 (100 ng/mL), IL32 β (100 ng/mL), TNF α (20 ng/mL), IL15 (20 ng/mL), APRIL (100 ng/mL), IL1 β (50 ng/mL), IL6 (20 ng/mL), IL24 (100 ng/mL), IL18 (50 ng/mL) and WNT5A (200 ng/mL) (n \geq 3). The percentage of cell rescue was assessed after 7 days of *ex vivo* culture. (C) Concentration of BAFF protein was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay in the supernatant of MCL cell lines (n=5), M1 (n=3) and M ϕ -32 (n=5) monocyte-derived macrophages. Unpaired *t* test. **P*<0.05. (D) The percentage of cell rescue dependent on M ϕ -32 supernatant (s_M ϕ -32) in MCL cells (n=6) cultured with or without an NIK inhibitor (NIK-i, 10 µM) for 7 days was determined by annexin V staining. Paired *t* test. **P*<0.05. (E) Percentage of cell rescue dependent on M ϕ -32 supernatant (s_M ϕ -32) in primary MCL (n=3) cultured with or without NIK inhibitor (NIK-i, 10 µM) or anti-BAFFR neutralizing antibody (4 µg/mL) for 7 days. (F) Immunoblotting of classical (pIKB, IKB) and alternative (p100, p52) NF-KB pathways in MCL cells cultured with M ϕ -32 supernatant (s_M ϕ -32) for 24 h with or without anti-BAFFR neutralizing antibody (4 µg/mL) as indicated.

seven variants, generated by alternative splicing, with differential biological roles. 23,24 IL32 α , IL32 β and IL32 γ are the isoforms that have been studied the most up to now, with IL32 β being the most frequently expressed in cancer,²⁵ as shown here for MCL. The putative receptor for IL32 is unknown and the lack of IL32 expression in rodents considerably limits our knowledge on its physiological roles. Nevertheless, IL32 β expression has been documented in several solid cancers and this cytokine seems to be involved in many biological processes such as migration, metastasis, proliferation, and apoptosis.²⁵ We have shown here that IL32 β , which was secreted by lymphoma cells, did not directly increase tumor cell survival, but participated in the tumor-specific shaping of macrophages. Such a paracrine role of IL32 has been recently described in multiple myeloma, a plasma cell neoplasm,²⁶ reinforcing the critical role of this soluble factor in the ecosystem of B-cell malignancies.

Whereas IL32 was initially characterized for its pro-inflammatory properties,²⁷ recent studies have highlighted that IL32 was preferentially expressed in regulatory T cells in the bone marrow²⁸ and that it was able to promote immunoregulatory responses, especially through the induction of IL10 or indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) by macrophages.²⁹⁻³¹ Here we have confirmed, through a transcriptomic analysis of IL32 β -induced genes in monocytes/macrophages, the ability of IL32 β to induce the production of both pro-inflammatory (e.g., IL6, OSM, IL1 α , and IL1 β) and anti-inflammatory (e.g., IL10, IDO, IL18, IL4L1, and CCL22)^{19,32,33} soluble factors (Figure 5).

We have recently published that, through a soluble interplay, MCL cells polarize monocytes into tumor-specific macrophages (Mø-MCL), which in turn favor tumor survival.¹² We have demonstrated that Mo-MCL express both pro- (M1) and anti- (M2) inflammatory associated secretomes, suggesting that factors other than classical M2polarizing factors (such as MCL-secreted IL10 and CSF-1) might be involved in the $M\phi$ -MCL phenotype. Herein, we have shown that MCL-secreted IL32 β is most likely to be involved in this specific MCL-associated macrophage profile, with most of these M1 and M2-like factors being common to both M ϕ -MCL and M ϕ -32. In addition, M ϕ -32 share $M\phi$ -MCL phenotypic and functional characteristics i.e., CD163^{mid} expression or MCL survival support through soluble dialog, respectively (Figure 6). Only a few studies have addressed the crosstalk between tumor-associated macrophages and MCL cells, so far.^{12,34,35} Of note, a recent publication highlighted that LN infiltrating CD163⁺ MCLassociated macrophages correlate with a poor prognosis in MCL,³⁶ suggesting that targeting this interplay could be an interesting perspective for novel therapeutic options. Of the various IL32 β -induced secretomes, several have been previously described as being involved in MCL expansion, such as IL6, IL10, BAFF and WNT5A.37-40 Nevertheless, we have shown that only BAFF supported the long-term survival of MCL cells alone, at a level similar to that observed with the M ϕ -32 supernatant. Although BAFF is a well-described survival and growth factor for both normal and malignant B cells,³⁹ only a few publications have addressed the functional consequences of BAFF stimulation in MCL.⁴¹ We have shown that most MCL samples express BAFF-R, and its activation leads to selective processing of the alternative NFkB pathway (Figure 7). Of note, Medina and colleagues previously demonstrated that mesenchymal stem cell-dependent MCL survival was also mediated by BAFF, suggesting a central role for this growth factor in MCL ecosystems.⁴² Neutralizing antibodies are available for targeting either BAFF (belimumab) or BAFF-R (VAY-736), both of which display interesting preclinical activity, alone or in combination with BTK inhibitors, in B-cell malignancies such as chronic lymphocytic leukemia.43,44

Our results highlight a major role of the alternative NFκB pathway in the interplay between CD40-activated MCL cells and macrophages, especially through the IL32/BAFF axis. Saba and colleagues highlighted that a so-called "NIK signature", reflecting the activity of the alternative NF_KB pathway, was enriched in MCL LN tissue compared to PB.¹⁵ Consistent with these results, we previously demonstrated strong processing of p52 in our CD40L culture model designed to mimic signals occurring within the LN.¹³ Here we have confirmed that MCL cells cultured in this model are also characterized by the NIK signature (Online Supplementary Figure S1). The alternative NF_KB pathway is frequently constitutively activated in MCL by intrinsic anomalies in several key elements of this pathway, such as MAP3K14 (coding for NIK), TRAF2, BIRC3 and TRAF3.45 In the present work, we have shown that activation of the alternative NFkB pathway is also able to influence the MCL ecosystem through microenvironment-dependent and tumor-specific IL32 induction and consecutive macrophage (re)programming. Thus, the alternative $NF\kappa B$ pathway activation can be the consequence of both intrinsic anomalies and microenvironment interactions, highlighting a central role of this pathway, which appeared to be involved in drug resistance. Indeed, Rahal and colleagues showed that its constitutive activity was involved in resistance to ibrutinib in MCL cell lines.¹¹

We previously demonstrated that CD40L-dependent survival was associated with an NF κ B-dependent imbalance of the BCL-2 family in MCL, including dramatic induction of anti-apoptotic proteins such as BCLxL.^{13,14} Even though BAFF is a well-described pro-survival factor, the precise molecular mechanisms involved in BAFF-dependent survival remain elusive and cell-type dependent^{4.6,47} In contrast to CD40L, BAFF did not induce BCLxL or MCL1 in MCL cells and only a transitory increase of BCL2A1 was detected in cell lines (*Online Supplementary Figure S8F*-



Figure 8. The IL32/BAFF axis supports prosurvival dialogs in the lymphoma ecosystem and is disrupted by NIK inhibition. Interactions between tumor cells and T cells, through the CD40-CD40L axis, result in activation of the NFkB pathways (NFkB1/2) and in NFkB2-dependent secretion of IL32 by tumor cells within their ecosystem. IL32 promoter is hypomethylated in mantle cell lymphoma (MCL) cells compared to normal B cells (NBC) resulting in tumor-restricted IL32 expression. The latter is involved in monocyte differentiation into lymphoma-associated CD163⁺ macrophages (M ϕ -32). M ϕ -32 are characterized by a specific secretome, which includes BAFF, and supports BAFF-R/NFκB2-dependent tumoral survival. Selective NIK inhibition counteracts NFκB2 activation and consequently prevents both IL32 secretion by MCL cells and BAFF-dependent MCL-survival.

H). Taken together, our data suggest that complementary protumoral pathways occur within the ecosystem. Further studies, such as modulations of BCL2-family complexes at the mitochondrial level and characterization of mitochondrial priming upon BAFF stimulation, are now necessary to decipher the molecular mechanisms involved in BAFF/NF κ B2 dependent regulation of apoptosis in MCL.

The specific inhibition of the alternative NFκB pathway was barely achievable until the very recent development of specific NIK inhibitors.^{21,48} NIK is a kinase selectively involved in the alternative pathway by activating $I\kappa K\alpha$, which in turn induces the cleavage of p100 to p52, without affecting the canonical pathway. Here, we have confirmed the efficacy of NIK inhibition in counteracting microenvironment-dependent induction of IL32 (Figure 4) and BAFF-dependent survival of MCL cells (Figure 7). The central role of the NF κ B pathways in mature B-cell malignancies is well-documented,49,50 reinforcing the strong rationale to specifically target this pathway. Further development of molecules that selectively target key elements of the alternative NFkB pathway (e.g., NIK and RELB) as well as their evaluation in early phase clinical trials are now needed to address their potential therapeutic value.

IL32β/BAFF axis in MCL-associated macrophage polarization and tumor survival. Our data show that targeting IL32 β , BAFF or the alternative NF κ B pathway could be of major interest for counteracting the multiple cross-talk that occurs in the MCL microenvironment and, especially, the CD40L⁺ T-cell/MCL/CD163⁺ MCL-associated macrophage triad (Figure 8).

Disclosures

No conflicts of interest to disclose.

Contributions

SD and AP designed and performed the experiments and analyzed data. CB performed experiments and participated in bioinformatics. CS, CD, TR, AMA and YLB performed experiments and analyzed data. BT and MR participated in the bioinformatics analysis. SB and PH participated in immunohistochemistry experiments and analysis. SLG participated in the design of the study. CPD participated in the design of the study, in the data analysis, and in writing the article. DC designed the study, performed experiments, analyzed data, and wrote the article.

Acknowledgments

In summary, our data reveal the involvement of the The authors thank la Ligue Contre le Cancer Grand-Ouest,

i-Site NexT (ANR-16-IDEX-0007), the SIRIC ILIAD (INCa-DGOS-Inserm_12558), ERRATA (Région Pays de la Loire pro-gram 2015-2018) and Actions Cancer 44. CS is the recipient of a fellowship from Plan Cancer (FRFT). MicroPICell facility is a member of the national infrastructure France-Bio-Imaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). The authors thank Dr. Martine Amiot for her critical review of the manuscript. The authors are also most grateful to the Genomics and Bioinformatics Core Fa-

cility of Nantes (GenoBiRD, Biogenouest, IFB) and the flow cytometry core facility (Cytocell, SFR Bonamy) for their technical support.

Data-sharing statement

RNA-sequencing datasets are publicly available in the Gene Expression Omnibus. All other datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- 1. Maman S, Witz IP. A history of exploring cancer in context. Nat Rev Cancer. 2018;18(6):359-376.
- 2. Jin M-Z, Jin W-L. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. Signal Transduct Target Ther. 2020;5(1):1-16.
- 3. Le Gouill S, Morschhauser F, Chiron D, et al. Ibrutinib, obinutuzumab and venetoclax in relapsed and untreated patients with mantle-cell lymphoma, a phase I/II trial. Blood. 2020;137(7):877.
- 4. Pytlik R, Polgarova K, Karolova J, Klener P. Current immunotherapy approaches in non-Hodgkin lymphomas. Vaccines. 2020;8(4):708.
- 5. Campo E, Rule S. Mantle cell lymphoma: evolving management strategies. Blood. 2015;125(1):48-55.
- 6. 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(5):604-611.
- 7. Eskelund CW, Dahl C, Hansen JW, et al. TP53 mutations identify younger mantle cell lymphoma patients who do not benefit from intensive chemoimmunotherapy. Blood. 2017;130(17):1903-1910.
- Nadeu F, Martin-Garcia D, Clot G, et al. Genomic and epigenomic insights into the origin, pathogenesis, and clinical behavior of mantle cell lymphoma subtypes. Blood. 2020;136(12):1419-1432.
- 9. Agarwal R, Chan Y-C, Tam CS, et al. Dynamic molecular monitoring reveals that SWI–SNF mutations mediate resistance to ibrutinib plus venetoclax in mantle cell lymphoma. Nat Med. 2019;25(1):119-129.
- 10. 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.
- Rahal R, Frick M, Romero R, et al. Pharmacological and genomic profiling identifies NF-κB-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. Nat Med. 2014;20(1):87-92.
- Papin A, Tessoulin B, Bellanger C, et al. CSF1R and BTK inhibitions as novel strategies to disrupt the dialog between mantle cell lymphoma and macrophages. Leukemia. 2019;33(10):2442-2453.
- 13. Chiron D, Bellanger C, Papin A, et al. Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma. Blood. 2016;128(24):2808-2818.
- 14. Tessoulin B, Papin A, Gomez-Bougie P, et al. BCL2-family dysregulation in B-cell malignancies: from gene expression regulation to a targeted therapy biomarker. Front Oncol. 2018;8:645.

- 15. Saba NS, Liu D, Herman SE, et al. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF-κB activation in mantle cell lymphoma. Blood. 2016;128(1):82-92.
- Ferrer A, Salaverria I, Bosch F, et al. Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. Cancer. 2007;109(12):2473-2480.
- Hanf M, Chiron D, de Visme S, et al. The REFRACT-LYMA cohort study: a French observational prospective cohort study of patients with mantle cell lymphoma. BMC Cancer. 2016;16(1):802.
- Charpentier E, Cornec M, Dumont S, et al. 3'RNA sequencing for robust and low-cost gene expression profiling.
 2021 Jan 15: https://doi.org/10.21203/rs.3.pex-1336/v1 [preprint, not peer-reviewed].
- Rawal S, Chu F, Zhang M, et al. Cross talk between follicular Th cells and tumor cells in human follicular lymphoma promotes immune evasion in the tumor microenvironment. J Immunol. 2013;190(12):6681-6693.
- 20. Burke JR, Pattoli MA, Gregor KR, et al. BMS-345541 is a highly selective inhibitor of IκB kinase that binds at an allosteric site of the enzyme and blocks NF-κB-dependent transcription in mice. J Biol Chem. 2003;278(3):1450-1456.
- 21. Brightbill HD, Suto E, Blaquiere N, et al. NF-κB inducing kinase is a therapeutic target for systemic lupus erythematosus. Nat Commun. 2018;9(1):1-14.
- 22. Sloot YJ, Smit JW, Joosten LA, Netea-Maier RT. Insights into the role of IL-32 in cancer. Semin Immunol. 2018;38:24-32.
- 23. Aass KR, Kastnes MH, Standal T. Molecular interactions and functions of IL-32. J Leuk Biol. 2021;109(1):143-159.
- 24. Sohn DH, Nguyen TT, Kim S, et al. Structural characteristics of seven IL-32 variants. Immune Netw. 2019;19(2):e8.
- 25. Han S, Yang Y. Interleukin-32: frenemy in cancer? BMB Rep. 2019;52(3):165.
- 26. Zahoor M, Westhrin M, Aass KR, et al. Hypoxia promotes IL-32 expression in myeloma cells, and high expression is associated with poor survival and bone loss. Blood Adv. 2017;1(27):2656-2666.
- 27. Kim S-H, Han S-Y, Azam T, Yoon D-Y, Dinarello CA. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFα. Immunity. 2005;22(1):131-142.
- 28. Zavidij O, Haradhvala NJ, Mouhieddine TH, et al. Single-cell RNA sequencing reveals compromised immune microenvironment in precursor stages of multiple myeloma. Nat Cancer. 2020;1(5):493-506.
- 29. Kang JW, Choi SC, Cho MC, et al. A proinflammatory cytokine interleukin-32β promotes the production of an antiinflammatory cytokine interleukin-10. Immunology. 2009;128(1pt2):e532-e540.

- 30. Smith AJ, Toledo CM, Wietgrefe SW, et al. The immunosuppressive role of IL-32 in lymphatic tissue during HIV-1 infection. J Immunol. 2011;186(11):6576-6584.
- 31. Yan H, Dong M, Liu X, et al. Multiple myeloma cell-derived IL-32γ increases the immunosuppressive function of macrophages by promoting indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) expression. Cancer Lett. 2019;446:38-48.
- 32. Carbonnelle-Puscian A, Copie-Bergman C, Baia M, et al. The novel immunosuppressive enzyme IL4I1 is expressed by neoplastic cells of several B-cell lymphomas and by tumorassociated macrophages. Leukemia. 2009;23(5):952-960.
- 33. Nakamura K, Kassem S, Cleynen A, et al. Dysregulated IL-18 is a key driver of immunosuppression and a possible therapeutic target in the multiple myeloma microenvironment. Cancer Cell. 2018;33(4):634-648.
- 34. Song K, Herzog BH, Sheng M, et al. Lenalidomide inhibits lymphangiogenesis in preclinical models of mantle cell lymphoma. Cancer Res. 2013;73(24):7254-7264.
- 35. Le K, Sun J, Khawaja H, et al. Mantle cell lymphoma polarizes tumor-associated macrophages into M2-like macrophages, which in turn promote tumorigenesis. Blood Adv. 2021;5(14):2863-2878.
- 36. Rodrigues JM, Nikkarinen A, Hollander P, et al. Infiltration of CD163-, PD-L1- and FoxP3-positive cells adversely affects outcome in patients with mantle cell lymphoma independent of established risk factors. Br J Haematol. 2021;193(3):520-531.
- 37. Baran-Marszak F, Boukhiar M, Harel S, et al. Constitutive and Bcell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. Haematologica. 2010;95(11):1865.
- 38. Karvonen H, Chiron D, Niininen W, et al. Crosstalk between ROR1 and BCR pathways defines novel treatment strategies in mantle cell lymphoma. Blood Adv. 2017;1(24):2257-2268.
- 39. Yang S, Li J-Y, Xu W. Role of BAFF/BAFF-R axis in B-cell non-Hodgkin lymphoma. Crit Rev Oncol Hematol. 2014;91(2):113-122.
- 40. 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.

- 41. Novak AJ, Grote DM, Stenson M, et al. Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. Blood. 2004;104(8):2247-2253.
- 42. 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 κB pathways. Haematologica. 2012;97(8):1255-1263.
- 43. McWilliams EM, Lucas CR, Chen T, et al. Anti–BAFF-R antibody VAY-736 demonstrates promising preclinical activity in CLL and enhances effectiveness of ibrutinib. Blood Adv. 2019;3(3):447-460.
- 44. Tandler C, Schmidt M, Heitmann JS, et al. Neutralization of Bcell activating factor (BAFF) by belimumab reinforces small molecule inhibitor treatment in chronic lymphocytic leukemia. Cancers. 2020;12(10):2725.
- 45. Hill HA, Qi X, Jain P, et al. Genetic mutations and features of mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. Blood Adv. 2020;4(13):2927-2938.
- 46. Hatada EN, Do RK, Orlofsky A, et al. NF-κB1 p50 is required for BLyS attenuation of apoptosis but dispensable for processing of NF-κB2 p100 to p52 in quiescent mature B cells. J Immunol. 2003;171(2):761-768.
- 47. Paiva C, Rowland TA, Sreekantham B, et al. SYK inhibition thwarts the BAFF-B-cell receptor crosstalk and thereby antagonizes Mcl-1 in chronic lymphocytic leukemia. Haematologica. 2017;102(11):1890.
- 48. Mondragón L, Mhaidly R, De Donatis GM, et al. GAPDH overexpression in the T cell lineage promotes angioimmunoblastic T cell lymphoma through an NF-κBdependent mechanism. Cancer Cell. 2019;36(3):268-287.
- 49. Kennedy R, Klein U. Aberrant activation of NF-κB signalling in aggressive lymphoid malignancies. Cells. 2018;7(11):189.
- 50. Eluard B, Nuan-Aliman S, Faumont N, et al. The alternative RelB NF-κB subunit is a novel critical player in diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2022;139(3):384-398.

The IL32/BAFF axis supports prosurvival dialogs in the lymphoma ecosystem and is disrupted by NIK inhibition

Salomé Decombis,^{1,2,3} Antonin Papin,^{1,2,3} Céline Bellanger,^{1,2,3} Clara Sortais,^{1,2,3,4} Christelle Dousset,^{1,2,3,4} Yannick Le Bris,^{1,2,3,5} Thiphanie Riveron,^{1,2,3} Stéphanie Blandin,⁶ Philippe Hulin,⁶ Benoit Tessoulin,^{1,2,3,4} Mathieu Rouel,^{1,2,3} Steven Le Gouill,^{1,2,3,4} Agnès Moreau-Aubry,^{1,2,3} Catherine Pellat-Deceunynck 1,2,3 and David Chiron 1,2,3

¹Nantes Université, INSERM, CNRS, Université d'Angers, CRCI2NA; ²L'Héma-NexT, i-Site NexT; ³GDR3697 Micronit, CNRS; ⁴Service d'Hématologie Clinique, Unité d'Investigation Clinique, CHU; ⁵Service d'Hématologie Biologique, CHU and ⁶SFR-Santé, INSERM UMS016, CNRS UMS 3556, FED 4202, Nantes Université, CHU, Nantes, France

Correspondence: D. Chiron david.chiron@univ-nantes.fr

Received: Accepted:

August 11, 2021. February 9, 2022. Prepublished: March 10, 2022.

https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279800

©2022 Ferrata Storti Foundation Published under a CC BY-NC license 💿 🛈 S

Supplemental Files

The IL32/BAFF axis supports prosurvival dialogs in the lymphoma ecosystem

and is disrupted by NIK inhibition

Decombis et al.

Supplemental information includes supplemental Methods, 3 supplemental tables, 9 supplemental figures and legends and supplemental references

Supplemental Methods

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, HBL2 and SP53 were kindly provided by Prof. V. Ribrag (Institut Gustave Roussy Villejuif, France), Prof. M Callanan (INSERM, CHU de Dijon, France) and Prof. S. Chen-Kiang (Cornell University, NY), respectively. NTS3 cell line has been generated in our laboratory (characterized by GEP, GSE86322). Cell lines are routinely identified using a flow cytometry-based barcode as well as MHC class I sequencing¹.

Genome editing using the CRISPR-Cas9 system

To generate IL32^{-/-} MCL cells, we infected MINO and NTS3 cells with lentiviruses encoding for Cas9-mcherry (Addgene plasmid # 70182), and mCherry positive cells were sorted using FACSAria Cell sorter (Cytocell, SFR Bonamy, Nantes). Sorted cells were then infected with lentiviruses containing *GFP* and doxycycline-inducible sgRNA (Addgene plasmid # 70183) directed against IL32. The designed crRNA targeted the following sequence in *IL32* gene: 5'-GGCCGCCATGTGCTTCCCGA-3'. GFP positive cells were sorted and sgRNA expression was induced. Cells were cloned by limiting dilutions from the bulk prior characterization of IL32 knockout by DNA sequencing and protein analysis (Figure S7).

Secretome quantification

Monocytes were differentiated with CSF1 (50 ng/mL) with or without (rh)IL32β (100 ng/ml) during 3 days, supernatant was collected and soluble factors were quantified by cytokine array (Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit, R&D Systems). Pixel densities were analyzed by using the Image Lab Software (Bio-Rad). Regarding IL32, concentration was determined in MCL cell line supernatants using Human IL32 duoset Elisa (R&D systems). BAFF concentration was determined using Human BAFF / TNFSF13B Elisa kit PicoKine[™] (Boster).

Bioinformatics analysis

Gene Expression Profiling (GEP)

.CEL files were downloaded and processed in R-3.6.1 using the affy package, optical noise/background correction was performed by gcrma with standard options, and expression batches were finally normalized by quantiles using the limma package. Differential gene expression was assessed with limma package (up regulated gene: log2Fc>0.5; adjusted

p<0.05) and we used the GAGE package (KEGG pathway analysis) for gene set enrichment analysis.

Full-length RNA-seq:

Total RNA was extracted with RNeasy Mini kit (Qiagen) and guantified using a Nanodrop®ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Quality and integrity of RNA samples were assessed using the 2100 Bioanalyzer and RNA 6000 Nano LabChip kit series II (Agilent Technologies). Library construction was performed from 500ng of total RNA with SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep for Illumina Multiplexed kit (Ref 5190-6410, Agilent Technologies) according to Agilent_PrepLib_G9691-90010_juillet2015_vD protocol. Purifications were carried out with NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (Ref 744970.50, Macherey-Nagel). Fragments size of libraries was controlled on D1000 ScreenTape with 2200 TapeStation system (Agilent Technologies). Libraries with P5-P7 adaptors were specifically quantified on LightCylcer ® 480 Instrument II (Roche Life Science) and normalized with DNA Standards (1-6) (Ref KK4903, KAPABIOSYSTEMS -CliniSciences). Each library was pooled and prepared according to Denaturing and diluting libraries protocol for the Hiseq and GAIIx, part#15050107 v02 (Illumina) for cluster generation on cBotTM system. Paired-end sequencing (2x100 cycles) was carried out with 4 samples by lane on HiSeq® 2500 system (Illumina) in TruSeq v3 chemistry according to the instructions of HiSeq® 2500 System Guide, part#15035786 v01 (Illumina).

After demultiplexing and quality control with fastQC_0.11.2 (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/), illumina adapter were trimmed with cutadapt-1.2.1² and reads with Phred quality score below 30 were filtered with prinseq-lite-0.20.3³. Reads were aligned against human hg19 reference genome with tophat2.0.10⁴, reads count and differential analysis was realized with Gfold⁵.

Relative abundance of 9 known transcripts of IL32 was performed with Pennseq⁶ using refseq annotation downloaded from UCSC.

3'seq-RNA Profiling

3'seq-RNA Profiling protocol is performed according to Soumillon et al.⁷ The mRNA poly(A) tails are tagged with universal adapters, well-specific barcodes and unique molecular identifiers (UMIs) during template-switching reverse transcriptase. Barcoded cDNAs from multiple samples are then pooled, amplified and tagmented using a transposon-fragmentation approach, which enriches for 3'ends of cDNA. A library of 350–800 bp length is run on an Illumina NovaSeq 6000 using NovaSeq 6000 SP Reagent Kit 100 cycles (ref #20027464).

Raw fastq pairs used for analysis matched the following criteria: the 16 bases of the first read correspond to 6 bases for a designed well-specific barcode and 10 bases for a unique molecular identifier (UMI). The second read (58 bases) corresponds to the captured poly(A) RNAs sequence. We perform demultiplexing of these fastq pairs according to the samplesheet to generate one single-end fastq for all samples. These fastq files are then aligned with bwa to the reference mRNA sequences and the mitochondrial genomic sequence, both available from the UCSC download site. DGE profiles are generated by parsing the alignment files (.bam) and counting for each sample the number of unique UMIs associated with each RefSeg genes. Reads aligned on multiple genes, containing more than one mismatch with the reference sequence or reads containing a polyA pattern are discarded. Finally, a matrix containing the expression of all genes on all samples is produced. The expression values, corresponding to the absolute abundance of mRNAs in all samples, is then ready for further gene expression analysis. DESeg2 is used to normalize expression with the DESeg⁸. Normalized counts are transformed with vst (variance stabilized transformation) function from DESeq library. Batch effects may be corrected with the limma library function "removeBatchEffect".

IL32 locus-specific methylation analysis

Genomic DNA was extracted with QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen) and treated with bisulfite (Active-Motif). The converted DNA was amplified by specific nested PCR for promoter and CpG island of *IL32* (Table S3). The cloning step was realized with StrataClone PCR Cloning Kit (Stratagene). Extracted DNA from the selected colonies (Miniprep Plasmid DNA purification, Macherey Nagel) was sequenced and analyzed (n=8 clones per sample).

Immunohistochemistry (IHC)

Classic IHC

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections of 3 lymph nodes and 1 spleen from 4 MCL patients were obtained from Pathological Anatomy Department, CHU, Nantes, France. For IHC staining, the sections were subjected to pretreatment involving antigen retrieval by heating in EDTA buffer. Samples were then incubated with an anti-IL32 antibody and with the Impath DAB OB Sens Detection kit (A. Menarini Diagnostics, France) for revelation. The experiment was realized in the automated Impath36 (A. Menarini Diagnostics, France). Histopathology slides were scanned with a Nanozoomer 2.0 HT (Hamamatsu Photonics K. K., Japan). Negative controls for IHC were included in each run, and consisted in replacing the primary antibody with Rabbit Primary Antibody Isotype Control (2 µg/mL IgG) (GBI Labs, USA).

Other methods

Viability assays (Annexin-V staining) as well as real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR, control gene RPL37A) and immunoblot protocols have been previously described ⁹. 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 Graph-Pad Prism and R statistical softwares and all tests were considered statistically significant at p < 0.05.

Supplemental Tables

MCL#	Age	Status	%CD19+/CD5+	Subtype at D	SOX11	TP53	Constitutive IL32
1	74	D	57	LNN	-	wt	-
2	22	R	75	Conventional	+	wt	-
2_PE	69	R	75	Conventional	+	wt	+
3	73	D	80	Conventional	+	wt	-
4	66	D	80	Conventional	+	wt	+
5	73	R	67	Blastoid	+	abn	+
6	65	D	43	LNN	-	wt	-
7	80	R	77	Conventional	+	wt	-
8	81	R	66	LNN	-	abn	-
9	73	R	70	Conventional	ND	wt	ND
10	60	D	87	LNN	-	wt	-
11	74	D	87	Conventional	+	wt	-
12	82	D	92	Conventional	+	wt	-
13	78	R	94	LNN	-	wt	-
14	81	R	22	Conventional	+	wt	+
15	75	D	88	Blastoid	+	abn	-
16	71	R	90	Blastoid	+	wt	-
17	80	R	78	Conventional	+	wt	+
18	70	R	79	Conventional	ND	abn	ND
19	60	R	77	Conventional	+	wt	-
20	60	D	50	Conventional	ND	wt	ND
21	68	D	60	LNN	-	abn	-
22	57	D	68	Conventional	+	wt	-
23	53	D	35	LNN	-	ND	-
Lines					SOX11	TP53	Constitutive IL32
HBL2					+	abn	-
Jeko					+	abn	+
GRANTA					+	wt	+
Z138					+	wt	-
UPN1					+	abn	-
REC1					+	abn	-
MINO					+	abn	+
SP53					+	wt	-
NTS3					+	wt	-
MAVER					+	abn	-

Supplemental Table S1

Patient samples and cell lines information. D, Diagnosis; R, Relapse; LNN, Leukemic Non Nodal. wt: wild type, abn: abnormal.

All samples came from peripheral blood excepted 2_PE form Pleural Effusion SOX11 and IL32 expression were determined by 3'seq-RNA Profiling of peripheral blood samples. TP53 status was determined by targeted sequencing of *TP53* and/or in vitro response to Nulin3a.

Primary antibodies for Immunoblot					
Specificity	Clone	Source	Reference		
Anti Actin	C4	Merck Millipore	MAB1501		
Anti GAPDH	G-9	Santa Cruz	sc-365062		
Anti IL-32	Polyclonal	Atlas Antibodies	HPA029397		
Anti NF-KB p52-p100	Monoclonal	Merck	05-361		
Anti NF-KB Anti p50-p105	Polyclonal	Santa cruz	sc-114		
Anti Stat 3 (P) Tyr-705	D3A7	Cell signaling	9145		
Anti Stat 3	Monoclonal	Biosciences	610190		
Anti ΙκΒα (Ρ) Ser 32/34	5A5	Cell signaling	9246S		
Anti ΙκΒα	Polyclonal	Cell signaling	9242S		
Anti MCL1	22	Santa Cruz	sc-12756		
Anti A1	D1A1C	Cell signaling	#14093S		
Anti BclxL	D3	Santa Cruz	sc271121		

Antibodies and reagents for	flow-cytometry	Clone	Source	
Phenotype	anti-CD14-PE	RMO52	Beckman coulter	
	anti-CD163-APC	REA812	BD Pharmingen	
	Anti-BAFFR-PE	8A7	eBiosciences,	
	Anti-BAFFR-PE	11C1	BD Pharmingen	
Viability	Annexin V-APC		Beckman coulter	

Antibodies and reage	ents for IHC	Clone	Source
Antibodies	IL32	Polyclonal	Atlas Antibodies
	Cyclin D1	SP4	Thermo Scientific
	CD3	CD3 Polyclonal [
	CD68	PG-M1	Dako
Retrieval solutions	Envision FLEX Target		Dako
	Retrieval solution		
	High pH		
	TR1 Retrieval		A. Menarini Diagnostics
	solution		

TaqMan ge	Source	
IL1a	Hs00174092_m1	Applied Biosystems
IL1b	Hs01555410_m1	
IL6	Hs00174131_m1	
IL24	Hs01114274_m1	
IL32	Hs00992441_m1	
BAFF	Hs04234384_m1	
CXCL8	Hs00174103_m1	
RPL37A	Hs01102345_m1	

Reagents and a	Source		
Drugs	NIK SMI1	MedChemExpress	
	Ibrutinib, BMS-345541	SelleckChem	
Neutralizing antibodies	Neutralizing antibodies Anti-BAFFR, Anti-BAFF		
Cytokines	IL1a, IL1b, IL10, IFNg, April, BAFF, CSF1,	Peprotech	
	CSF2		
	IL6, IL18, IL24, IL32b, TNFa,Wnt5a	R&D Systems	
	IGF1	Sigma-Aldrich	
	IL15	Serotec	

Supplemental Table S2: Antibodies and reagents

Specific nested PCR for CpG island (CPGI): PCR1 F1-R1 and PCR2 F2-R2				
Primer name	Sequence			
IL32CPGI-F1	GAGGATTTTTTGGGGAGGAGGGTGT			
IL32CPGI-R1	AACACCAAAACCCACAAAACCTTA			
IL32CPGI-F2	TGAGATATTTTTTTTTTTTTATATT			
IL32CPGI-R2	TACTCTTAAACCCACCCAACTAAAC			
Specific nested PCR for promoter: PCR1 F3-R3 and PCR2 F2-R3				
Primer name Sequence				
IL32promoter-F3	AGGTTTAGTTAGGTTGGAGGGTTAG			
IL32promoter-R3	CAAACAAAAACAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA			
IL32promoter-F2 GGGGAGTTTTAAGATTGTTGAGATT				

Supplemental Table S3

IL-32 promoter and CpG island nested PCR primers for methylation analysis

A	7
	•

Gene_Name	Regulation	log2FC	Top Prediction	score (%)	source
IGFBP3	Up in LN	7.55	Extracellular region	91	PSORT
IL32	Up in LN	6.53	Extracellular region	44	PSORT
COL6A3	Up in LN	6.44	Extracellular region	50	PSORT
PTGDS	Up in LN	6.43	Extracellular region	78	PSORT
RARRES2	Up in LN	6.43	Extracellular region	97	PSORT
FN1	Up in LN	6.42	Extracellular region	53	PSORT
APOC1	Up in LN	6.42	Extracellular region	100	PSORT
CCL21	Up in LN	6.41	Extracellular region	100	Yloc
CXCL9	Up in LN	6.36	Extracellular region	100	Yloc
CLU	Up in LN	6.24	Plasma membrane	47	PSORT
C15	Up in LN	6.07	Extracellular region	75	PSORT
PRRX1	Up in LN	5.80	Nucleus	100	PSORT
PLA2G2D	Up in LN	5.77	Extracellular region	97	PSORT
MMP9	Up in LN	5.59	Extracellular region	59	PSORT
APOE	Up in LN	5.55	Extracellular region	78	PSORT
VWF	Up in LN	5.54	Extracellular region	81	PSORT
C3	Up in LN	5.53	Extracellular region	91	Yloc
CPE	Up in LN	5.16	Extracellular region	99	Yloc
ADAMDEC1	Up in LN	5.13	Extracellular region	78	PSORT
C10orf10	Up in LN	5.06	Mitochondrion	47	PSORT
LTF	Up in LN	5.03	Extracellular region	75	PSORT
C1QA	Up in LN	5.03	Extracellular region	63	PSORT





D



Supp. Fig. S1_Functional annotations and signature enrichment in vivo and ex vivo



Supp. Fig. S2 $_$ IL32 is expressed and induced by CD40L in MCL cell lines



Supp. Fig. S3_Alternative but not classical NFkB is involved in CD40-induced IL32 expression







Supp. Fig. S4_Tumor-specific expression of IL32 is due to epigenetic regulations



Supp. Fig. S5_IL32 is coregulated with genes expressed by monocytes and T cells in MCL LN



Supp. Fig. S6_ Secretome of IL32-stimulated monocytes and macrophages


Supp. Fig. S7_ Generation of IL32KO Mino and NTS3 cells through Crisp/Cas9 technology



Supp. Fig. S8_ BAFF-specific MCL cell rescue is dependent on alternative NFkB pathway



Supp. Fig. S9_ Individual stainings and controls of the multiplex immunohistochemestry experiment

Supplemental Figure Legends

Figure S1. Functional annotations and signature enrichment *in vivo* and *ex vivo*. (A) Top significantly modulated genes in LN compared with PB (GEP, log2Fc > 5; n= 22) and their localization by using the Compartments resources¹⁰. (B) KEGG pathway enrichment analysis of the *in vivo* LN upregulated gene set as represented in Figure 1B (n=4584 genes). The x-axis represents the normalized enrichment score (NES) as described by Joly et al. ¹¹. (C) Enrichment plots of the NFkB, NIK and BCR signatures (as described by Saba and colleagues¹²) or LN signature (100 most strongly upregulated genes in LN compared to PB MCL *in vivo*) analyzed using GSEA and reflecting the relevance of our *ex vivo* culture model previously described⁹. (D) KEGG pathway enrichment analysis of the "Tumor-specific" (n=1269 genes) and the "Shared with NBC" (n=1948 genes) gene sets as define in Figure 1B. The x-axis represents the normalized enrichment score (NES).

Figure S2. IL32 is expressed and induced by CD40L in MCL cell lines. (A) Concentration of IL32 protein determined by ELISA in the supernatant of NTS3, Z138, SP53, MINO and GRANTA cells. **(B)** *IL32* isoforms prediction by RNA-seq in Mino cells or primary NBC (n=2) and MCL cells (n=4) cultured or not on CD40L expressing cells for 7 days. **(C-D)** IL32 expression in MINO, NTS3 and REC-1 cells cultured on CD40L-expressing cells with or without growth factors (IL10, BAFF, IGF1, IL6) during 24h measured using RT-qPCR **(C)** or immunoblot **(D)**.

Figure S3. Alternative but not classical NFkB is involved in CD40L-induced IL32 expression. (A) Immunoblotting of indicated proteins in MCL cell lines in the presence or absence of the IKK inhibitor BMS-345541 (IKK-i, 5 μ M, 6h) in Mino cells or NTS3 cells cultured on CD40L expressing cells. (B) Immunoblotting of indicated proteins in MINO cells treated with siRNA against *NFKB1* for 24 to 48h. (C) p52 protein expression in primary MCL cells (MCL14 and MCL15) from PB or LN was assessed.

Figure S4. Tumor-specific expression of IL32 is due to epigenetic regulations. (A) RTqPCR analysis of *IL32* gene expression in Maver-1, UPN1 and SP53 cells treated or not with Decitabine (5'Aza) during 48h. **(B)** Left panel: Detailed locus specific bisulfite sequencing of *IL32* gene (promoter and CpG island) for indicated cells as described in the Methods. Black dots represent methylated CpG island. Mann-Whitney test. *p < 0.0261. Right panel: Locus specific bisulfite sequencing of promoter and CpG islands (CGI) of *IL32* gene for IL32 negative MCL cells (MAVER-1, Z138 and MCL cells (MCL12)) and IL32 positive cells (GRANTA, MINO and MCL cells (MCL5)). For all samples, PCR products were cloned and 8 were sequenced and analyzed as detailed in the Figure S4. Mann-Whitney test. ***p < 0.0002. **(C)** Locus specific bisulfite sequencing of the promoter of *IL32* gene in primary CD19⁺ CD5⁺ NBC (n=1) or MCL (n=6) cells as in panel D. Mann-Whitney test. ****p < 0.0001. (**D**) Integration of the percentage of methylation analyzed by locus specific bisulfite sequencing of the promoter of *IL32* gene and the quantification of p52 and IL32 protein expression (immunoblotting) in NBC and MCL cells at D0 and after culture on CD40L-expressing cells for 7 days.

Figure S5. IL32 is coregulated with genes expressed by monocytes and T cells in MCL LN. (A) KEGG pathway enrichment analysis for the genes co-regulated with *IL32* gene in MCL cells. (B) IL32 top co-regulated genes in LN versus PB MCL cells were defined with the limma package. Genes related to macrophages (red circles) or T-cells (blue circles) functions are highlighted. (C) Comparison of the induced genes in both macrophages and monocytes treated with (rh)IL32 β , as described in Figure 5 (D) Common KEGG pathway enrichment found in both macrophages and monocytes treated with (rh)IL32 β , as described enrichment score (NES).

Figure S6. Secretome of IL32-stimulated monocytes and macrophages. (A) RT-qPCR analysis of *IL1A*, *IL1B*, *IL6*, *IL24*, *CXCL8*, *IL1B*, *IL32*, *BAFF* in monocytes or monocytes-derived macrophages cultured with (rh)IL32 β for 24h or 48h respectively. Mann-Whitney test. **p < 0.005. (B) A pre-defined panel of soluble factors was measured by cytokine array (Proteome ProfilerTM, Human Cytokine Array, R&D Systems®) in the supernatant of monocytes-derived macrophages stimulated with CSF1 with or without (rh)IL32 β for 3 days.

Figure S7. Generation of IL32^{-/-} **Mino and NTS3 cells through Crisp/Cas9 technology.** (**A**) DNA sequencing of wild type (Cnt, upper panel) and IL32^{-/-} (Cr#1, lower panel) Mino cells. Deletions are predicted for both alleles. Blue sequence represents the target sequence; red sequence represents the Pam sequence. (**B**) Immunoblotting of IL32 protein in wild type (Cnt) and IL32^{-/-} MINO (Clone Cr#1) and NTS3 (Clones Cr#1 and Cr#2). (**C**) RT-qPCR analysis of *IL1A, IL1B, IL6, IL24, CXCL8, IL32 and BAFF* genes in monocytes cultured during 24h with wild type (-) or IL32^{-/-} (Cr#1) CD40L-stimulated NTS3 supernatant.

Figure S8. BAFF-specific MCL cell rescue is dependent on alternative NFkB pathway. (A) Flow cytometry analysis of BAFFR expression in MCL cell lines (n=7) and in primary MCL cells from peripheral blood (PB, n=42) and bone marrow (BM, n=9). (B) Volcano-plot representation of whole transcriptome analysis (publicly available Affimetrix U133, see Methods) from MCL lymph nodes samples (LN, n=107) compared to MCL peripheral blood samples (PB, n=77) shown in figure 1A annotated for TNFSF13B and IL32. (C) Immunoblotting of NFkB pathway proteins in SP53, NTS3 and primary MCL cells (MCL13) cultured with BAFF (50 ng/mL) for 24h. (D) Percentage of cell rescue dependent on BAFF in primary MCL (n=4) cultured with or without NIK inhibitor (NIK-i, 10 μ M) for 7 days. Paired t test. *p < 0.05. (**E**) p52 protein expression in SP53 cells cultured with M ϕ -32 supernatant (s_M ϕ -32) for 16h with or without anti-BAFF neutralizing antibody (10 μ g/mL) assessed by immunoblotting. (**F**) BclxL, MCL1, BCL2 and BCL2A1 gene expression analyzed by RT-qPCR in SP53 cells stimulated with or without BAFF (50 ng/ml) or CD40L during 6h. (**G**) Immunoblotting of alternative NFkB (p100 and p52) pathway and BclxL, MCL1 and A1 protein expression in SP53 and NTS3 cells cultured with or without BAFF (50 ng/ml) during 6 or 24h. (**H**) Immunoblotting of alternative NFkB (p100 and p52) pathway and BclxL, MCL1 and BAFF (50 ng/ml) during 6 or 24h and SP53 as a positive control (T+).

Figure S9. Individual stainings and controls on the Multiplex Immunohistochemistry experiment (A) Multiplex Immunohistochemistry on lymph nodes sections from 2 MCL patients (MCL_LN#2/3) for staining of Cyclin D1 (opal 570 ; white), and IL32 (opal 650 ; red) or Cyclin D1 (opal 570 ; white) and Rabbit Primary Antibody Isotype Control (opal 650 ; red). Scale bars, 50 μm. (B) Individual staining of Multiplex Immunohistochemistry on lymph nodes sections from 2 MCL patients: MCL_LN#2 (top panel, Scale bars, 50 μm) and MCL_LN#3 (bottom panel, Scale bar, 100 μm) for Cyclin D1 (opal 570 ; white), CD3 (opal 690 ; green), CD68 (opal 520 ; magenta), IL32 (opal 650 ; red). Nucleus is stained with Dapi.

Supplemental References

1. 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.

2. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*. 2011;17(1):10-12.

3. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 2011;27(6):863-864.

4. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome biology*. 2013;14(4):1-13.

5. Feng J, Meyer CA, Wang Q, Liu JS, Shirley Liu X, Zhang Y. GFOLD: a generalized fold change for ranking differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*. 2012;28(21):2782-2788.

6. Hu Y, Liu Y, Mao X, et al. PennSeq: accurate isoform-specific gene expression quantification in RNA-Seq by modeling non-uniform read distribution. *Nucleic acids research*. 2014;42(3):e20-e20.

7. Magali S, Davide C, Stefan S, Alexander O, Tarjei S. Characterization of directed differentiation by high-throughput single-cell RNA-Seq. *BioRxiv*. 2014.

8. Love M, Anders S, Huber W. DESeq2 vignette. *Genome Biol doi*. 2016;110.

9. Chiron D, Bellanger C, Papin A, et al. Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016;128(24):2808-2818.

10. Binder JX, Pletscher-Frankild S, Tsafou K, et al. COMPARTMENTS: unification and visualization of protein subcellular localization evidence. *Database*. 2014;2014.

11. Joly JH, Lowry WE, Graham NA. Differential Gene Set Enrichment Analysis: A statistical approach to quantify the relative enrichment of two gene sets. *Bioinformatics*. 2020.

12. Saba NS, Liu D, Herman SE, et al. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF-κB activation in mantle cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016;128(1):82-92.

I.2) Etude de l'architecture du microenvironnement immunitaire du LCM à l'aide d'une technique d'immunohistochimie multiplex

Nous avons initié l'étude de l'architecture du microenvironnement immunitaire ganglionnaire du LCM et des interactions au sein de la niche tumorale grâce à la technique d'immunohistochimie multiplex que nous développons en collaboration avec la plateforme Micropicell (SFR Bonamy, Nantes). Cette technique permet de mettre en évidence plusieurs marqueurs sur une même coupe de ganglion inclus en paraffine (FFPE) grâce à l'utilisation d'opals, molécules fluorescentes, et une dissociation spectrale réalisée à partir d'un microscope confocal (Nikon A1 RSi). Le matériel biologique (coupes FFPE de ganglions de patients atteints de LCM) a été obtenu auprès du laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques de Nantes (Dr Anne Moreau). Nous avons recueilli des lames de ganglions issues de 36 patients atteints de LCM : 19 cas classiques et 17 cas agressifs de morphologie blastoïde.

J'avais pour objectif de caractériser les infiltrats myéloïdes (CD68, CD163) et lymphoïdes (CD3, CD4, CD8, FOXP3) au contact des cellules de LCM (Cycline D1, Ki67) et de déterminer les interactions potentiellement ciblables *in vivo* au sein de la structure myéloïde (CD47/SIRPα) et lymphoïde (PD1/PDL1). Cette technologie n'étant pas développée dans notre équipe, j'ai tout d'abord réalisé une mise au point de tous les anticorps en immunohistochimie classique (concentration des réactifs et démasquages permettant une révélation optimale de chaque marqueur).

J'ai ensuite élaboré un premier panel en immunohistochimie multiplex afin d'étudier la faisabilité du projet. Ce panel « test » est composé des 4 marqueurs Cycline D1 (marqueur des cellules de LCM), KI67 (marqueur de prolifération), CD3 (marqueur des lymphocytes T) et CD68 (marqueur des macrophages). J'ai réalisé ce panel sur des coupes de ganglions provenant d'un cas de LCM classique et un cas blastoïde.

Dans un premier temps, des étapes de déparaffinage et de démasquage des sites antigéniques, à l'aide d'une solution d'EDTA ou de Citrate (en fonction des anticorps utilisés), permettent de préparer l'échantillon pour le marquage. Des étapes de neutralisation des péroxydases endogènes, une incubation avec l'anticorps primaire, un lavage, une incubation avec un polymère (HRP 2-Step) couplé à la HRP sont ensuite réalisées. Par la suite, les molécules de tyramides couplées aux opals ajoutés sur la coupe vont être catalysées par la HRP fixée au polymère. Les radicaux libres de tyramides vont former des liaisons covalentes avec les résidus de tyrosines présentes autour de l'épitope. Un stripping est réalisé afin de libérer le complexe anticorps primaire-polymère de l'épitope tout en conservant la fixation des

opals à proximité des épitopes grâce à la liaison tyramide-tyrosine. Après un lavage, un nouveau démasquage ainsi que les étapes qui suivent vont permettre de réaliser plusieurs marquages successifs (Figure 24). A la fin du marquage, l'échantillon est incubé en présence de DAPI afin de marquer les noyaux des cellules. Ces différentes étapes sont réalisées dans l'automate Impath36 (Menarini Diagnosis).



Figure 24 : Différentes étapes de la technique d'immunohistochimie multiplex. Après des étapes de déparaffinage, démasquage et de neutralisation des péroxydases endogènes, une incubation avec l'anticorps primaire puis avec un polymère (HRP 2-Step) couplé à la HRP sont réalisées. L'échantillon est ensuite incubé avec un tampon contenant l'opal couplé à des molécules de tyramides qui vont être catalysées par la HRP fixée au polymère. Les radicaux libres de tyramides vont former des liaisons covalentes avec les résidus de tyrosines présentes à proximité de l'épitope. Un stripping va ensuite être réalisé afin de libérer le complexe anticorps primaire-polymère de l'épitope et de réaliser plusieurs marquages successifs. D'après **PHENOptics : Quantitative Pathology Solutions, Perkin Elmer**.

Pour chaque cas, nous avons fait l'acquisition de deux régions d'intérêt (ROI). L'acquisition des images se fait à l'aide du microscope confocal (Nikon A1 RSi) contenant un module spectral. Les opals utilisés présentent différents spectres d'émission dans le vert (520 nm et 540 nm), dans le rouge (570nm et 620 nm) et dans le rouge lointain (690 nm). La mise au point de chaque anticorps en immunohistochimie classique nous a permis d'évaluer l'expression et l'intensité de chaque marqueur. Afin de réaliser les multimarquages, nous avons attribué des opals avec des spectres d'émission proches aux marqueurs dont l'expression est équivalente en immunohistochimie classique (opals 520-540 ou opals 570-620). Lorsque deux opals présentent un spectre d'émission proche, une dissociation spectrale est réalisée dans le but d'obtenir le signal correspondant à chaque marqueur unique. Afin d'analyser les images obtenues, nous avons utilisé un script établi en collaboration avec la plateforme Micropicell ainsi que le logiciel Fiji et le plugin StarDist. Des seuillages ont été

attribués à chaque canal correspondant à chaque marqueur dans le but de détecter les pixels associés à chaque marquage. Cette méthode d'analyse nous a permis de quantifier et de localiser chaque marqueur.

Cette première analyse m'a permis de valider la faisabilité de la technique d'IHC multiplex sur deux tissus ganglionnaires de LCM. Ainsi, j'ai observé que les ganglions de patients atteints de LCM sont des tissus hétérogènes et enrichis en cellules immunitaires. Une majorité de cellules tumorales (LCM classique : 61% (ROI 1), 38% (ROI 2) ; LCM blastoïde : 40% (ROI 1), 72% (ROI 2)) et de lymphocytes T (LCM classique : 34% (ROI 1), 53% (ROI 2); LCM blastoïde : 52% (ROI 1), 19% (ROI 2)) sont retrouvés au sein de la niche ganglionnaire des deux patients atteints de LCM classique et blastoïde. Nous avons observé une quantité moindre de macrophages (LCM classique : 5% (ROI 1), 9% (ROI 2) ; LCM blastoïde : 8% (ROI 1), 9% (ROI2)) dans les ROI d'intérêt. Les différentes ROI présentent des niveaux d'infiltration lymphocytaires différents (34 et 53% pour le cas classique, 52 et 19% pour le cas blastoïde). Cette analyse préliminaire montre également une proximité cellulaire entre les lymphocytes T et les cellules tumorales témoignant d'une forte interaction dans la niche entre ces deux types cellulaires (cellules jaunes de l'analyse = proximité entre les lymphocytes T et les cellules de LCM). Nos analyses nous ont également permis de mettre en évidence que les zones proliférantes sont hétérogènes en fonction des ROI. En effet, nous avons observé des pourcentages de cellules cycline D1⁺ en prolifération de 5 à 12% pour le cas classique et de 11 à 33% pour le cas blastoïde (Figure 25).

A) Conventional MCL



ROI 1

ROI 2





B) Blastoid MCL



Figure 25 : Microenvironnement lymphoïde et myéloïde du LCM en immunohistochimie multiplex. Marquage cycline D1, KI67, CD3, CD68 et Dapi sur une coupe de ganglion d'un cas de LCM classique (**A**) et blastoïde (**B**). Le merge correspond à la superposition de tous les marqueurs. Pour chaque cas, 2 ROI ont été sélectionnées. L'image du haut correspond à l'acquisition au microscope confocal spectral et l'image du bas représente l'analyse effectuée à l'aide du script et du logiciel Fiji et plugin Stardist. Les quantifications de chaque type cellulaire ainsi que des cellules KI67⁺ ont été réalisées à l'aide du logiciel d'analyse. Les cellules jaunes de l'analyse représentent les cellules cycline D1⁺ à proximité des cellules CD3⁺. Barre d'échelle : 50 μm.

Nos études fonctionnelles sur l'interaction CD40/CD40L (partie I.1 des résultats) ainsi que des études récentes ont confirmé l'importance des lymphocytes T dans l'expansion de certaines hémopathies B. En effet, des équipes ont mis en évidence une prolifération des cellules de Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) au contact des lymphocytes T CD4⁺ et ont associé le faible ratio CD4/CD8 à un mauvais pronostic et à une forte prolifération des cellules de LCM (Vaca et al., 2022 ; Zhang et al., 2016 ; Nygren et al., 2014). Nous avons donc entrepris une étude plus précise de l'enrichissement lymphoïde (lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et Treg FOXP3⁺). Pour cela, j'ai mis au point un panel composé des marqueurs Cycline D1, CD4, CD8, KI67 et FOXP3. Ce panel a été réalisé pour un cas de LCM classique et un cas blastoïde et nous avons fait l'acquisition d'une ROI pour chaque cas.

Nous avons montré l'existence de clusters de cellules tumorales (39%) infiltrés par des lymphocytes T CD4⁺ (53%), CD8⁺ (8%), Tregs CD4⁺ FOXP3⁺ (10%) et Tregs CD8⁺ FOXP3⁺ (8%) dans la ROI définie pour le patient atteint d'un LCM classique. Ce résultat confirme les fortes interactions entre les cellules de LCM et les différentes composantes lymphocytaires T. Malgré ces interactions, nous n'avons pas observé une forte prolifération des cellules tumorales cycline D1⁺ (6%) (**Figure 26A**). Le cas blastoïde présente un profil plus homogène. En effet, la distribution spatiale des cellules tumorales cycline D1⁺ (52%) et des lymphocytes T CD4⁺ (21%), CD8⁺ (27%), Tregs CD4⁺ FOXP3⁺ (15%) et Tregs CD8⁺ FOXP3⁺ (5%) est homogène. Ce cas présente une plus grande quantité de lymphocytes T CD8⁺ que le cas classique (LCM blastoïde : 27% ; LCM classique : 8%) dans la ROI. Nous avons mis en évidence une prolifération des cellules tumorales cycline D1⁺ (35%) (**Figure 26B**).

Ces résultats préliminaires nécessitent d'être confirmés sur d'autres cas de LCM classiques et blastoïdes et de comparer plusieurs ROI afin d'avoir des indications sur la prolifération des cellules tumorales au contact des lymphocytes T en fonction de la localisation dans les ganglions.



Figure 26 : Microenvironnement lymphoïde du LCM en immunohistochimie multiplex. Marquage cycline D1, KI67, CD4, CD8, FOXP3 et Dapi sur un cas de LCM classique **(A)** et un cas blastoïde **(B)**. Le merge correspond à la superposition de tous les marqueurs. L'image du haut correspond à l'acquisition au microscope confocal spectral et l'image du bas représente l'analyse effectuée à l'aide du script et du logiciel Fiji et plugin Stardist. Les quantifications de

chaque type cellulaire ainsi que des cellules KI67⁺ et FOXP3⁺ ont été réalisées à l'aide du logiciel d'analyse. Barre d'échelle : 50µm.

Parallèlement à ces mises au point, une étude menée à Nantes par le Dr Yannick Le Bris a mis en évidence la présence d'un plus grand nombre de lymphocytes T CD8⁺ chez des cas de LCM plus agressifs associé à une plus forte prolifération dans des ganglions dissociés de patients grâce à une technique de RT-MLPA (Reverse Transcriptase Multiplex Ligation-dependant probe Amplification) **(Figure 27) (Le Bris et al., 2022)**.



Figure 27 : Expression des marqueurs CD3 et CD8 dans des ganglions tumoraux de patients atteints de LCM. Comparaison de l'expression des marqueurs CD3 et CD8 dans des ganglions tumoraux de patients atteints de LCM de morphologie agressive et non agressive associée à l'index de prolifération en RT-MLPA. D'après Le Bris et al., 2022.

Afin de confirmer ces résultats au niveau protéique dans des coupes de ganglions de LCM, j'ai tout d'abord réalisé des simples marquages en immunohistochimie classique afin de mettre en évidence les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ chez 5 patients avec un sous-type classique et 5 patients blastoïdes faisant partie de la cohorte précédemment analysée en RT-MLPA. Pour chaque patient, des zones spécifiques à analyser ont été déterminées par le Dr Anne Moreau (Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques de Nantes) correspondant à des zones tumorales infiltrées par les lymphocytes T. Pour chaque cas, 1 à 6 zones ont été sélectionnées pour une analyse (la **Figure 28A** représente les 6 zones sélectionnées ainsi que l'analyse des populations de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ pour un cas de LCM classique). La quantification des simples marquages a été réalisée à l'aide du logiciel QuPath.

Grâce à la quantification des zones spécifiques au sein des 10 cas de LCM, nous avons observé un pourcentage de lymphocytes T CD8⁺ significativement plus élevé dans les cas

blastoïdes plus agressifs en comparaison aux cas classiques (pourcentage moyen de lymphocytes T CD8⁺ : 22,57% versus 6,33%, p=0.0235, **Figure 28B**). Nous n'avons pas observé de différences significatives concernant les lymphocytes T CD4⁺ (pourcentage moyen de lymphocytes T CD4⁺ : 14,38% pour les cas classiques et 9,77% pour les cas blastoïdes). Nous avons également mis en évidence un ratio CD4/CD8 significativement plus faible dans les cas blastoïdes en comparaison aux cas classiques corrélant ainsi avec l'agressivité de la pathologie (ratio moyen : 0,51 versus 2,64, p=0.0159, **Figure 28C**).



Figure 28 : Expression des marqueurs CD4 et CD8 dans des ganglions tumoraux de patients atteints de LCM. (A) Analyse en immunohistochimie classique de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 dans un ganglion de patients atteints de LCM classique et quantification de 6 zones à l'aide du logiciel QuPath. (B) Pourcentage de cellules CD4⁺ et CD8⁺ dans des ganglions tumoraux de patients atteints de LCM de morphologie non agressive (LCM classique, n=5) et agressive (LCM blastoïde, n=5) en immunohistochimie. Pour chaque patient, 1 à 6 zones tumorales infiltrées par des lymphocytes T ont été quantifiées. Test de Mann-Whitney, *, p<0.05 (p=0.0235). (C) Ratio CD4/CD8 dans des ganglions tumoraux de patients atteints de LCM classique, n=5) et agressive (LCM blastoïde, n=5) en immunohistochimie. Pour chaque patients atteints de LCM de morphologie non agressive (LCM blastoïde, n=5) et agressive TCD4⁺ et CD8⁺ quantifiés dans toutes les zones a permis d'établir le ratio CD4/CD8. Test de Mann-Whitney, *, p<0.05 (p=0.0159).

L'analyse quantitative de ces marquages CD4 et CD8 dans les cas classiques et blastoïdes, réalisée à l'aide du logiciel QuPath, a donc confirmé les résultats de RT-MLPA. Ces résultats, représentant seulement 10 cas, restent préliminaires et doivent être confirmés sur un plus grand nombre de cas. Ce projet est toujours en cours et sera poursuivi au sein de l'équipe. Parmi les perspectives à moyen terme, nous avons pour projet de continuer l'étude quantitative des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans les cas classiques et blastoïdes afin de confirmer la tendance observée. A travers l'utilisation du panel lymphoïde (Cycline D1, CD4, CD8, FOXP3, KI67) sur les mêmes cas, nous souhaitons mettre en évidence la localisation spatiale des différentes populations lymphocytaires et leurs interactions avec les cellules tumorales au sein de l'écosystème ganglionnaire. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des ICP tels que l'axe PD1/PD-L1 et de TIGIT dans le LCM (Harrington et al., 2019 ; Zhang et al., 2016 ; Xu-Monette et al., 2018 ; Jiang et al., 2022). Nous avons pour projet d'étudier le rôle de ces ICP dans la niche tumorale afin de documenter la nature des lymphocytes T CD8⁺ infiltrants.

En plus de l'initiation de ce projet de caractérisation globale du microenvironnement immunitaire *in situ* dans les ganglions de LCM, j'ai pu valoriser la mise au point de cette technologie dans le projet concernant l'étude de l'IL-32 au sein de la niche du LCM discuté précédemment. Nous avons dans un premier temps mis en évidence la présence d'IL-32 dans des coupes de ganglions (n=3) et de rate (n=1) de patients en immunohistochimie classique. Grâce à la technologie d'immunohistochimie multiplex, j'ai réalisé un panel afin de détecter les cellules tumorales (Cycline D1), les lymphocytes T (CD3), les macrophages (CD68) et l'IL-32. Nous avons mis en évidence que l'expression de l'IL-32 est enrichie *in situ* dans les zones tumorales infiltrées par des lymphocytes T (ROI#1 et ROI#2 de l'échantillon LN#2, ROI#1 de l'échantillon LN#3), par rapport aux zones exclusives à la tumeur (ROI#2 de l'échantillon LN#3). Ces résultats nous ont permis de confirmer que l'IL-32 est exprimée *in situ* par les cellules de LCM à proximité des lymphocytes T **(Figure 29)**.



100 µM

Figure 29 : Expression de l'IL-32 in situ dans les ganglions lymphatiques de patients atteints de LCM. (A) Expression de l'IL-32 en immunohistochimie sur un échantillon de rate (SPL) et trois sections de ganglions lymphatiques (LN) provenant de quatre patients atteints de LCM. Barres d'échelle, 50 µm. (B) Immunohistochimique multiplex afin de mettre en évidence l'expression de la Cycline D1 (opal 570 ; blanc), CD3 (opal 690 ; vert), CD68 (opal 520 ; magenta) et IL-32 (opal 650 ; rouge) sur des sections de ganglions lymphatiques de deux patients atteints de LCM (MCL_LN#2 et MCL_LN#3). Pour le patient MCL_LN#2, le panel de gauche représente une mosaïque, le panel du milieu (ROI#1) montre un grossissement sur l'échantillon (barres d'échelle, 50 μm) et le panel de droite (ROI#2) représente une projection de 26 empilements Z (plage 10 µm ; barre d'échelle 10 µm). Pour le patient MCL_LN#3, le panel de gauche représente une zone large (barre d'échelle, 100 µm), le panel du milieu (ROI#1) montre une zone infiltrée par les cellules CD3⁺ (barres d'échelle, 50 µm) et le panel de droite (ROI#2) représente une zone exclusive à la tumeur (barres d'échelle, 50 µm). D'après Decombis et al., 2022.

II) Etude des mécanismes de résistance du LCM à la thérapie OAsIs

Les résultats des travaux de l'équipe (Chiron et al., 2016) sont à l'origine de l'essai clinique international de phase 1 OAsIs promu par le CHU de Nantes (Prof. S. Le Gouill NCT#02558816). Ce dernier a été conçu pour évaluer la faisabilité d'un traitement séquentiel avec l'Ibrutinib (inhibiteur du BTK) favorisant la migration des cellules de LCM de la niche ganglionnaire vers le sang et l'Obinutuzumab (anti-CD20), inhibant *in situ* BCL-XL suivi du Venetoclax (inhibiteur BCL2) qui est très actif dans les cellules circulantes ayant diminué l'expression de BCL-XL. Les résultats de cet essai ont récemment été publiés et montrent que la combinaison a été bien tolérée et a permis un contrôle de la maladie, y compris des réponses complètes chez des patients au diagnostic ou à la rechute avec des profils génétiques à haut risque (ex : TP53 muté) (Le Gouill et al., 2021).

Malgré les résultats prometteurs de cette approche sans « chimiothérapie », environ 1/3 des patients progressent ou rechutent rapidement. Nous avons collecté les échantillons des patients inclus dans l'essai clinique OAsIs à l'inclusion et à la rechute. Au laboratoire d'Hématologie du CHU de Nantes, le Dr Yannick Le Bris a caractérisé les échantillons pour la présence de mutations/CNV dans environ 49 gènes, y compris les voies p53, BCR ou NFkB, et une région spécifique du chromosome 9p récemment décrite comme étant impliquée dans la résistance à l'Ibrutinib/Venetoclax (Agarwal et al., 2019). Nous avons mis en évidence un enrichissement de mutations GOF de *CARD11* à la rechute : ces mutations sont connues pour induire une activation constitutive de CARD11, lui permettant ainsi d'interagir avec ses deux partenaires BCL10 et MALT1 afin de former le CBM responsable de l'activation de la voie NFkB.

Le suivi longitudinal d'un patient inclus dans l'essai clinique OAsIs en tant que seconde ligne de traitement suite à une rechute après un traitement R-CHOP nous a permis de confirmer ses résultats. Nous avons identifié 3 clones au moment du diagnostic : un clone caractérisé par des mutations de *TP53*, *ATM* et *NOTCH2*, un clone majeur avec une mutation de *TRAF2* et un sous-clone mineur avec une mutation de *CARD11*. Alors que le clone présentant une mutation de *TRAF2* a résisté à la chimiothérapie, il s'est révélé très sensible au traitement OAsIs puisqu'il n'a pas été détecté après le traitement. En revanche, le clone présentant une mutation de *CARD11* est resté silencieux jusqu'à sa progression pendant le traitement OAsIs.

Les mutations de *TRAF2* et de *CARD11* sont connues pour induire une résistance à l'Ibrutinib et nous avons observé un avantage sélectif des cellules présentant des mutations de *CARD11* sous le traitement OAsIs. Pour comprendre ce mécanisme de sélection clonale, nous avons analysé les échantillons provenant du même patient à l'inclusion et à la rechute en single cell

126

RNA-seq dans le cadre du SIRIC ILIAD. Un clustering non supervisé de ces échantillons longitudinaux a séparé les cellules en fonction de leur profil transcriptionnel. Nous avons identifié 7 clusters distincts dont deux communs à l'inclusion et à la rechute (clusters #4 et #5). Grâce à des analyses bioinformatiques de trajectoires, nous avons émis l'hypothèse que le cluster #5 est à l'origine du processus de rechute et entraine la formation des deux autres clusters de résistance (clusters #6 et #7).

Nous avons ensuite analysé le profil transcriptionnel de chaque cluster et nous avons montré que la rechute est caractérisée par une expression des gènes cibles de *NFkB1/RelA* corrélant ainsi avec l'activité constitutive de *CARD11*. Sur la base du profil transcriptomique du cluster #5, nous avons établi une signature de résistance qui s'est révélée significativement plus élevée chez les patients réfractaires en comparaison aux répondeurs. Nous avons défini, à partir de ces données, une signature composée de 16 gènes (MCL_R16) qui s'est avérée associée à un mauvais pronostic des patients de LCM traités pas la combinaison OAsIs ou par chimiothérapie conventionnelle (R-CHOP ou Lyma).

Parmi les 16 gènes exprimés par les cellules résistantes à OAsIs, nous avons observé l'expression de *BCL2A1*, un membre anti-apoptotique de la famille BCL2. Nous avons mis en évidence que *BCL2A1* est plus exprimé à la rechute après OAsIs en comparaison à l'inclusion et impliqué dans la résistance au Venetoclax et à la combinaison OAsIs. Nous avons évalué son rôle au niveau mitochondrial et nous avons observé que BCL2A1 est capable de recapter le BH3 pro-apoptotique libéré lors du ciblage d'autres membres anti-apoptotiques de la famille BCL2 (BCL2, MCL1, BCL-XL), entraînant une diminution de l'induction de l'apoptose.

BCL2A1 est connu pour être une cible de la voie NFkB et nous avons montré une forte corrélation entre l'expression de *BCL2A1* et la signature du BCR préalablement décrite par le Dr Saba **(Saba et al., 2016)**. Après un traitement des lignées cellulaires avec de l'Ibrutinib et du Venetoclax, nous avons observé que l'Ibrutinib entraine une baisse de l'expression de *BCL2A1* conduisant ainsi une apoptose des cellules en combinaison avec le Venetoclax.

En collaboration avec le Dr Nicolas Bidère et le Dr Jane Jardine, nous avons montré que les mutations de *CARD11* entrainent une augmentation de l'activité de la voie NFkB mais également de l'activité du promoteur de *BCL2A1*. Afin de contrecarrer les résistantes induites par les mutations de *CARD11* et l'expression de *BCL2A1*, nous avons ciblé le CBM en utilisant un inhibiteur de la fonction paracaspase de MALT1, le MLT-748. Nous avons montré que le MLT-748 entraine une baisse de l'expression de *BCL2A1* dans les cellules *CARD11* Wild type (*CARD11^{WT}*) et *CARD11* mutées (*CARD11^{MUT}*) contrairement à l'Ibrutinib qui entraine une baisse de *BCL2A1* uniquement dans les cellules *CARD11^{WT}*. En combinaison avec le Venetoclax, le MLT-748 entraine une apoptose des cellules *CARD11^{WT}*.

collaboration avec le Dr Gaël Roué, cette combinaison a été testée *in ovo* sur des cellules de LCM *CARD11^{MUT}* implantées dans des modèles de CAM (Chorioallantoic Membrane) d'embryon de poulet. Nous avons mis en évidence une forte synergie de cette combinaison conduisant à une inhibition de 70% de la croissance tumorale après 4 jours de traitement.

En résumé, sur la base d'une analyse génomique longitudinale (CNV/SNV), nous avons mis en évidence un enrichissement des mutations GOF de *CARD11* à la rechute. En intégrant des données transcriptomiques à la résolution cellule unique (single cell RNA-seq), nous avons identifié un cluster impliqué dans la résistance à la thérapie et caractérisé par une signature *NFKB1* et une forte expression de *BCL2A1*. Nos analyses fonctionnelles nous ont permis de mettre en évidence que les mutations de *CARD11*, impliquées dans la résistance à l'Ibrutinib et à OAsIs, ont un impact direct sur la régulation de *BCL2A1* impliqué dans la résistance à OAsIs et au Venetoclax. Cette étude nous permet de proposer le ciblage de MALT1 afin de contrecarrer les résistances induites par les mutations de *CARD11* (**Figure 30**).



Figure 30 : Implication de CARD11 et BCL2A1 dans la résistance à la combinaison Ibrutinib/Venetoclax dans le LCM. A travers une analyse génomique longitudinale (CNV/SNV), les mutations GOF de CARD11 ont été identifiées comme impliquées dans le processus de rechute à la thérapie OAsIs. La technique de single cell RNA-seq, réalisée à partir d'un échantillon longitudinal (inclusion et rechute à OAsIs), a permis la mise en évidence d'un cluster impliqué dans la résistance à la thérapie caractérisé par une signature NFKB1 et une forte expression de BCL2A1. A travers des analyses fonctionnelles, les mutations GOF de CARD11, impliquées dans la résistance à l'Ibrutinib et à OAsIs, ont présenté un impact direct sur la régulation de BCL2A1 impliqué dans la résistance à OAsIs et au Venetoclax. Le ciblage de MALT1, un partenaire de CARD11, et de BCL2 permet de contrecarrer les résistances induites par les mutations de CARD11. J'ai présenté ces résultats lors d'une communication orale au congrès de l'American Society of Hematology à la Nouvelle-Orléans en décembre 2022 **(Annexe 2)**. Notre article intitulé : « CARD11 and BCL2A1 Join Forces to Promote Resistance to Ibrutinib/Venetoclax Combination in Lymphoma Patients », dont je suis première auteure, est en cours de soumission.

CARD11 gain of function upregulates BCL2A1 expression and promotes resistance to

CD20 / BTK / BCL2 targeted therapies combination in mantle cell lymphoma.

Salomé Decombis^{1*}, Celine Bellanger^{1*}, Yannick Le Bris², Candice Madiot¹, Jane Jardine¹,

Juliana Carvalho Santos³, Delphine Boulet¹, Christelle Dousset¹, Audrey Menard², Charlotte

Kervoelen⁴, Elise Douillard¹, Philippe Moreau⁵, Stephane Minvielle¹, Agnes Moreau-Aubry¹,

Benoit Tessoulin⁵, Gael Roué³, Nicolas Bidère¹, Steven Le Gouill⁶,

Catherine Pellat-Deceunynck¹ and David Chiron^{1**}

- ³ Lymphoma Translational Group, Josep Carreras Leukaemia Research Institute (IJC), Badalona.
- ⁴ Therassay (Onco-Hemato) Core Facility, Nantes Université, Capacités, Nantes, France

⁵ Service d'Hématologie Biologique, CHU, Nantes, France

⁶ Institut Curie, Paris, Paris, France

*equal contribution

** Corresponding author:

Tel: +33 228080266

Address: 8 quai Moncousu, 44007 Nantes, France

E-mail: david.chiron@univ-nantes.fr

Disclosure

No potential conflicts of interest were disclosed by the authors

Key words: CARD11 mutations, Ibrutinib, Venetoclax, scRNA-seq, MALT-inhibitors

¹ Nantes Université, Inserm, CNRS, Université d'Angers, CRCI2NA, Nantes - France

² Service d'Hématologie Biologique, CHU, Nantes, France

Abstract

Strategy combining targeted therapies against CD20, BCL2 and BTK (i.e., OAsIs trial) is effective in mantle cell lymphoma (MCL), but acquired resistances remain a recurrent issue. We performed integrative genomic and longitudinal scRNA-seq analyses of MCL patients and revealed the emergence of subclones with a selective advantage against OAsIs combination. We showed that resistant cells were characterized by BCR-independent overexpression of NFkB1 target genes, especially due to CARD11 mutations, underlying a common escape mechanism. Functional studies demonstrated that CARD11 gain of function not only resulted in BCR independence, but also directly increase the transcription of the antiapoptotic BCL2A1, leading to CD20/BTK/BCL2 inhibition resistance. To overcome resistance, we showed that MALT1 inhibition decreased BCL2A1 and (re)sensitized to BCL2 targeting, irrespective of CARD11 status, both *in vitro* and *in vivo*. Our study not only identified mechanisms of resistance to OAsIs therapy but also provided a novel strategy to overcome resistance in lymphoma.

Introduction

While standard chemoimmunotherapy offers durable responses for many patients with mature B-cell malignancies, the toxicity of intensive regimens, as well as *de nov*o or acquired resistance, remain major challenges for several lymphoma subtypes. This is the case for mantle-cell lymphoma (MCL), an often aggressive and difficult-to-cure B-cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL)¹. Despite the advances in modern first-line chemotherapeutic strategies², most patients relapse and the duration of response decreases from one salvage treatment to the next. Several molecular determinants of the response to chemotherapy have been identified, these include *TP53* mutations, *CDKN2A* deletions, high proliferation index (Ki67), blastoid histology, and complex karyotype^{3,4}, and this underscores the need for new treatment strategies, especially for these high-risk patients.

Over the past decade, extensive efforts to characterize the molecular profiles of MCL cells, as well as the multiple interactions that occur in their malignant ecosystems, have identified tumor vulnerabilities^{5,6}. Among them, elevated CD20 expression⁷, deregulation of apoptosis by an imbalance in the Bcl2 family⁸, and constitutive BCR signaling⁹ have emerged as promising druggable pathways. Indeed, anti-CD20 monoclonal antibodies (i.e. rituximab), Bcl2 inhibitors (i.e. BH3-mimetics venetoclax), and BTK inhibitors (i.e. ibrutinib) have shown great promise as single agents^{10,11} or in combination with chemotherapy^{12,13}. The efficacy of these targeted therapies is currently leading to a paradigm shift from chemoimmunotherapy to targeted agents for patients with relapsed/refractory MCL, and these are rapidly moving towards being first-line therapies.

Nevertheless, high inter- and intra-patient heterogeneity, coupled with high tumor cell plasticity, significantly limits the long-term efficacy of targeted monotherapies^{14,15}. As a result, several reports have identified multiple mechanisms of resistance arising from both mutations and microenvironmental cues. For example, the selection of MCL cells which have Bcl2 amplicon loss has been observed during venetoclax treatment¹⁶, and the microenvironment-dependent expression of alternative anti-apoptotic proteins has been described as a major means of escape^{17,18}. Similarly, despite a strong dependence on BCR-

dependent NFkB activation, resistance to BTK inhibition rapidly emerges in MCL. Indeed, in addition to rare on-target mutations¹⁹, mutational or microenvironment-dependent activation of the alternative NFkB pathway, as well as metabolic reprogramming, have been reported in ibrutinib-resistant cells^{20,21}.

To limit this tumor adaptability and simultaneously inhibit multiple critical pathways, mechanism-based combinations of targeted therapies are being designed. We previously demonstrated that ex vivo pre-treatment with obinutuzumab, a humanized anti-CD20 type II antibody¹⁷, and ibrutinib²² was able to counteract microenvironment-dependent resistance to venetoclax in MCL, mostly through the down-regulation of NFkB-dependent BCLxL expression. This rationale was involved in the design of the OAsIs trial, a prospective, openlabel, phase-1/2 (NCT02558816) trial, which consists of a sequential combination of obinutuzumab and ibrutinib followed by venetoclax in MCL patients. This triple "chemo-free" combination was well tolerated and led to a complete response (CR) rate of 67% and 86.6% in relapsed and untreated patients, respectively²³. Nevertheless, despite these high initial response rates, nearly one-third of the patients progressed or rapidly relapsed. Here, by combining comprehensive genomics and single-cell transcriptomics, we established a novel signature of in vivo resistance and deciphered the molecular mechanisms underlying tumor escape. Based on the mechanisms we discovered, we performed functional studies using MCL primary cells and lymphoma cell lines and identified therapeutic vulnerabilities that could be exploited in order to overcome lymphoma resistance.

Methods

Patient samples cohort

Samples were collected from peripheral blood (PB) or bone marrow (BM) after obtaining informed consent from MCL patients (REFRACT-LYMA cohort; ethical approval GNEGS-2015-09-1317) and in accordance with the Declaration of Helsinki. Characteristics of patients who participated in the OAsIs trial (NCT02558816) were summarized in Extended Data Table S1.

Deep DNA sequencing

DNAs from CD19+ MCL cells from patients enrolled in the OAsIs trial (n=14) were used for comprehensive genomics. A panel including 49 genes and 170 exons from the 9p21 region was designed to identify recurrent mutations and copy number variations (CNV), based on hits described in the literature for their role in lymphomagenesis (Extended Data Table S2). Probes were produced by Integrated DNA Technologies (IDT®).

Single-cell RNA-sequencing

Seven BM samples from 6 patients included in the OAsIs trial were analyzed at the single cell resolution. Briefly, live MCL cells were first enriched by Ficoll-Paque Plus and antihuman CD19 magnetic beads. Depletion of human erythroid precursors and erythrocytes was then performed using CD235a (Glycophorin-A) magnetic beads. 15,000 cells from the resulting suspensions were loaded on a Chromium controller to generate single-cell partitions following the manufacturer's protocol (10X genomics).

scRNA-seq libraries were constructed using the Chromium Next GEM Single Cell 3' GEM, Library & Gel Bead Kit v3.1 and sequenced using the NovaSeq 6000 system (Illumina). Overall, 88 034 cells were sequenced with a median of 14 805 per sample and an average of 50 686 reads per cell. Data processing and bioinformatics analysis are detailed in the supplemental Methods section.

Functional assays

BH3 profiling

BH3 profiling was performed in Mino and SP53 cell lines. Permeabilized cells were exposed to FS2 peptides (20 µM), designed to specifically target BCL2A1²⁴, for 45 minutes at room temperature 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.

NFκB and BCL2A1 Luciferase Assay

pUNO1-hCARD11 WT, G123S, and G123D were kindly provided by Dr. Andrew Snow (USUHS, Bethesda). PCDNA3-hCARD11^{D230N} was generated from PCDNA3-hCARD11 (#44431, Addgene), which was used as control. HEK293T cells were transfected using a calcium phosphate method and were treated or not with MLT-748 or JNJ-67856633 for 48h. For luciferase reporter assays, firefly luciferase constructs driven by NFκB binding sequences and *Renilla* luciferase pRL-TK (Int⁻) plasmid were used (Promega). NFκB transcriptional activity was analyzed using the Dual-Luciferase Kit (Promega), with firefly fluorescence units normalized to *Renilla* luciferase fluorescence units as previously described²⁵. Regarding *BCL2A1* promoter, we used the pLightSwitch_Prom_BCL2A1 plasmid and luciferase activity was measured using the LightSwitchTM Luciferase Assay Kit (Active Motif).

Survival analysis

Time-to-event survival curves were estimated with the use of the Kaplan-Meier method. Patients were divided into two groups based on the signature score; patients having a score in the upper tercile belonged to the group 'high'. Probabilities of PFS and OS were compared in subgroups using the log-rank test and Cox proportional-hazards regression. The median OS or PFS time was calculated as the smallest survival time when the survival probability is <50%. Survival curves were carried out with the 'survival' and 'survminer' packages.

MCL cell datasets were collected from the GEO database (GSE93291, n=122). CEL files were downloaded and processed in R-3.6.1 using the affy package, optical noise/background correction was performed by gcrma with standard options, and expression batches were finally normalized by quantiles using the limma package. PB vs. LN MCL samples analysis has been performed as previously described²⁶.

Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model

Fertilized white Leghorn chicken eggs were purchased from Granja Santa Isabel, S. L. (Córdoba, Spain) and incubated for 9 days at 37 °C with 55% humidity. At day 9 of their embryonic development, eggs were cleaned with alcohol 70° and a window of an approximate 2 cm-diameter was drilled on top of the air chamber of the eggshell. Then, half million DFBL-44685v2 CARD11^{D230N} PDX MCL cells were suspended in 25 µL RPMI medium containing 10% FBS and 100 U/mL penicillin and streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Inc.) and 25 µL Matrigel (Cultek). The mix was incubated for 15 min at 37 °C and subsequently implanted into the CAM of each egg. The window was then covered with a sterile tape and the eggs were placed back in the incubator. 250 nM of JNJ-67856633 (day 12 and 13), 2 nM of venetoclax (day 13) or both were administered topically on the tumor-bearing CAMs. On the 16th day of development (7 days post-implantation), chick embryos were sacrificed by decapitation. Tumors were excised and carefully weighed to determine their mass.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using unpaired t-test, two-sided Mann–Whitney, ANOVA, or Wilcoxon signed-rank as stated in the Fig. legends. Analyses were performed using Graph-Pad Prism and R statistical software and all tests were considered statistically significant at p < 0.05.

Additional methods are detailed in the supplemental Methods section and Extended Data Table S3 or have been previously described²⁶.

Results

Enrichment of CARD11 gain-of-function mutations in relapsed/refractory patients

Fresh tumor tissues from MCL patients were available before their inclusion in the OAsIs trial (n=12) and at relapse (n=5) (Extended Data Table S1). Comprehensive genomic analysis (SNV/CNV) of a panel including 49 genes and the 9p21 region was performed on CD19+ MCL cells using targeted capture technology (Fig. 1A; Extended Data Table S2). The most frequently altered genes at inclusion included *ATM* (6/12), *TP53* (5/12), and *KMT2D* (5/12), and no hits in *BCL2* or *BTK* were detected (Fig. 1B, Extended Data Table S2). While no significant association between mutational profile and clinical response was observed before treatment, we found that *CARD11* mutations were enriched at relapse (n=3/5, Fisher t = 0.01), suggesting a selective advantage of *CARD11* mutated cells under OAsIs therapy (Fig. 1C).

This was further confirmed by the longitudinal analysis of patient MCL34 samples at the time of diagnosis (Diag), before inclusion in the OAsIs trial (incl.), and at relapse (Rel). This highrisk patient (TP53^{Y220C}, high MIPI=9, and Ki67>30%) was included in OAsIs as a second-line patient after a conventional chemotherapy regimen (R-CHOP). In contrast to a poor response to chemotherapy (stable disease), he achieved a complete molecular response before relapsing after 12 months of treatment²³. While most hits were similar across the samples (i.e., ATM, TP53 and NOTCH2 mutations, SMARCA2 and 9p21 deletions, CCND1 amplification), we observed at relapse the emergence of a gain-of-function (GOF) CARD11 mutation (G123S, latch domain)^{27,28} and the downfall of a loss-of-function (LOF) TRAF2 variant (C49F, ring domain²⁹, Fig. 1D, Extended Data Table S2). These selective modulations suggest dynamic subclonal distribution under treatment pressure. Indeed, while CARD11^{G123S} MCL cells remained discrete after first-line treatment, they made up the majority of the tumor after OAsIs (Fig. 1E). Of note, a more focused analysis of the G123 position revealed the presence of few c.367G>A reads both at diagnosis and OAsIs inclusion (G123S variant frequency = 0.12 % at Diag, 0.19 % at incl., Phred quality score: 35), confirming the hypothesis of selection, under OAsIs, of a rare subclone already present at diagnosis (Extended Data Table S4). Regarding *CARD11* mutations found in other OAsIs relapse biopsies, one was at the same position (G123D, MCL24) and another was located in the Coiled-coil (CC) domain (R235Q, MCL40), both of which were predicted as damaging and located in domains leading in GOF^{27,30}. Finally, we detected *CARD11* mutations in 4 additional MCL patients from our local cohort (Refract-Lyma, n=48 sequenced). All mutants were located in the CC or Latch domains, including 2 additional G123S mutants, suggesting that mutations at position G123 are not infrequent in MCL (Fig. 1F, Extended Data Table S4). Both *TRAF2* LOF and *CARD11* GOF have been reported as being involved in ibrutinib resistance, inducing BCR-independent NFkB2 and NFkB1 constitutive activity, respectively^{31,32}. To understand the selective advantage of *CARD11* GOF in MCL under OAsIs, we performed a transcriptional analysis at the single-cell resolution of the patient MCL34 samples, before and at OAsIs relapse.

Longitudinal single-cell analysis uncovered a minor OAsIs-resistant subpopulation

We were able to sequence 4,860 bone marrow (BM) MCL cells before OAsIs (incl.), and 5,345 cells at relapse (Rel) (Extended Data Fig. S1A). We observed an elevated NIK / NFkB2 transcriptional signature³³ at inclusion (p < 0.0001), consistent with the functional consequences of the *TRAF2* LOF mutation observed in this sample (Fig. 2A). By contrast, cells from the sample collected at relapse displayed higher NFkB1 and BCR signatures³³ (p < 0.0001), consistent with the acquired *CARD11* GOF mutation (Fig. 2A). Furthermore, we did not observe transcriptional modulation of the OAsIs targets (*BTK, MS4A1*/CD20, *BCL2*)(Extended Data Fig. S1B).

Unsupervised clustering of these longitudinal samples was performed to segregate the cells according to their transcriptional profile. Seven distinct clusters were identified, 2 of them being common at inclusion and relapse (clusters #4 and #5, Fig. 2B). The cell-cycle signature analysis highlighted a proliferative heterogeneity among the clusters, clusters #3 and #4 brought together cycling MCL cells (44% and 85%, respectively, Fig. 2C). Inference of the cell-cycle transcriptional program allowed us to reassign cycling cells to their quiescent

counterpart clusters (Extended Data Fig. S1C), and hierarchical clustering highlighted a close transcriptional proximity between clusters #1 and #2, exclusively detected before treatment, as well as between clusters #6 and #7, exclusively detected at relapse (Extended Data Fig. S1D). Finally, single-cell trajectory analysis identified a small number of cells from the inclusion sample, which belonged to cluster #5, within the branches that contributed to the relapse, suggesting that cells belonging to this minor cluster were at the initiation of the relapse process (Fig. 2D).

Functional annotation of each cluster's transcriptional signature, using the Reactome database, confirmed enrichment of the cell-cycle program in clusters #3 and #4, and highlighted increased transcriptional and translational activity at relapse (clusters #6 and #7). The Enrichr database (TRRUST tool) predicted enriched activity of the transcription factors NF κ B1 and RELA at relapse (clusters #5 and #6 / #7, p<5x10⁻⁵), suggesting the central role of this transcriptional program in OAsIs resistance (Fig. 2E). Altogether, we identified a minor subclone (cluster #5 187/4,860 cells at inclusion), before OAsIs therapy, that was resistant *in vivo*, survived upon treatment (393/5,345 cells at relapse), and was at the initiation of the clusters exclusively detected at relapse (clusters #6 and #7). All relapse clusters were characterized by elevated NF κ B1/RELA activity, which was consistent with the *CARD11* GOF mutation previously identified.

A 16-gene signature characteristic of OAsIs-resistant cells and associated with poorer outcome in MCL

We further focused our analysis on the NFkB1-related transcriptional signature characteristic of the OAsIs-resistant cluster #5 (n=742 genes, Fig. 2E, Extended Data Table S5), and assessed it at single-cell resolution in 5 additional samples from 5 patients enrolled on OAsIs. scRNA-seq was performed at baseline for 2 patients who achieved long-term complete response (CR >24 months, MCL36 and MCL39), 1 patient who rapidly relapsed after initial partial response (PR, 6 months, MCL12) and 2 refractory patients (progressive disease, MCL10, and MCL24) (Extended Data Fig. S2A). Unsupervised clustering highlighted intra-

tumoral heterogeneity in all the samples, with 4 to 5 clusters identified in each case (Extended Data Fig. S2B), all of them displayed expression of the OAsIs targets *MS4A1/CD20*, *BTK*, and *BCL2*, with the striking exception of CD20 loss in all the cells from the refractory patient MCL10 (Extended Data Fig. S2C). The cell-cycle analysis highlighted 1 or 2 proliferating clusters in each sample (Extended Data Fig. S2D), which were inferred to limit the impact of heterogeneous proliferation in further analysis (Extended Data Fig. S3A). We then observed that the OAsIs-resistant cluster #5 signature was significantly more elevated in refractory patients when compared to responders (p<0.001, Fig. 3A, upper panel). This signature score was homogeneously elevated across the cellular clusters in non-responders and homogeneously low for long-term responders (Extended Data Fig. S3B). By contrast, the score was significantly more elevated in one cluster from the patient who rapidly relapsed after initial PR (MCL12, cluster #4), as previously seen for MCL34 (cluster #5) (Fig. 3A, lower panel).

We further designed the MCL_R16 signature composed of 16 genes from among the top ones upregulated in OAsIs-resistant cluster #5 (MCL34, Fig. 3B, Extended Data Table S5). Like the full resistance signature, the MCL_R16 signature was significantly more elevated in clusters #5 of MCL34 and #4 of the MCL12 at inclusion, as well as after OAsIs relapse (Fig. 3C, Extended Data Fig. S3C). The MCL_R16 signature partially overlapped (5 out of the 16 genes in common) and significantly correlated with previously described BCR and NFκB1, but not NIK or Cell-cycle, signatures (Extended Data Fig. S3D/E). Akin to all these signatures³³, MCL_R16 was significantly higher in MCL lymph nodes when compared to peripheral blood (p<0.0001) (Extended Data Fig. S3F), in line with the previously described increased resistance to BCL2 and BTK targeted therapies in MCL protective niches^{17,34}.

To determine whether the OAsIs resistance-derived signature also has an impact on the survival of MCL patients treated with cytotoxic chemotherapy (R-CHOP), we computed the MCL_R16 score in gene expression data from previously reported MCL LN biopsies (GSE93291, n=122). Patients having a high MCL_R16 score (upper tercile) had significantly lower OS, the median survival time being 17.3 months for patients with a high MCL_16R

score compared to 53.8 months for others (p<0001) (Fig. 3D, upper panel). This observation was confirmed with an intensive regimen (Lyma-trial, n=99), in which patients with a higher MCL_R16 score had significantly shorter PFS (51 months vs. not reached, p=0.028) (Fig. 3D, lower panel). While the proliferation score was also a strong predictor of clinical response in both sets, BCR and NFkB signatures were not associated with OS or PFS (Fig. 3D). Taken together, we designed a novel 16-gene score based on the transcriptional profile of OAsIs-resistant cells, which is also predictive of MCL survival after chemotherapy in contrast to related NFkB and BCR signatures.

BCL2A1 is frequently expressed in MCL and triggered resistance by buffering BH3only proteins.

Among the top genes associated with OAsIs resistance (Fig. 3B), *BCL2A1*, an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, has previously been described as a major venetoclax resistance factor in lymphomas^{16,35,36} and acute myeloid leukemia³⁷. In accordance with the MCL_R16 signature pattern, the *BCL2A1* RNA level was: 1) significantly higher at relapse compared to inclusion (p<0.0001) (Fig. 4A); 2) especially elevated in non-responders (MCL10 and MCL24) (Extended Data Fig. S4A); and 3) enriched in a specific cluster of cells in the 2 patients who experienced rapid relapse after initial response (cluster #5 of MCL34 and cluster #4 of MCL12) (Extended Data Fig. S4B). Bulk transcriptomic analysis of peripheral blood (PB) MCL samples and cell lines highlighted frequent expression of *BCL2A1* (n=63), whereas 3 out of 7 MCL cell lines displayed low levels (Fig. 4B). This pattern of expression was further confirmed at the protein level in MCL cell lines (Extended Data Fig. S4C) and primary cells, including OAsIs-resistant cells (BCL2A1^{high}, MCL24) and OAsIs-sensitive cells (BCL2A1^{low}, MCL36, Fig. 4C).

To address the impact of BCL2A1 expression in the OAsIs response, we carried out further *in vitro* functional assays. Mino cells were stably transfected with mCherry-BCL2A1 expressing vector (Mino_A1, Extended Data Fig. S4D). Ectopic BCL2A1 expression resulted in a dramatic loss of sensitivity to selective BCL2 inhibition (LD_{50} venetoclax in Mino_ct = 25

nM vs. Mino_A1 > 100 nM) and to the OAsIs combination (LD₅₀ Mino_ct = 6.25 vs. Mino_A1 > 100 nM) (Fig. 4D). As observed in Mino cells, the BCL2A1^{high} MCL cells from the refractory MCL10 patient were more resistant to the combination *ex vivo* than the MCL cells from responding MCL7 and MCL12 patients (Extended Data Fig. S4E).

To determine the functional involvement of BCL2A1 protein at the mitochondrial level, we performed dynamic BH3-profiling using the BCL2A1-specific peptide FS2²⁴ in MCL cell lines (Mino, SP53). We first observed that cytochrome-c release was not significantly increased in the presence of FS2 at baseline, suggesting that MCL cells were not primed on BCL2A1 (Fig. 4E). By contrast, pre-treatment with venetoclax in sensitive Mino cells (LD₅₀ Ven =25 nM), or with a combination of BH3-mimetics in venetoclax-resistant SP53 cells (LD₅₀ Ven >2500 nM), resulted in elevated priming to BCL2A1 (p <0.001, 48% and 87% of cytochrome-c release, respectively, Fig. 4E). These results suggest that BCL2A1 was able to capture back proapoptotic BH3-only released upon the targeting of other anti-apoptotic members of the Bcl2-family (BCL2, MCL1, BCLxL), resulting in diminished apoptosis induction (Extended Data Fig. 4F). Finally, we observed that BCL2A1 protein expression increased upon venetoclax treatment *in vitro* (Extended Data Fig. S4G), consistent with its stabilization once it is in complex with BH3-only proteins³⁶. Overall, our results highlighted that elevated expression of BCL2A1 could be involved in resistance to selective BCL2-targeted monotherapy but also in combination, such as OAsIs.

BCR-dependent expression of BCL2A1 is disrupted by BTK inhibition, resulting in cell death synergy in combination with BCL2 inhibition.

To better understand the role of BCL2A1 in OAsIs resistance, we further studied its regulation in MCL. While *BCL2A1* is a known NF κ B target gene and belongs to the NF κ B signature previously described in MCL³³, we observed a strong correlation with the BCR signature in PB MCL cells and cell lines (r= 0.5, p<0.0001; Fig. 5A, Extended Data Fig. S5A). In line with a BCR-dependent expression, *BCL2A1* was rapidly induced 3h after IgM engagement (median increase of 5.25 fold, n= 5, p<0.05, Fig. 5B). BCR-dependent
expression of BCL2A1 was further confirmed at the protein level in PB MCL cells and NTS3 cells (Fig. 5C).

Accordingly, *BCL2A1* was inhibited by ibrutinib in all 4 BCL2A1+ cell lines (median reduction: 34%, n=4, p<0.05), in a manner similar to the early and sensitive BCR activation marker *CD83*³⁸, but unlike other anti-apoptotic Bcl2 family proteins (*BCL2, MCL1, BCLXL*, Fig. 5D). Consequently, ibrutinib greatly reduced the BCL2A1 protein level (Extended Data Fig. S5B), leading to synergistic apoptosis when associated with venetoclax in BCL2A1+, but not in BCL2A1- cells (mean synergy score: 17 vs. 1) (Fig. 5E, Extended Data Fig. S5C). Overall, we identified that 1) the anti-apoptotic protein BCL2A1 is a BCR-dependent resistance factor to Bcl2 inhibition; 2) BCL2A1 is selectively down-regulated through BTK inhibition, leading to ibrutinib/venetoclax synergistic apoptosis.

CARD11 GOF mutations result in BCR-independent BCL2A1 overexpression

The CARD11-BCL10-MALT1 (CBM) complex assembly is involved in the transduction of BCR-specific NF κ B signaling by triggering both MALT1 scaffold and paracaspase activities (Fig. 6A)³⁹. We first observed constitutive CBM activity through the cleavage of the MALT1 substrate HOIL1 in BCL2A1^{high} primary cells and cell lines, in contrast to BCL2A1^{low} MCL cell lines (Extended Data Fig. S6A). This suggested that GOF mutations of *CARD11*, which are enriched in relapsed OAsIs patients (Fig. 1), could have a direct impact on BCL2A1 expression. To test this hypothesis, we overexpressed *CARD11*^{WT}, *CARD11*^{G1235}, and *CARD11*^{G123D} in HEK293 cells, which lack CARD11 but express both BCL10 and MALT1. Both mutations resulted in increased activity of the CBM, measured by the cleavage of the MALT1 substrates HOIL1 and CYLD (Extended Data Fig. 6B). Using reporter assay experiments, we showed that *CARD11* GOF mutations led directly to increased activity (fold change in *CARD11*^{MUT} = 4.2, p<0.001) as well as *BCL2A1* promoter activity (fold change in *CARD11*^{MUT} = 2.7, p<0.001, Fig. 6B). These results suggest that GOF mutations in the latch domain of CARD11 lead directly to BCR-independent induction of NF κ B / *BCL2A1*. Similar findings were obtained with GOF mutations in the CC domain (fold change in

CARD11^{MUT}= 1.7, p<0.05; Extended Data Fig. S6C). Accordingly, ibrutinib greatly reduced *BCL2A1* level in *CARD11*^{WT} (fold change = 0.21, n=4) but not in *CARD11*^{MUT} (fold change = 1.12, n=4) lymphoma cells, (Fig. 6C).

MALT1 targeting results in BCL2A1 inhibition and consequent synergistic cell death with BCL2 targeting, irrespective of CARD11 mutational status.

Among the druggable strategies for inhibiting CARD11, selective inhibition of its partner MALT1 is currently being tested in early-phase clinical trials (NCT03900598, NCT05515406, NCT05144347). Furthermore, MALT1, in contrast to CARD11 and BCL10, is significantly upregulated in MCL primary cells when compared to normal B-cells (NBC), which underscores the relevance of targeting this paracaspase (Extended Data Fig. S6D). To address the potential efficacy of MALT1 inhibition for counteracting both BCR-dependent (CARD11^{WT}) and independent (CARD11^{MUT}) BCL2A1 expression, we tested two highly selective MALT1 allosteric inhibitors, MLT-748⁴⁰ and JNJ-67856633⁴¹. Using reporter assay experiments, we first observed that MALT1 inhibition resulted in the inhibition of CARD11^{MUT}-dependent NFkB activity (Fold change = 0.59 for G123S, 0.56 for D230N, p< 0.05, Extended Data Fig. S6C). Likewise, we observed that both inhibitors partially counteracted CARD11^{G123S}-dependent BCL2A1 promoter activity (Fold inhibition MALT1-i vs. untreated= 0.59 for G123S, Extended Data Fig. S6E). Based on these encouraging results, we further performed RNA-seg of CARD11^{WT} and CARD11^{MUT} lymphoma cells treated with the BTK inhibitor ibrutinib or the MALT1 inhibitor MLT-748. BTK targeting resulted in the inhibition of genes belonging to the MCL_R16 signature, including BCL2A1, in CARD11^{WT} but not in CARD11^{MUT} cells (p< 0.0001, Fig. 7A). By contrast, MALT1 inhibition similarly lowered gene expression in both groups including BCL2A1, which was down-regulated irrespective of CARD11 status (Fig. 7B). This was further confirmed by q-PCR in $CARD11^{WT}$ (fold change = 0.54, n=3) and $CARD11^{MUT}$, cells (fold change = 0.51, n=3) and similar results were obtained using MLT-748 and JNJ-67856633 (Extended Data Fig. S7A-B).

Transcriptional modulations were confirmed at the protein level, MALT1 targeting resulted partial BCL2A1 down-regulation in all the samples, including *CARD11*^{G123S} MCL cells, in contrast to BTK targeting whose efficacy was restricted to *CARD11*^{wt} cells (Fig. 7C-D). Supporting the role of BCL2A1 in venetoclax resistance, we observed synergistic apoptosis after a MALT1/BCL2 targeted combination *in vitro* in both *BCL2A1*+ *CARD11*^{WT} (synergy score= 24.5 and 26.8 in SP53 and NTS3, respectively) and *BCL2A1*+ *CARD11*^{MUT} (synergy score= 20.2 and 10.3 in OCILY3 and SUDHL16, respectively) (Fig. 7E). As expected, synergy was not observed in *BCL2A1*- cells (Z138, synergy score: -4.7, Extended Data Fig. S7C).

To confirm the efficacy of MALT1/BCL2 dual targeting in *CARD11*^{MUT} MCL cells *in vivo*, we used the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model. This vascularized and immunodeficient alternative *in vivo* model is of growing interest in cancer research and allows the growth of numerous cell types⁴². Here, we established a CAM model using BTK-resistant⁴³ *CARD11*^{D230N} BCL2A1⁺ PDX cells, which were treated with the clinically available MALT1 inhibitor JNJ-67856633 alone or in combination with the BCL2 inhibitor venetoclax (Fig. 8A, Extended Data Fig. S8A-C). While low doses of venetoclax showed no significant inhibition of tumor growth, JNJ-67856633 reduced tumor growth to 40 % of control. The combination highlighted a strong synergy leading to 70 % of tumor growth inhibition after 4 days of treatment (Fig. 8B-C). These results were confirmed in NSG mice, the *CARD11*^{D230N} BCL2A1⁺ tumor burden (peripheral blood and spleen) being reduced using a combination of JNJ-67856633 and venetoclax, both in sub-optimal concentrations as a single agent (Extended Data Fig. S8D-F).

Discussion

Over the past decade, several studies have paved the way for a new era, with the combination of mechanism-based targeted therapies in Cancer. Our recent data have highlighted the critical role of the microenvironment in MCL resistance^{17,22} and it has participated in the rationale of the OAsIs trial, which selectively combined the targeting of CD20, BTK, and BCL2 and resulted in high response rates in relapsed and untreated MCL patients²³. Nevertheless, in line with similar BTK/BCL2 inhibition-based combination therapies^{44,45}, nearly one-third of the patients showed primary or acquired resistance to the OAsIs regimen. This observation led us to investigate the molecular mechanisms involved to design alternative therapeutic strategies for these patients.

Based on single-cell resolution analysis of longitudinal samples from a patient enrolled on the OAsIs trial, we identified, at baseline, a minor cellular population that persisted upon treatment in vivo and ultimately gave rise to relapse. The transcriptomic signature of this minor population was enriched in genes that are controlled by the transcription factor NFKB1, highlighting the fact that a BTK-independent NFkB program was involved in the resistance to the OAsIs regimen in vivo. The resistance signature was further validated through the analysis of resistant cells from additional OAsIs patients and was the basis for a 16-gene score (MCL R16), which also retrospectively predicted lower OS/PFS in patients treated with cytotoxic chemotherapy. Overall, our results suggested overlapping resistance mechanisms for both chemotherapy and targeted therapies in MCL. A subset of multi-resistant MCL patients, whose disease progressed on chemotherapy, BTK/BCL2-based targeted therapy, and CAR-T cells, is currently emerging, however little is known about the (poly)resistance mechanisms involved⁴⁶. It would now be interesting to examine whether tumoral cells from these very high-risk MCL patients display a similar NFkB1-related resistance profile and whether alternative strategies, such as bi-specific antibodies^{47,48}, can counteract this resistance.

BTK-independent NFkB activation can be initiated in malignant B-cells by using multiple pathways which have been implicated in BTK inhibition resistance^{20,49}. This signaling is triggered by genetic events (i.e.: BTK, PLCG2, TRAF2, TRAF3, BIRC3 anomalies)^{19,32}, epigenetic regulation⁵⁰ and microenvironmental cues (i.e.: TLRs, CD40L, BAFF)^{17,26}. In the present study, we have observed that CARD11 GOF mutations were enriched at OAsIs relapse in vivo and resulted in increased NFkB activity in vitro. CARD11 GOF mutations are observed in nearly 10% of B-cell non-Hodgkin's lymphomas at diagnosis⁵¹, and allow cell survival upon BTK inhibition by restoring NFkB signaling downstream. Accordingly, CARD11 GOF mutations have been associated with *in vivo* ibrutinib resistance in DLBCL³¹ and FL⁵². We have demonstrated here that a similar pattern is found in MCL. Intriguingly, we have observed enrichment of CARD11 mutations within the latch domain and especially at the position G123 in our MCL cohort (4/7 among CARD11 mutated samples) (Extended Data Table S4). This pattern was confirmed in a recent analysis of recurrently mutated genes in several B-cell NHL subtypes at diagnosis, in which CARD11 mutants were enriched in the G123 (3/11) and D230 (3/11) positions in MCL, but not in FL, DLBCL, or BL⁵¹. In the present study, we have demonstrated that both variants induced elevated NFkB activity in vitro, and a recent multiplex functional assessment of genetic variants ranked the G123S as one of the most efficient in escaping ibrutinib treatment⁵³. In addition, constitutively elevated NFkB activation associated with CARD11 germline mutation at the G123 position has been described in the context of BENTA disease (B-cell expansion with NF-KB and T-cell anergy)²⁷, reinforcing the potent GOF associated with this hotspot.

In addition to their impact on intrinsic survival, Reiman and colleagues recently highlighted the additional impact of *CARD11* mutations (L244P, Coiled coil domain) within the ecosystem, through the modulation of their dialog with macrophages (CSF1 increase) and T-cells (PDL1/2 increase)⁵⁴. Given the critical role of these dialogs in MCL^{17,26,55}, further studies should evaluate how G123S mutations influence the MCL ecosystem and trigger potential microenvironment-dependent tumor resistance.

While GOF mutations in CARD11 have previously been associated with resistance to BTKinhibitors, their impact on the efficacy of BCL2 inhibition was unknown. By integrating multiomics and functional analysis, we have demonstrated here that GOF mutations result in NFkB-dependent induction of BCL2A1. This anti-apoptotic protein of the Bcl2 family has been studied much less than Bcl2, MCL1, or BCLXL, in the past decades, but recent publications have highlighted its critical role in venetoclax resistance in several hematological malignancies^{16,35,37}. Our BH3-profiling results suggest the dynamic sequestration of the BH3only proteins by BCL2A1 at the mitochondrial level after targeting BCL2, MCL1, and BCLXL, as recently described in CLL³⁶. Accordingly, ectopic overexpression of BCL2A1 led to increased resistance to the OAsIs combination, highlighting the need to target this antiapoptotic protein to counteract resistance. Unlike BCL2 (i.e., venetoclax), MCL1 (i.e., S63845), or BCLxL (i.e., A1155463), no selective small molecule has yet been developed to specifically target BCL2A1. We have demonstrated here that BCL2A1, unlike other antiapoptotic proteins, is tightly controlled by the BTK/BCR pathway in CARD11^{wt} MCL. Altogether, our results position BCL2A1 as a selective bridge between the BCR pathway and mitochondrial apoptosis. Accordingly, BCL2A1 expression is greatly inhibited by ibrutinib in CARD11^{wt} cells, but not in CARD11^{MUT} cells, which results in ibrutinib/venetoclax synergy in CARD11^{wt} BCL2A1⁺ lymphoma cells exclusively.

CARD11 forms the CBM complex with BCL10 and MALT1, and this complex is essential for BCR-dependent NFkB activation. MALT1 has emerged as an attractive therapeutic target, and several small molecules that target its protease function are being tested *in vivo* in NHL and CLL (NCT03900598, NCT05515406, NCT05144347). Moreover, recent studies have demonstrated that MCL cells are addicted to MALT1, at least partially inherited from their B1a B-cell of origin^{56,57}. We have demonstrated that inhibition of the MALT1 protease function resulted in the inhibition of the MCL_R16 signature, including *BCL2A1*, and synergized with BCL2 inhibition to induce apoptosis, irrespective of the CARD11 mutational status, both in vitro and in vivo. Overall, our results have highlighted that MALT1 targeting

could be an interesting alternative to BTK inhibitors, especially in the context of CARD11^{MUT} cells, although MALT1 inhibitors lead to a less profound inhibition of BCL2A1 compared to BTK inhibition in CARD11^{WT} cells. Several strategies for inhibiting both MALT1 scaffold and protease functions, such as the PROTAC technology that leads to selective protein degradation⁵⁸, are under pre-clinical evaluation and may lead to increased efficacy of MALT1 targeting in the near future.

To summarize, our data have uncovered the control of mitochondrial apoptosis by CARD11 through BCL2A1 expression. This network is crucially involved in the resistance to BTK/BCL2-based targeted inhibition, as CARD11 GOF mutations lead not only to BCR independence and consequently ibrutinib resistance, but also to BCL2A1-mediated venetoclax resistance. Nevertheless, our data has shown that targeting the CBM through MALT1 inhibition reverts this resistance and that MALT1 targeting appears to be a promising therapeutic option for counteracting resistance, especially in the context of CARD11 mutation. Mutations in CARD11 are frequently found in DLBCL, for which there is a growing interest in BTK/BCL2-based targeted therapy⁵⁹. Our results, which describe the central role of the CARD11-NFkB-BCL2A1 axis in MCL resistance *in vivo*, could be applied to a broad spectrum of hematological malignancies.

Acknowledgments

The authors thank la Ligue Contre le Cancer Grand-Ouest, i-Site NexT (ANR-16-IDEX-0007), the SIRIC ILIAD (INCa-DGOS-Inserm_12558) and Action Cancer 44. The authors would like to thank the patients who agreed to be part of the Refract-Lyma cohort. The authors thank Drs. Gangoda L. and Herold MJ. for kindly providing the Bfl1-specific monoclonal antibody and Dr. Andrew L. Snow for kindly providing the pUNO1-hCARD11 plasmids. The authors are also most grateful to the Genomics and Bioinformatics Core Facility of Nantes (GenoBiRD, Biogenouest, IFB) and the flow cytometry core facility (Cytocell, SFR Bonamy) for their technical support.

Fig. Legends

Fig. 1. Comprehensive genomic analysis of MCL patients enrolled in the OAsIs trial

(A) Schematic representation of the experimental design to identify therapeutic resistance in MCL. MCL patients were included in the OAsIs clinical trial (obinutuzumab (Anti-CD20), ibrutinib (BTK-i) and venetoclax (BCL2-i)). Blood or bone marrow samples were collected at inclusion or relapse and targeted DNA-seq of 49 selected genes plus the 9p21 region was performed.

(B-D) Landscape of recurrent mutations (SNV/indel) and copy number variations (amplification/deletion) in the patients enrolled in OAsIs and detected by deep DNA-seq at inclusion (incl., n=12) **(B)**, relapse (Rel., n=5) **(C)** or in longitudinal samples **(D)**. Each column represents an individual sample/patient. Only genes with at least two anomalies detected in the cohort and with a variant frequency greater than 5% are represented in the Fig.. Statistical significance was determined by a two-tailed Fisher's exact test. CR: complete response, PR: partial response, PD: progression disease.

(E) The fish plot shows the clonal evolution pattern of patient 34 based on the variant frequency (VaF) measured at diagnosis (Diag), inclusion (incl.), and relapse (Rel.) (Extended Data Table S2) and normalized to the TP53^{Y220C} VaF. SD: Stable Disease.

(F) Schematic representation of CARD11 domains and the mutations found in our Refract-Lyma cohort (n=62 sequenced for CARD11), including patients enrolled in OAsIs trial.

Fig. 2. Longitudinal single-cell RNA-seq analysis of MCL during OAsIs

(A) UMAP plots of the cells from patient MCL34 at inclusion (incl.) and at relapse (Rel) after OAsIs treatment. Each dot represents a single cell. UMAP plots display the NIK/ NFκB2 (left panel), NFκB1 (middle panel) and BCR (right panel) signature scores at inclusion and relapse. Wilcoxon sign-rank test. **** p adj < 0.0001

(B) UMAP plot of the 7 clusters identified by Seurat at inclusion (incl.) and at relapse (Rel) after OAsIs treatment for the patient MCL34. The cell proportion for each cluster at inclusion (green) or relapse (pink) is indicated at the bottom.

(C) UMAP plot displaying the cell-cycle signature scores at inclusion and relapse for the patient MCL34. Cell proportion of cycling (red) or resting (grey) in each cluster is indicated at the bottom.

(D) Trajectory of single cells at inclusion (incl.) and at relapse (Rel) using Monocle2. Clusters defined in panel B are identified in the lower panel.

(E) Heatmap showing the top 20 genes for each cluster. The color gradient indicates the intensity of the median gene expression as indicated. Functional enrichment pathway was calculated using Reactome and Enrichr. **** p adj < 0.0001.

Fig. 3. OAsIs resistance score predicts a less favorable outcome in MCL.

(A) The sign_clust5 score was computed based on the 742 genes characteristic of cluster #5 of patient MCL34, as represented in Fig. 2E. The violin plot shows the sign_clust5 score for patients who achieved complete response (MCL36, MCL39), rapid relapse after the initial response (MCL34, MCL12), or progression (MCL10, MCL24). The analysis was performed at the whole sample level (upper panel) or at Seurat computed cluster level (lower panel). Mann-Whitney test. ***p<.001, ****p<.0001.

(B) Sixteen genes comprising a novel OAsIs resistance score (MCL_R16) based on the top genes of the sign_clust5 signature.

(C) The MCL_R16 score was computed at Seurat-computed cluster level in MCL34 and MCL12 at the time of inclusion. Mann-Whitney test. ****p<.0001.

(D) Kaplan–Meier analyses of overall survival or progression-free survival (PFS) for the MCL_R16, cell-cycle, BCR, and NFkB signatures. Probabilities were calculated on 122 MCL patients treated with R-CHOP (GSE93291) or on 99 MCL patients included in the LYMA cohort (LYMA_RNA-seq) respectively. Black curve: low score, red curve: high score. Log-Rank test.

Fig. 4. Identification of BCL2A1 as a resistance factor to OAsIs combination

(A) scRNA-seq analysis of *BCL2A1* gene expression at inclusion (incl.) or relapse (Rel) in all OAsIs samples available (left panel) or longitudinal samples from patient MCL34. Each dot represents a cell. Wilcoxon-sign-rank test. ****p<.0001.

(B) Bulk RNA-seq analysis of *BCL2A1* gene expression in peripheral blood MCL cells (PB, n=63) or MCL cell lines (n=7).

(C) BCL2A1 protein expression in primary PB MCL cells (n=8), Maver, and NTS3 cell lines, and in OAsIs samples (MCL 24 and MCL36) was evaluated by immunoblot.

(D) Survival of Mino_ct and Mino_A1 (Extended Data Fig. S4) treated with single-agent Venetoclax at indicated doses or with OAsIs combination (Ibrutinib, 500 nM; Obinutuzumab 500 ng/ml) for 48h. Cell viability was measured by the lack of Annexin-V staining. ANOVA test. ****p<.0001. The mean and SD of three independent experiments are represented.

(E) BCL2A1 specific BH3-profiling was performed using the selective peptide FS2 (20 μ M) in venetoclax-sensitive Mino cells (left panel) and venetoclax-resistant SP53 cells (right panel). Mino cells were pretreated or not with Venetoclax at indicated doses. SP53 cells were pretreated or not with Venetoclax at indicated doses. SP53 cells were pretreated or not with Venetoclax (VNT, 500 nM), S63845 (S63, 500 nM) and A1155463 (A11, 500 nM) for 6h before cytochrome-C release measurement. ANOVA test. ***p<.001. The mean and SD of three independent experiments are represented.

Fig. 5. BCR-dependent expression of BCL2A1 in MCL

(A) Correlation between BCR signature and *BCL2A1* gene expression in peripheral blood (PB) MCL cells (n=63) and MCL cell lines (n=7). Spearman r and p-value are indicated on the graph.

(B) *BCL2A1* expression in PB MCL cells (n=3), and MCL cell lines (MAVER-1, UPN1) treated or not for 3h with algM (10µg/ml). paired t-test. *p<.05.

(C) BCL2A1 protein expression in MCL primary cells (n=6) and NTS3 cell line treated or not for 3h with algM (10μg/ml) was assessed by immunoblot.

(D) *CD83, BCL2A1, BCL2, MCL1* and *BCLXL* gene expression in BCL2A1 positive MCL cell lines (SP53, NTS3, REC1, Mino) treated for 24h with Ibrutinib (500 nM) was evaluated by bulk RNA-sequencing. ANOVA test. **p<.01, *p<.05

(E) Synergy score (HSA method) computed for 6 MCL cell lines treated with venetoclax and ibrutinib for 48h. Unpaired t-test. *p<.05. Detailed results are represented in Extended Data Fig. S5C. The mean and SD of three independent experiments are represented.

Fig. 6. BCR-independent expression of BCL2A1 in CARD11 mutated cells.

(A) B-cell receptor (BCR) signaling triggers the NFkB1 pathway through the activation of several proteins such as BTK, which can be inhibited by ibrutinib, and complexes such as CARD11/BCL10/MALT1 (CBM). Several previously described CBM substrates are mentioned including HOIL1, which is used in the following experiments as a marker of CBM activity.

(B) NFkB luciferase assay (left panel) and *BCL2A1* promoter LightSwitch[™] luciferase assay (right panel) in HEK293 cells transfected with a pUNO1 (empty), pUNO1-hCARD11-WT, pUNO1-hCARD11-G123S or pUNO1-hCARD11-G123D vector (48h). 2way ANOVA. ****p<.0001, ***p<.001, **p<.01, *p<.05. The mean and SD of three independent experiments are represented.

(C) *BCL2A1* gene expression was measured by RT-qPCR in CARD11^{WT} MCL (SP53, NTS3, and REC1) and DLBCL (U2932) cell lines and CARD11^{MUT} MCL cells (001-024, DFBL) and DLBCL (OCILY3, SUDHL16) cell lines treated with ibrutinib (500 nM) for 6h. Detailed CARD11 mutational status is described in Extended Data Table S4. Mann-Whitney test. *p < 0.05.

Fig. 7 Identification of MALT1 as a target to overcome OAsIs resistance

(A-B) RNA-seq expression of the 16 genes of the MCL_R16 resistance signature in BCL2A1⁺ CARD11^{WT} cell lines (SP53, NTS3, REC1) and BCL2A1⁺ CARD11^{MUT} cells (001-024, OCILY3, SUDHL16) treated 24h with the BTK inhibitor Ibrutinib (500 nM) (A) or the MALT1 inhibitor MLT-748 (1 μM) (B). Mann-Whitney test. ****p<.0001. n.s.: not significant. *BCL2A1* (*A1*) is shown in red. Genes from bottom to top: *CCL4, FABP5, CCL3, BCL2A1, CCL22, NPW, NME1, PTP4A3, PLEK, CD83, SRM, CALR, PA2G4, NCL, SDF2L1, DDX21*.

(C-D) CARD11, HOIL1, and BCL2A1 protein expression were assessed by immunoblot in indicated cells treated or not with the BTK inhibitor ibrutinib (500 nM) or the MALT1 inhibitor MLT-748 (1 μ M) for 24h. The arrow highlights cleaved form of HOIL1.

(E) Synergy score (HSA method) computed for 5 cell lines treated with venetoclax and MLT-748 for 48h. Unpaired t-test. *p<.05. Detailed results are represented in Extended Data Fig.
S7B. The mean and SD of three independent experiments are represented.

Fig. 8 In vivo efficacy of MALT1/BCL2 dual targeting in CARD11 mutated MCL cells

(A) Schematic representation of the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) experimental design.

(B) Tumor weights at day 16 for CARD11^{D230N} MCL PDX (DFBL44685-v2) treated with the BCL2-i venetoclax (2 nM), the MALT1-i JNJ-67856633 (250-500 nM) or both. Mann-Whitney test. **p<.01. n.s.: not significant.

(C) Representative pictures of engrafted tumors in CAM at day 16.

References

1. Campo E, Rule S. Mantle cell lymphoma: evolving management strategies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;125(1):48-55.

2. Castellino A, Wang Y, Larson MC, et al. Evolving frontline immunochemotherapy for mantle cell lymphoma and the impact on survival outcomes. *Blood advances*. 2022;6(4):1350-1360.

3. Eyre TA, Cheah CY, Wang ML. Therapeutic options for relapsed/refractory mantle cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2022;139(5):666-677.

4. Le Bris Y, Magrangeas F, Moreau A, et al. Whole genome copy number analysis in search of new prognostic biomarkers in first line treatment of mantle cell lymphoma. A study by the LYSA group. *Hematological Oncology*. 2020;38(4):446-455.

5. Saleh K, Cheminant M, Chiron D, Burroni B, Ribrag V, Sarkozy C. Tumor Microenvironment and Immunotherapy-Based Approaches in Mantle Cell Lymphoma. *Cancers*. 2022;14(13):3229.

6. Yi S, Yan Y, Jin M, et al. Genomic and transcriptomic profiling reveals distinct molecular subsets associated with outcomes in mantle cell lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*. 2022;132(3).

7. Prevodnik VK, Lavrenčak J, Horvat M, Novakovič BJ. The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas. *Diagnostic pathology*. 2011;6(1):1-6.

8. Tessoulin B, Papin A, Gomez-Bougie P, et al. BCL2-family dysregulation in B-cell malignancies: from gene expression regulation to a targeted therapy biomarker. *Frontiers in oncology*. 2019;8:645.

9. 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, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;122(14):2412-2424.

10. 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(8):826.

11. Wang ML, Rule S, Martin P, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(6):507-516.

Le Gouill S, Thieblemont C, Oberic L, et al. Rituximab after autologous stem-cell transplantation in mantle-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(13):1250-1260.
 Wang ML, Jurczak W, Jerkeman M, et al. Ibrutinib plus Bendamustine and Rituximab in Untreated Mantle-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2022.

14. Eyre TA, Walter HS, Iyengar S, et al. Efficacy of venetoclax monotherapy in patients with relapsed, refractory mantle cell lymphoma after Bruton tyrosine kinase inhibitor therapy. *Haematologica*. 2019;104(2):e68.

15. Martin P, Maddocks K, Leonard JP, et al. Postibrutinib outcomes in patients with mantle cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016;127(12):1559-1563.

16. Zhao X, Ren Y, Lawlor M, et al. BCL2 amplicon loss and transcriptional remodeling drives ABT-199 resistance in B cell lymphoma models. *Cancer Cell*. 2019;35(5):752-766. e759.

17. Chiron D, Bellanger C, Papin A, et al. Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016;128(24):2808-2818.

18. Thus YJ, Eldering E, Kater AP, Spaargaren M. Tipping the balance: toward rational combination therapies to overcome venetoclax resistance in mantle cell lymphoma. *Leukemia*. 2022:1-12.

19. 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 LymphomaOverriding Relapse-Specific BTK Mutation in MCL. *Cancer discovery*. 2014;4(9):1022-1035.

20. Ondrisova L, Mraz M. Genetic and non-genetic mechanisms of resistance to BCR signaling inhibitors in B cell malignancies. *Frontiers in oncology*. 2020;10:591577.

21. Zhang L, Yao Y, Zhang S, et al. Metabolic reprogramming toward oxidative phosphorylation identifies a therapeutic target for mantle cell lymphoma. *Science translational medicine*. 2019;11(491):eaau1167.

22. Chiron D, Dousset C, Brosseau C, et al. Biological rational 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.

23. Le Gouill S, Morschhauser F, Chiron D, et al. Ibrutinib, obinutuzumab, and venetoclax in relapsed and untreated patients with mantle cell lymphoma: a phase 1/2 trial. *Blood*. 2021;137(7):877-887.

24. Jenson JM, Ryan JA, Grant RA, Letai A, Keating AE. Epistatic mutations in PUMA BH3 drive an alternate binding mode to potently and selectively inhibit anti-apoptotic Bfl-1. *Elife*. 2017;6:e25541.

25. Bidère N, Ngo VN, Lee J, et al. Casein kinase 1α governs antigen-receptor-induced NF- κ B activation and human lymphoma cell survival. *Nature*. 2009;458(7234):92-96.

26. Decombis S, Papin A, Bellanger C, et al. The IL32/BAFF axis supports prosurvival dialogs in the lymphoma ecosystem and is disrupted by NIK inhibition. *Haematologica*. 2022.

27. Brohl AS, Stinson JR, Su HC, et al. Germline CARD11 mutation in a patient with severe congenital B cell lymphocytosis. *Journal of clinical immunology*. 2015;35(1):32-46.

28. Snow AL, Xiao W, Stinson JR, et al. Congenital B cell lymphocytosis explained by novel germline CARD11 mutations. *Journal of Experimental Medicine*. 2012;209(12):2247-2261.

29. Takeuchi M, Rothe M, Goeddel DV. Anatomy of TRAF2: distinct domains for nuclear factorκB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(33):19935-19942.

30. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*. 2008;319(5870):1676-1679.

31. Caeser R, Walker I, Gao J, et al. Acquired CARD11 mutation promotes BCR independence in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *JCO precision oncology*. 2021;5.

32. Rahal R, Frick M, Romero R, et al. Pharmacological and genomic profiling identifies NF- κ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nature medicine*. 2014;20(1):87-92.

33. Saba NS, Liu D, Herman SE, et al. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF-κB activation in mantle cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016;128(1):82-92.

34. Rauert-Wunderlich H, Rudelius M, Berberich I, Rosenwald A. CD40L mediated alternative NFκB-signaling induces resistance to BCR-inhibitors in patients with mantle cell lymphoma. *Cell death & disease*. 2018;9(2):1-9.

35. Esteve-Arenys A, Garcia-Valero J, Gonzalez D, et al. Pharmacological downregulation of BFL-1 by the BET bromodomain inhibitor CPI203 overcomes ABT-199 resistance in MYC+/BCL2+ double hit lymphoma. *Cancer Research*. 2017;77(13 Supplement):2161-2161.

36. Haselager MV, Kielbassa K, Ter Burg J, et al. Changes in Bcl-2 members after ibrutinib or venetoclax uncover functional hierarchy in determining resistance to venetoclax in CLL. *Blood*. 2020;136(25):2918-2926.

37. Zhang H, Nakauchi Y, Köhnke T, et al. Integrated analysis of patient samples identifies biomarkers for venetoclax efficacy and combination strategies in acute myeloid leukemia. *Nature cancer*. 2020;1(8):826-839.

38. Prazma CM, Yazawa N, Fujimoto Y, Fujimoto M, Tedder TF. CD83 expression is a sensitive marker of activation required for B cell and CD4+ T cell longevity in vivo. *The Journal of Immunology*. 2007;179(7):4550-4562.

39. Seshadri MR, Melnick AM. Targeting MALT1 for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*. 2022;63(4):789-798.

40. Quancard J, Klein T, Fung S-Y, et al. An allosteric MALT1 inhibitor is a molecular corrector rescuing function in an immunodeficient patient. *Nature chemical biology*. 2019;15(3):304-313.

41. Philippar U, Lu T, Vloemans N, et al. Discovery of JNJ-67856633: A novel, first-in-class MALT1 protease inhibitor for the treatment of B cell lymphomas. *Cancer Research*. 2020;80(16_Supplement):5690-5690.

42. Miebach L, Berner J, Bekeschus S. In ovo model in cancer research and tumor immunology. *Frontiers in Immunology*. 2022:5793.

43. Dobrovolsky D, Wang ES, Morrow S, et al. Bruton tyrosine kinase degradation as a therapeutic strategy for cancer. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2019;133(9):952-961.

44. Agarwal R, Chan Y-C, Tam CS, et al. Dynamic molecular monitoring reveals that SWI–SNF mutations mediate resistance to ibrutinib plus venetoclax in mantle cell lymphoma. *Nature Medicine*. 2019;25(1):119-129.

45. Tam CS, Anderson MA, Pott C, et al. Ibrutinib plus venetoclax for the treatment of mantlecell lymphoma. *New England journal of medicine*. 2018;378(13):1211-1223.

46. Jain P, Wang ML. Mantle cell lymphoma in 2022—A comprehensive update on molecular pathogenesis, risk stratification, clinical approach, and current and novel treatments. *American journal of hematology*. 2022;97(5):638-656.

47. Phillips T, Dickinson M, Morschhauser F, et al. Glofitamab Step-up Dosing Induces High Response Rates in Patients (pts) with Relapsed or Refractory (R/R) Mantle Cell Lymphoma (MCL), Most of Whom Had Failed Prior Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor (BTKi) Therapy. *Blood.* 2021;138:130.

48. van der Horst HJ, de Jonge AV, Hiemstra IH, et al. Epcoritamab induces potent anti-tumor activity against malignant B-cells from patients with DLBCL, FL and MCL, irrespective of prior CD20 monoclonal antibody treatment. *Blood cancer journal*. 2021;11(2):1-8.

49. Balaji S, Ahmed M, Lorence E, Yan F, Nomie K, Wang M. NF-κB signaling and its relevance to the treatment of mantle cell lymphoma. *Journal of hematology & oncology*. 2018;11(1):1-11.

50. Shaffer AL, Phelan JD, Wang JQ, et al. Overcoming Acquired Epigenetic Resistance to BTK Inhibitors Overcoming Acquired Epigenetic Resistance to BTK Inhibitors. *Blood cancer discovery*. 2021;2(6):630-647.

51. Ma MCJ, Tadros S, Bouska A, et al. Subtype-specific and co-occurring genetic alterations in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Haematologica*. 2022;107(3):690.

52. Bartlett NL, Costello BA, LaPlant BR, et al. Single-agent ibrutinib in relapsed or refractory follicular lymphoma: a phase 2 consortium trial. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2018;131(2):182-190.

53. Meitlis I, Allenspach EJ, Bauman BM, et al. Multiplexed functional assessment of genetic variants in CARD11. *The American Journal of Human Genetics*. 2020;107(6):1029-1043.

54. Reimann M, Schrezenmeier J, Richter-Pechanska P, et al. Adaptive T-cell immunity controls senescence-prone MyD88-or CARD11-mutant B-cell lymphomas. *Blood*. 2021;137(20):2785-2799.

55. Papin A, Tessoulin B, Bellanger C, et al. CSF1R and BTK inhibitions as novel strategies to disrupt the dialog between mantle cell lymphoma and macrophages. *Leukemia*. 2019;33(10):2442-2453.

56. Dai B, Grau M, Juilland M, et al. B-cell receptor-driven MALT1 activity regulates MYC signaling in mantle cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* 2017;129(3):333-346.

57. Pieters T, T'Sas S, Vanhee S, et al. Cyclin D2 overexpression drives B1a-derived MCL-like lymphoma in mice. *Journal of Experimental Medicine*. 2021;218(10):e20202280.

58. Fontan L, Hatcher J, Scott D, et al. Chemically Induced Degradation of MALT1 to Treat B-Cell Lymphomas. *Blood*. 2019;134:2073.

59. Bertram K, Leary PJ, Boudesco C, et al. Inhibitors of Bcl-2 and Bruton's tyrosine kinase synergize to abrogate diffuse large B-cell lymphoma growth in vitro and in orthotopic xenotransplantation models. *Leukemia*. 2022;36(4):1035-1047.

Supplemental Figure Legend

Figure S1 Longitudinal scRNA-seq of samples from a patient included in OAsIs trial

(A-B) UMAP plots of the cells from patient MCL34 at OAsIs inclusion (left) and at OAsIs relapse (right), displaying (A) cells that passed the QC at inclusion (green) and relapse (pink); and (B) *BTK*, *MS4A1* (CD20) and *BCL2* gene expression. Each dot represents a single cell. (C) Alluvial plot showing the distribution of single-cells clusters, as defined in Figure 2B, before and after cell-cycle inference. (D) Hierarchical clustering of the clusters after cell cycle inference as defined in panel C. Cluster #1 and #2 were exclusively found at inclusion, cluster #6 and #7 at relapse, cluster #5 in both samples.

Figure S2 scRNA-seq characterization of samples from MCL patients enrolled in OAsIs

(A) Schematic representation of the response duration for the patients MCL36, MCL39, MCL12, MCL34, MCL10 and MCL24. CR: complete response, PR: partial response, PD: progression disease. The triangles-represent sample collection time at inclusion (blue) or at relapse (orange). (B) UMAP plots representing the clusters identified by Seurat at the single-cell level for samples from patients enrolled in OAsIs.

(C-D) Violin plots representing *BTK*, *MS4A1* (CD20) and *BCL2* gene expression (C) and the signature score of the cell cycle (D) in the clusters defined in panel B.

Figure S3 Design of a 16 genes OAsIs resistant signature

(A) UMAP plot representing the clusters identified by Seurat at the single-cell level after cell cycle regression (upper panels) and violin plot showing the signature score of the cell cycle in the clusters for each patient (lower panels).

(B) Violin plots representing the score of the OAsIs-resistant cluster #5 signature (sign_clust5) for each clusters analyzed by scRNA-sequencing.

(C) sign_clust5 or MCL_R16 scores at inclusion (incl.) and at relapse (Rel) for the patient MCL34 analyzed by scRNA-seq. Mann-Whitney test, **** p<0.0001.

(D) Venn diagram representing genes overlapping in MCL_R16, NIK, Cell cycle, NFkB and BCR signatures.

(E) Correlation between MCL_R16 and NFKB, BCR and NIK signatures for MCL cell lines (n=10), peripheral blood MCL cells (n=77) and lymph nodes MCL cells (n=107). Each value represents Pearson r correlation.

(F) Signature score of MCL_R16 in peripheral blood MCL cells MCL (PB, n=77) or lymph nodes (LN, n=107) analyzed by Gene Expression Profiling. Mann-Whitney test. ****p<.0001.

Figure S4 BCL2A1 is involved in MCL cell resistance to targeted therapies

(A) BCL2A1 median level in 6 OAsIs samples analyzed by scRNA-sequencing.

(B) UMAP plot representing the clusters identified by Seurat after cell-cycle regression as well as *BCL2A1* expression at inclusion (incl.) and at relapse (Rel) for the patient MCL34 and at inclusion (incl.) for the patient MCL12. *BCL2A1*^{high} clusters are highlighted in the UMAP.

(C) *BCL2A1* gene and protein expressions were measured by RNA-sequencing and immunoblot respectively in 7 MCL cell lines. Immunoblot quantification was performed using imageJ software.

(D) BCL2A1 and mCherry-BCL2A1 protein expression in Mino cells stably transfected (Mino_A1) or not (Mino_Ct) with a mCherry-BCL2A1 plasmid. NTS3 was used as a positive control.

(E) Survival of Mino_ct, Mino_A1 and peripheral blood MCL cells from patients MCL7, MCL12 and MCL10 treated with Venetoclax (10 nM) with or without Ibrutinib (500 nM) and Obinutuzumab (500 ng/ml) *in vitro* for 24h. The percentage of live cells was defined through AnnexinV staining.

(F) Schematic representation of how BCL2A1 mediates resistance to BH3-mimetics in both venetoclax sensitive (Mino) and resistant (SP53) MCL cells, based on the results obtained with BH3-profiling (Figure 4E).

(G) Bcl2A1 protein expression in Mino cells treated with venetoclax (VNT) at indicated concentrations for 6h and evaluated by immunoblotting.

Figure S5 BTK dependent regulation of BCL2A1 in MCL

(A) Correlation between NFkB, NIK or cell-cycle signatures and *BCL2A1* gene expression from primary MCL cells (n=63) and MCL cell lines (n=7) and measured by bulk RNA-sequencing. Spearman r and p value are indicated on the graph.

B) BCL2A1 protein expression in SP53 treated or not with ibrutinib (500 nM) for 24h was evaluated by immunoblot.

(C) Computation of the synergy score (HSA method) for 4 MCL cell lines treated with venetoclax and ibrutinib at indicated doses for 48h.

Figure S6 CBM/NFKB1 dependent regulation of BCL2A1 in CARD11^{MUT} cells

(A) CARD11, HOIL1 and BCL2A1 protein expression in MCL cell lines (left panel; n=7) and primary MCL cells (right panel; n=4) by immunoblot.

(B) CARD11, CYLD and HOIL1 protein expression in HEK293 cells transfected with or without pUNO1 (empty), pUNO1-hCARD11-WT, pUNO1-hCARD11-G123S or pUNO1-hCARD11-G123D vector was evaluated by immunoblotting.

(C) NFkB luciferase activity in HEK293 cells transfected with an empty vector (pUNO1 or pcDNA3), pUNO1-hCARD11-WT, pUNO1-hCARD11-G123S, pcDNA3-hCARD11-WT or pcDNA3-hCARD11-D230N vector and treated or not with MLT-748 (2 μ M) or JNJ-67856633 (2 μ M) for 48h. 2way ANOVA. **p<.01, *p<.05.

(D) *CARD11, BCL10 and MALT1* gene expression in peripheral blood MCL cells (n=63) and normal B cells (NBC, n=6) was evaluated by bulk RNA-sequencing. Mann-Whitney test. *p<.05.

(E) BCL2A1 luciferase activity in HEK293 cells transfected with an empty pUNO1 vector, pUNO1-hCARD11-WT or pUNO1-hCARD11-G123S vector and treated or not with MLT-748
(2 μM) or JNJ-67856633 (2 μM) during 48h was measured by LightSwitch Luminescence.
2way ANOVA. **p<0.01.

Figure S7 MALT1 targeting lower BCL2A1 and synergizes with BCL2 inhibitor

irrespective or CARD11 mutational status

(A) *BCL2A1* gene expression was measured by RT-qPCR in indicated cells treated or not with the MALT1 inhibitor MLT-748 (1 μ M) for 24h. The mean and SD of at least two independent experiments performed in duplicate are represented. Mann-Whitney test. n.s. not significant.

(B) *BCL2A1* gene expression in NTS3 and SUHDL16 treated or not with MLT-748 (1 μ M) or JNJ-67856633 (1 μ M) for 24h was evaluated by RT-qPCR.

(C) Computation of the synergy score (HSA method) for 2 BCL2A1⁺ CARD11^{WT} MCL cell lines (NTS3, SP53) and DLBCL CARD11^{MUT} (n=2) treated with Venetoclax and MLT-748 at indicated doses for 24h.

<u>Figure S8</u> *In ovo* and *in vivo* evaluation of the MALT1/BCL2 targeted combination in CARD11^{MUT} MCL cells

(A) TP53 and CARD11 mutational status of the DFBL44685v2 MCL PDX

(B) BCL2A1 expression in DFBL44685v2 compared to MCL cell lines was evaluated by RTqPCR

(C) Schematic representation of the CAM in ovo model used in Figure 8

(D) *In vivo* treatment schedules: the MALT1-i JNJ-67856633 was dosed at 40 mg/kg/day days 1-2-4-5 of a 7 day cycle; the BCL2-i venetoclax was dosed at 30 mg/kg/day days 2-4-5 of a 7 day cycle. Both compounds were given orally for two cycles.

(E) Evaluation of MALT1/BCL2 targeted combination efficacy *in vivo* using a disseminated MCL PDX model. Peripheral blood MCL cell percentage was determined by flow cytometry (huCD45) after 10 and 15 days of treatment.

Supplemental Methods

Whole transcriptome sequencing

3'seq-RNA Profiling protocol was performed according to Charpentier et al.¹ The mRNA poly(A) tails are tagged with universal adapters, well-specific barcodes and unique molecular identifiers (UMIs) during template-switching reverse transcriptase. Barcoded cDNAs from multiple samples are then pooled, amplified and tagmented using a transposonfragmentation approach, which enriches for 3'ends of cDNA. A library of 350-800 bp length is run on an Illumina NovaSeq 6000 using NovaSeq 6000 SP Reagent Kit 100 cycles (ref #20027464). Raw fastq pairs used for analysis matched the following criteria: the 16 bases of the first read correspond to 6 bases for a designed well-specific barcode and 10 bases for a unique molecular identifier (UMI). The second read (58 bases) corresponds to the captured poly(A) RNAs sequence. We perform demultiplexing of these fastq pairs according to the samplesheet to generate one single-end fastq for all samples. These fastq files are then aligned with bwa to the reference mRNA sequences and the mitochondrial genomic sequence, both available from the UCSC download site. DGE profiles are generated by parsing the alignment files (.bam) and counting for each sample the number of unique UMIs associated with each RefSeq genes. Reads aligned on multiple genes, containing more than one mismatch with the reference sequence or reads containing a polyA pattern are discarded. Finally, a matrix containing the expression of all genes on all samples is produced. The expression values, corresponding to the absolute abundance of mRNAs in all samples, is then ready for further gene expression analysis. DESeg2 is used to normalize expression with the DESeq. Normalized counts are transformed with vst (variance stabilized transformation) function from DESeq library.

Deep DNA sequencing

DNAs were extracted using the Maxwell® RSC Blood DNA Kit from Promega. The design covered 172.560 kbp using 1438 capture xGen® Lockdown Probes produced by Integrated

DNA Technologies IDT® (Coralville, IA). IDT libraries of fragments were built with TruSeq[™] Compatible Duplex Y Adapter containing dual UDI-UMI paired-end sequencing in 300 cycles was performed on Miseq Illumina® (San Diego, CA). Bioinformatics analysis of single nucleotide variants (SNVs) was performed using UMI-Var caller pipeline as described previously23. Average and standard deviation coverage depth were 1333X and 664X respectively among the samples sequenced. Interpretation of SNVs was performed with the gnomAD, COSMIC, IARC TP53, and ClinVar databases or with in silico prediction software (CADD, SIFT, MutationTaster, FATHMM) when no data were available. Copy number variation (CNV) detection was performed using the mCNA caller tool on the R interface24. Detailed results are shown in Supplemental Table S2.

Single-cell RNA-sequencing.

Raw sequence filtering, normalization, and clustering

The raw sequencing data were preprocessed (demultiplexed cellular barcodes, read alignment, and generation of gene count matrix) using Cell Ranger Single Cell Software Suite provided by 10X Genomics. The UMI count matrix was imported into R package Seurat version 3.2.2 for data processing with R version 3.6.1. The SoupX (version 1.4.8) package was used to remove cell-free mRNA contamination. Cells were then filtered based on quality controls (QC), which included several metrics such as percentage of HBB, percentage of mitochondrial genes, number of unique genes detected in each cell, and total number of molecules detected within a cell. Non-tumoral cells were identified and removed using the CCND1 marker as well as an MCL signature (Supplemental Table S5). Ultimately, 36788 single MCL cells passed the QC with a median of 4954 cells per sample and an average of 12930 reads per cell. Finally, the data were normalized with the 'sctransform' function.

Dimensional reduction and unsupervised clustering

For each sample, 2,000 highly variable features were selected using the 'FindVariableFeatures' function of Seurat (default settings). We next performed linear

dimensional reduction (PCA) and clustered the cells with the 'FindNeighbors' and 'FindClusters' functions and visualized using the 'RunUMAP' function. We identified cluster biomarkers using the Seurat 'FindMakers' function. Specific cluster markers were determined for each cluster against all remaining cells with the 'FindAllMarkers' function. The 'clusterProfiler' and 'ReactomePA' packages were used in R for functional enrichment analysis. Heatmap was carried out with 'theComplexHeatmap' package. A phylogenetic tree relating the 'average' cell from each identity class was built with the function 'BuildClusterTree' of Seurat and visualized with the package 'ggtree' (version 2.4.2). Monocle2 (version 2.18.0) was run with default parameters on the 2000 highly variable features identified by Seurat.

Signatures and inference

Signature scores for scRNA-seq data were computed with the 'AddModuleScore' function of Seurat. Regarding bulk RNA-seq and GEP, signature scores were calculated with singscore package in R. The gene lists of the signatures are detailed in Supplemental Table S5. BCR, NF κ B1, and NIK/NF κ B2 signatures were adapted from SABA et al.² and cell-cycle signature from Scott et al.³

To mitigate the effects of cell-cycle on the data, a score was calculated based on its expression of G2/M and S phase markers and assigned to each cell ('CellCycleScoring' function in Seurat). These cell cycle scores were regressed out during data scaling with the argument 'var.to.regress'.

Cell culture and functional assays

Cell lines

MINO, REC-1, MAVER-1, OCILY3, SUDHL16 and U2932 were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany) and Z138 from ATCC (Manassas, USA). UPN1 and SP53 were kindly provided by Prof. V. Ribrag (Institut Gustave Roussy Villejuif, France) and Prof. S. Chen-Kiang (Cornell University, NY), respectively. NTS3 cell line has been generated in our

laboratory (characterized by GEP, GSE86322)⁴. DFBL-44685-v2 CARD11 mutated PDX MCL cells were purchased from the Dana Farber Cancer Institute (Boston, USA). HEK293 cells were purchased from the ATCC (CRL-1573). Cell lines are routinely identified using a flow cytometry-based barcode as well as MHC class I sequencing⁵.

BCL2A1 overexpression

The *BCL2A1* gene was synthesized and incorporated in the plasmid pmCherry-C1 (Addgene). MINO cell line was electroporated using a Nucleofector system (Amaxa) according to the manufacturer's instructions. Three days after electroporation, mcherry-positive cells were selected by flow cytometry. The over-expression of *BCL2A1* in Mino_A1 was validated by immunoblot analysis.

Drug testing and calculation of the synergy score

Cell lines were treated with Ibrutinib (0,5-500 nM) or MLT-748 (0,25-2 μ M) in combination with venetoclax (0,5-2,5 μ M) and viability assays (Annexin-V staining) were performed 24 to 48h after treatment. The synergy score (HSA) was calculated using 'SynergyFinder' website.

In vivo PDX mouse model

Six to eight-week-old NSG mice (n=20, Charles River) were used for the study. An acclimation period of 5 days was observed before the injection of the cells. The study was conducted within the UTE (Unité Thérapeutique Expérimentale) animal core facility of IRS-UN (C44-278 certification renewed on December 17, 2015) (8 quai Moncousu, 44007 Nantes). Temperature: $22 \pm 3 °$ C, day / night cycle: 12 h/12 h. The mice were housed 5 per cage and identified by ear marking. The mice had free access to water ad libitum, standard A04 (Safe) irradiated food. The study was carried out by Charlotte Kervoëlen (PhD, Holder of the animal testing school diploma: design and implementation of experimental procedures, provided by the Nantes national veterinary and agri-food school and issued by the French

Ministry of Agriculture, Agri-Food and Forestry). Animal study was approved by Ethics Committee of Pays de la Loire, France (review CEEA.2010.49) and the French Ministry of Higher Education and Research and supported by the animal welfare structure of the UTE animal core facility of IRS-UN.

2x10⁶ of DFBL-44685-v2 MCL cells in 100 µL PBS were injected intravenously into the tail vein of mice 4 hours after irradiation. At day 14 and 19 post-injection, blood sample from each mouse was taken by tail vein puncture in heparin tube and the percentage of MCL PDX cells in peripheral blood was measured after human CD45 staining by flow cytometry analysis.

The BCL2-i venetoclax (InVivoChem) and the MALT-i inhibitor (MedChemTronica) were formulated extemporaneously and protected from light in 5% DMSO (Cell Signaling, ref: 12611S) / 50% polyethylene glycol300 (Sigma, ref: 8.07484) / 5% Tween80 / 40%ddH2O. After randomization (5 mice per group), mice were treated according to the conditions detailed above for two weeks. Mice were weighed once a day each day of treatment to determine the amount of compound to be administered.

The first and most important criteria throughout the study was the animals' health: Any mouse risking to drop 20% of body weight or showing any clinical signs indicating that the animal is not in good health (abnormal behavior, breathing difficulties, coat appearance, etc) was removed from the study. Mice were sacrificed by cervical translocation.

Statistical analysis was done using GraphPad Prism. Comparisons were made using a oneway ANOVA test and significant difference was defined as p < 0.05 (*), p < 0.01 (**). Data are shown as mean +/- SEM.

Supplemental Reference

1. Charpentier E, Cornec M, Dumont S, et al. 3'RNA sequencing for robust and low-cost gene expression profiling. 2021.

2. Saba NS, Liu D, Herman SE, et al. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF-κB activation in mantle cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016;128(1):82-92.

3. Scott DW, Abrisqueta P, Wright GW, et al. New molecular assay for the proliferation signature in mantle cell lymphoma applicable to formalin-fixed paraffin-embedded biopsies. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15):1668.

4. Chiron D, Bellanger C, Papin A, et al. Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2016;128(24):2808-2818.

5. Maïga 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 Part A*. 2015;87(4):285-288.







Figure 3









Figure 5



Figure 6





OCILY3-SUDHL16-

Figure 7


A CARD11^{D230N} MCL PDX in ovo









Figure S2







Е MCL_R16 Pearson r MCL Lines PB MCL LN MCL **p<0.01** n=10 n=77 0.54 0.554 sign_NFkB sign_BCR sign_NIK 0.922 0.034 -0.138



n=107 **0.526**

0.498

-0.044

F







BCL2A1+

BCL2A1-









Figure S6



А	Sample	Gene	Nucleotide change	AA change		snv_VAF (%)
	DFBL-44685-V2	CARD11	c.688G>A	Asp230Asn	D230N	63
		TP53	c.742C>T	Arg248Trp	R248W	100





Figure S8

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux réalisés au cours de mes trois années de thèse apportent de nouveaux éléments concernant la compréhension biologique du LCM et l'importance du microenvironnement immunitaire dans le soutien de la survie, la prolifération et la chimiorésistance des cellules tumorales. Nous avons également de nouvelles données concernant les mécanismes de résistances des cellules tumorales à la thérapie. Ces nouvelles connaissances sur les dialogues qui s'opèrent entre les cellules de LCM et les cellules immunitaires ainsi que les mécanismes de résistance permettent d'apporter un rationnel biologique pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques en ciblant les cellules tumorales au sein de leur écosystème.

Notre équipe a précédemment mis en évidence l'existence d'un dialogue entre les cellules de LCM et les lymphocytes T par l'intermédiaire de l'interaction CD40-CD40L (potentialisé par les cytokines IL-6, IL-10, IGF-1 et BAFF) activant ainsi la voie NFkB dans les cellules tumorales. Ces données ont permis d'élaborer un nouveau modèle *ex vivo* 2D « CD40L + Ck » afin de permettre la culture et l'expansion des cellules primaires de LCM (Chiron et al., 2016). Au cours de ma thèse, nous avons mis en évidence que ce modèle de coculture reproduit 70% des modulations transcriptomiques retrouvées au sein des ganglions de patients atteints de LCM validant ainsi la pertinence de ce modèle. Ce modèle récapitule plusieurs signatures « BCR », « NFkB » et « NIK » préalablement décrites. L'activation de ces voies de signalisation est connue pour être restreintes aux cellules tumorales présentent dans les ganglions contrairement aux cellules circulantes témoignant ainsi d'interactions importantes entre les cellules tumorales et leur écosystème (Saba et al., 2016).

Au cours de cette même étude, nous avons identifié l'*IL32* comme fortement modulé par le microenvironnement de façon tumeur spécifique. Les mécanismes de régulation ainsi que le rôle biologique de la cytokine IL-32 sont actuellement peu documentés. De plus, son récepteur est actuellement inconnu et l'absence d'expression de cette cytokine chez les rongeurs limite considérablement les connaissances sur ses rôles physiologiques. Toutefois, l'expression de l'IL-32 est décrite dans plusieurs cancers solides et semble promouvoir la migration, la prolifération ainsi que la dissémination métastatique des cellules tumorales (Sloot et al., 2018). Cette cytokine possède plusieurs isoformes avec des fonctions différentes et nous avons identifié l'IL-32β, l'isoforme la plus décrite en cancérologie, comme la forme majoritaire présentant un rôle dans l'écosystème du LCM.

Nous avons montré en immunohistochimie multiplex que l'IL-32β est plus exprimée par les cellules tumorales au contact des lymphocytes T que dans les zones exclusives à la tumeur. En effet, l'interaction CD40-CD40L entre les cellules de LCM et les lymphocytes T permet d'activer la voie alterne de NFkB entrainant ainsi une expression et une sécrétion de l'IL-32β par les cellules tumorales. Nous avons observé que l'IL-32β, ne possède pas d'effet direct sur la survie des cellules tumorales mais participe au dialogue soluble des cellules de LCM avec leur microenvironnement immunitaire afin de le remodeler en faveur de la tumeur. Ce rôle paracrine de l'IL-32 a également été décrit dans le myélome multiple. En effet, les cellules tumorales produisent des vésicules extracellulaires contenant de l'IL-32 qui permettent une différenciation des ostéoclastes *in vitro* et *in vivo* contribuant ainsi à la destruction osseuse (Zahoor et al., 2017). Ces données renforcent l'implication de ce facteur soluble dans l'écosystème des hémopathies B.

L'IL-32 peut avoir plusieurs rôles, parfois contradictoires, dans le microenvironnement tumoral. En effet, cette cytokine favorise l'expression de l'IFNy par les lymphocytes T CD8⁺ afin d'augmenter l'activité antitumorale et induit l'expression de FOXP3 par les lymphocytes T CD4⁺ dans le but de supprimer la réponse immunitaire antitumorale (Han et al., 2021). Cette cytokine, décrite pour être préférentiellement exprimée par les lymphocytes Treg, est également impliquée dans certaines réponses immuno-régulatrices par l'induction de l'IL-10 ou de l'Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les macrophages (Kim et al., 2005 ; Zavidij et al., 2020 ; Yan et al., 2019). Notre équipe a récemment identifié que les cellules de LCM dans d'autres hémopathies B (Domagala et al., 2021), un dialogue soluble s'établit au sein ainsi la survie tumorale (Papin et al., 2019). A travers notre étude, nous avons montré par une analyse transcriptomique que l'IL-32^β, sécrétée par les cellules de LCM, participe également à ce dialogue soluble et entraine un remodelage des monocytes et des macrophages en modifiant leur profil transcriptomique. En effet, cette cytokine a la capacité d'induire la production de facteurs solubles pro- (IL-6, OSM, IL-1 α , IL-1 β) et anti-inflammatoires (IL-10, IDO, IL-18, IL-4L1, CCL22) par les monocytes/macrophages. Nous avons découvert que l'IL-32β est probablement impliquée dans le profil spécifique des MφMCL, la plupart de ces l'IL-32β (Mφ32).

Parmi les facteurs solubles induits par l'IL-32β, plusieurs d'entre eux ont été précédemment décrits comme étant impliqués dans l'expansion du LCM tels que l'IL-6, l'IL-10, BAFF ou WNT5A (Baran-Marszak et al., 2010 ; Zhang et al., 2012). Toutefois, nous avons montré que seul BAFF soutient la survie à long terme des cellules primaires de LCM à un niveau similaire

à celui observé avec le surnageant des M\$32 via l'activation de la voie alterne de NFkB. L'implication de cette cytokine dans le soutien de la survie et la chimiorésistance des cellules de LCM dépendante des MSC (cellules souches mésenchymateuses) et de la voie NFkB a été décrit précédemment suggérant un rôle central de ce facteur soluble au sein de la niche tumorale du LCM (Medina et al., 2012). Nous avons montré que la plupart des échantillons de LCM expriment le récepteur à BAFF (BAFFR) dont la stimulation conduit à l'activation de la voie alterne de NFkB. Les mécanismes précis impliqués dans la survie BAFF-dépendantes sont actuellement inconnus et nous n'avons pas observé d'induction significative des membres anti-apoptotiques de la famille BCL2 (BCL2, BCL-XL, MCL1) suite à une stimulation des cellules primaires avec cette cytokine. En effet, seule une augmentation transitoire de BCL2A1 a été détectée. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre les mécanismes de survie dépendants de BAFF. L'étude de la modulation des complexes de la famille BCL2 au niveau mitochondrial ainsi que la caractérisation de l'amorçage (priming) mitochondrial lors de la stimulation des cellules par BAFF représentent des pistes intéressantes pour comprendre les mécanismes de survie du LCM au sein de son écosystème.

Pour contrecarrer l'effet de BAFF dans l'écosystème du LCM, l'utilisation d'agents neutralisant représente une option thérapeutique pour les patients atteints de LCM. Des anticorps neutralisants anti-BAFF (Belimumab) et anti-BAFF-R (VAY-736) sont actuellement disponibles et présentent une activité préclinique intéressante seuls ou en combinaison avec des inhibiteurs de BTK chez des patients atteints d'hémopathies B tels que la LLC **(Tandler et al., 2020 ; McWilliams et al., 2019)**. Ces anticorps neutralisants pourraient représenter une stratégie thérapeutique intéressante pour les patients atteints de LCM présentant une activation de la voie alterne de NFkB.

Une étude menée par l'équipe du Dr Saba en 2016 a mis en évidence l'existence d'une forte expression de la signature « NIK », reflétant l'activité de la voie alternative de NFkB, dans les ganglions des patients atteints de LCM en comparaison aux échantillons provenant du sang périphérique. Ces données suggèrent une implication de la voie alterne de NFkB dans le microenvironnement du LCM **(Saba et al., 2016)**. Au cours de notre étude, nous avons montré l'importance de la voie alterne de NFkB au sein de la triade LCM / Lymphocytes T / macrophages. En effet, nous avons mis en évidence que l'interaction CD40-CD40L conduit à l'activation de la voie alterne de NFkB dans les cellules de LCM entrainant ainsi l'expression et à la sécrétion de l'IL-32β. Au sein du microenvironnement tumoral, ce facteur soluble va entrainer une reprogrammation des macrophages présentant un sécrétome spécifique contenant la cytokine BAFF. En interagissant avec le BAFF-R présent à la surface des cellules tumorales, BAFF va entrainer une activation de la voie alterne de NFkB ayant pour conséquence une survie accrue des cellules tumorales (**Figure 23**). Des études ont

précédemment montré que l'activation de la voie alterne de NFκB peut être la conséquence d'anomalies intrinsèques de plusieurs acteurs clés de la voie tels que *MAP3K14* (codant pour NIK), *TRAF2*, *BIRC3* ou *TRAF3* (Hill et al., 2020 ; Medina et al., 2012). Au cours de ma thèse, j'ai démontré que l'activation de la voie alterne de NFkB peut aussi être la conséquence de dialogues au sein de l'écosystème du LCM.

L'activation constitutive de cette voie est impliquée dans la résistance à l'Ibrutinib dans les lignées cellulaires de LCM, mettant en évidence son rôle dans la résistance du LCM aux thérapies (Rahal et al., 2014). Des inhibiteurs sélectifs de la kinase NIK, activant IKKα qui à son tour induit le clivage de p100 en p52 permettant une activation spécifique de la voie alterne de NFkB, sont en cours de développement préclinique (Brightbill et al., 2018 ; Mondragón et al., 2019). Au cours de notre étude, nous avons confirmé l'efficacité de l'inhibition de NIK pour contrecarrer l'induction d'IL-32β microenvironnement-dépendante ainsi que la survie des cellules de LCM BAFF-dépendante. L'utilisation d'inhibiteur de NIK chez des patients atteints de LCM présentant une activation constitutive de la voie alterne de NFkB représente une stratégie thérapeutique prometteuse. Le développement de molécules ciblant sélectivement les acteurs clés de la voie NFkB alternative, tels que NIK, ainsi que l'évaluation de ces molécules lors d'essais cliniques afin de déterminer leur efficacité thérapeutique sont à présent nécessaires.

Mes travaux ainsi que ceux précédemment menés par l'équipe suggèrent un rôle pro-tumoral au sein de l'écosystème de signaux lymphoïdes T, notamment à travers l'interaction CD40-CD40L, et myéloïdes, à travers l'établissement d'un dialogue soluble. Actuellement, peu d'études documentent la localisation ainsi que les différents phénotypes des lymphocytes T et macrophages retrouvés au sein du microenvironnement tumoral. Une caractérisation phénotypique et architecturale de la niche tumorale est donc nécessaire pour comprendre plus précisément les interactions qui s'y établissent et qui permettent de remodeler le microenvironnement immunitaire en faveur de la survie et prolifération tumorale. Au cours de ma thèse, j'ai entrepris une étude plus précise de l'architecture et des interactions qui s'établissent au sein de l'écosystème du MCL en utilisant une technique d'immunohistochimie multiplex. Nous avons observé que les ganglions des patients atteints de LCM sont très hétérogènes en fonction des zones étudiées au sein d'une même coupe mais également en fonction du sous-type de la pathologie (LCM classique et blastoïde). Nous avons montré que les ganglions atteints de patients de LCM sont majoritairement enrichis de cellules tumorales à proximité de lymphocytes T confirmant l'interaction entre les deux types cellulaires au sein

de l'écosystème. Nous avons également mis en évidence des zones infiltrées par des macrophages qui restent tout de même en quantité inférieure à celle des lymphocytes T dans les zones observées.

Le rôle majeur de l'axe CD40-CD40L a été identifié *ex vivo* par l'équipe et nous avons confirmé la proximité entre les cellules de LCM et les lymphocytes T *in vivo* au cours de nos analyses en immunohistochimie multiplex. Des études récentes ont confirmé l'importance des lymphocytes T dans l'expansion de certaines hémopathies B. En effet, les cellules de LLC prolifèrent lorsqu'elles sont au contact des lymphocytes T CD4⁺ et un faible ratio CD4/CD8 est associé à un mauvais pronostic et à une forte prolifération des cellules de LCM (Vaca et al., 2022 ; Zhang et al., 2016 ; Nygren et al., 2014). Une étude récente met en évidence que des ratios élevés de lymphocytes T CD8⁺ sont associés à une faible survie globale dans les cas de LCM (Esmeray Sönmez et al., 2022). De plus, une augmentation de la concentration en lymphocytes Treg CD4⁺ FOXP3⁺ est observée dans le sang périphérique des patients atteints de LNH et est corrélée à la charge tumorale (Mittal et al., 2008). Nos données ainsi que ces différentes études démontrent l'importance des différentes populations de lymphocytes T dans la niche tumorale et ont orienté notre analyse sur l'étude du microenvironnement lymphoïde ganglionnaire du LCM.

Les lymphocytes T CD8⁺ semblent présenter un rôle important dans l'écosystème du LCM. Des études doivent être menées afin de comprendre comment ces cellules perdent leur fonction cytotoxique au sein de la niche et déterminer si elles présentent un rôle protumoral. Une étude récente menée à Nantes a mis en évidence la présence d'un plus grand nombre de lymphocytes T CD8⁺ chez des cas de LCM plus agressifs associés à une plus forte prolifération dans des ganglions dissociés de patients grâce à une technique de RT-MLPA (Le Bris et al., 2022). La technique de RT-MLPA est réalisée à partir de biopsies de ganglions et permet une analyse totale des populations lymphocytaires infiltrant la tumeur mais également au sein des zones inter-folliculaires. Pour étudier la quantité de lymphocytes T CD8⁺ dans des coupes de ganglions, l'ai utilisé la technique d'immunohistochimie. Nous avons focalisé notre analyse sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ infiltrant les zones tumorales de 5 cas classiques et 5 cas blastoïdes. Nous avons confirmé l'augmentation des lymphocytes T CD8⁺ et nous avons obtenu un ratio CD4/CD8 plus faible pour les cas blastoïdes plus agressifs. Ces résultats préliminaires doivent être confirmés sur plus de cas mais confirment les résultats de l'étude menée par le Dr Yannick Le Bris et soulignent l'importance de cibler les lymphocytes T CD8⁺ notamment dans les cas agressifs très proliférants.

De nouveaux outils immuno-thérapeutiques tels que les anticorps bispécifiques sont actuellement en cours de développement et pourraient permettre de réactiver le système immunitaire afin de contrecarrer les résistances tumorales. Des études récentes ont montré les premiers effets de ces nouveaux outils immunologiques qui s'avèrent prometteurs. En effet, l'Epcoritamab a montré une cytotoxicité des cellules de LCM primaires induite par les lymphocytes T *in vitro* (van der Horst et al., 2021). Un essai clinique de phase 1 visant à étudier l'effet du Glofitamab chez les patients réfractaires ayant reçu des inhibiteurs de BTK a permis d'obtenir un ORR de 83% avec une CR de 65% (Jain and Wang, 2022 ; Phillips et al., 2021). Ce rapprochement entre les cellules de LCM et les lymphocytes T CD8⁺ par des anticorps bispécifiques pourrait permettre une réactivation des fonctions cytotoxiques des lymphocytes T entrainant ainsi la destruction des cellules tumorales.

D'autre part, les cellules tumorales sont capables de détourner les actions du système immunitaire grâce à la dérégulation et la surexpression des ICP (Immune Checkpoints). Nos données préliminaires au laboratoire montrent que les cellules de LCM expriment les protéines PD-L1 et PD-L2 à leur surface de façon dépendante de la signalisation CD40L. Ces données suggèrent que PD-L1 et PD-L2 exprimés par les cellules tumorales pourraient inhiber les fonctions antitumorales des lymphocytes T et des macrophages permettant ainsi l'échappement immunitaire. De plus, contrairement à d'autres types de cellules tumorales, les cellules de LCM expriment à la fois PD1 et son ligand PD-L1 (Ameli et al., 2022). Ces données nous confortent dans l'idée de nous intéresser à l'axe PD1/PD-L1 au sein de la niche ganglionnaire du LCM. De plus, des études récentes ont mis en évidence une augmentation de l'expression de TIGIT par les cellules de LCM impliquant ainsi TIGIT comme un ICP acteur de la résistance aux CAR T-cells responsables de la rechute dans le LCM (Jiang et al., 2022). Dans des futures études, il serait intéressant d'étudier le rôle de cet ICP dans la niche ganglionnaire du LCM.

Mes résultats d'immunohistochimie, bien que préliminaires, suggèrent la nécessité d'une étude plus exhaustive au niveau transcriptomique et spatial des différentes populations cellulaires retrouvées au sein de la niche afin de mieux caractériser le LCM en fonction des différents sous-types de la pathologie. Des études complémentaires doivent être menées avec notamment l'utilisation de techniques combinant le single cell RNA-sequencing, l'immunohistochimie multiplex et le spatial single cell RNA-sequencing dans le but d'associer l'étude transcriptomique à la disposition spéciale de chaque type cellulaire au sein des ganglions de patients atteints des différents sous-types de LCM. L'association de ces trois techniques permettrait d'étudier la disposition spatiale afin de mieux comprendre les modulations moléculaires de la tumeur induites par le dialogue soluble et le contact direct avec le microenvironnement ainsi que le remodelage de la niche par la tumeur pour comprendre la perte des fonctions antitumorales des cellules immunitaires.

Les données récentes générées par notre laboratoire ont permis de mettre en évidence le rôle central du microenvironnement tumoral et de l'activation de la voie du BCR dans la résistance du LCM notamment à travers la modulation de la famille BCL2. Notre équipe a montré que, malgré les résultats encourageant de l'utilisation du Venetoclax en monothérapie, la combinaison de cette molécule avec de l'Obinutuzumab, entrainant une inhibition de BCL-XL dépendante de la voie NFkB, permettrait d'améliorer la réponse des patients. De plus, l'utilisation d'Ibrutinib, conduisant à la sortie des cellules des ganglions, pourrait permettre d'augmenter l'efficacité du Venetoclax qui est très actif dans les cellules circulantes ayant diminué l'expression de BCL-XL (Chiron et al., 2015 ; Chiron et al., 2016). Ces données ont permis de participer au rationnel de l'essai clinique OAsIs de phase 1 réalisé au CHU de Nantes (Prof. S. Le Gouill NCT#02558816) qui combine le ciblage spécifique et séquentiel de CD20 et BTK suivi du ciblage de BCL2. Cette tri-combinaison a entrainé des taux de réponses élevées chez les patients atteints de LCM en rechute et non traités (Le Gouill et al., 2021). Toutefois, près d'1/3 des patients ont présenté des résistances primaires ou acquises à la thérapie OAsIs soulevant ainsi le besoin de comprendre les mécanismes de résistances afin de proposer des stratégies thérapeutiques alternatives pour ces patients. En réalisant une analyse à la résolution de la cellule unique à partir d'échantillons longitudinaux (inclusion et rechute) provenant d'un patient inclus dans l'essai OAsIs, nous avons identifié un sous-clone majoritaire associé à des mutations de TRAF2 ainsi qu'un sous-clone minoritaire présentant des mutations de CARD11 à l'inclusion. Alors que ces deux sous-clones se sont révélés résistants à la chimiothérapie, seul le sous-clone CARD11 muté a persisté et émergé sous traitement OAsIs. Nous avons montré que cette population résistante à l'origine de la rechute est caractérisée par l'expression des gènes de NFkB1/RelA soulignant l'implication de la voie NFkB indépendamment du BTK dans la résistance à cet essai clinique. Ce cluster résistant nous a permis d'établir une signature de résistance nommée MCL R16, basée sur 16 gènes, qui s'est révélée non seulement associée à la résistance à OAsIs in vivo mais aussi prédictive de la survie globale et survie sans progression des patients traités par chimiothérapie.

Dans notre étude précédente portant sur l'étude des dialogues solubles au sein du microenvironnement tumoral du LCM, nous avons identifié un rôle majeur de la voie alterne de NFkB dans la survie tumorale (**Decombis et al., 2022**). Au cours de notre étude sur la résistance thérapeutique du LCM, la perte du clone associé à l'axe *TRAF2/NFkB2* ainsi que l'émergence du clone associé à *CARD11/NFkB1* nous ont permis d'identifier la voie classique comme impliquée dans les mécanismes de résistance des cellules tumorales. En effet, nous avons mis en évidence un enrichissement des mutations GOF de *CARD11* à la rechute responsable de l'augmentation de l'activité de la voie classique de NFkB. Ces mutations GOF de *CARD11* sont retrouvés dans 10% des cas de LNH au diagnostic et entraine une résistance

à l'Ibrutinib via l'activation de la voie classique de NFkB médiée par le CBM. Ces mutations ont notamment été mises en évidence dans les cellules de DLBCL et FL (Hill et al., 2020 ; Bartlett et al., 2018 ; Caeser et al., 2021 ; Lenz et al., 2008). Nous avons mis en évidence un enrichissement des mutations GOF dans les domaines LATCH (G123S, G123D, F130C) et Coiled-Coil (D230N, R235Q, L341Q) de CARD11. Ces différentes mutations entrainent la phosphorylation et le dépliement de CARD11 vers une conformation active permettant le recrutement des membres du CBM (CARD11-BCL10-MALT1) et l'activation de la voie classique de NFkB (Wu et al., 2016 ; Lu et al., 2018). Ces données ont été confirmées dans une analyse récente des gènes fréquemment mutés dans plusieurs sous-types de LNH dans laquelle un enrichissement des mutations de CARD11 en position G123S (3/11 cas) et D230N (3/11 cas) a été identifié dans le LCM (Ma et al., 2021). Au cours de notre étude, nous avons observé des mutations de CARD11 préférentiellement localisées dans le domaine LATCH et en particulier à la position G123S (4/7 échantillons présentant des mutations de CARD11). Une évaluation récente des différents variants génétiques a classé le variant G123S comme associé à une activité constitutive de la voie NFkB entrainant une résistance à l'Ibrutinib et renforçant ainsi les données obtenues lors de notre étude (Meitlis et al., 2020).

Les anomalies de *CARD11*, dont les GOF, ont un rôle protumoral bien établi dans les lymphomes B matures et présentent également un rôle au sein de l'écosystème tumoral (**Hill et al., 2020 ; Caeser et al., 2021 ; Lenz et al., 2008)**. En effet, la mutation L244P dans le domaine Coiled-coil de *CARD11* entraine une modulation du dialogue des cellules de lymphomes avec les macrophages (augmentation du CSF1) et les lymphocytes T (augmentation de PD-L1/2) présents dans leur microenvironnement (**Reimann et al., 2021**). Etant donné le rôle central de ces dialogues au sein de la niche du LCM, des études complémentaires doivent être menées afin d'évaluer l'influence des mutations de *CARD11*, notamment la mutation G123S, sur le remodelage des dialogues au sein de la niche du LCM

Les mutations GOF de *CARD11* ont été précédemment associées à la résistance aux inhibiteurs de BTK mais leur impact sur l'efficacité de l'inhibition de BCL2 n'était pas connue. Nous avons démontré que les mutations GOF de *CARD11* entrainent une induction de *BCL2A1*, un membre anti-apoptotique de la famille BCL2 décrit pour son rôle dans la résistance au Venetoclax dans les lymphomes (Esteve-Arenys et al., 2018; Zhao et al., 2019; Haselager et al., 2020). J'ai démontré que l'expression de *BCL2A1* est régulée par la voie classique de NFkB elle-même sous la dépendance de *CARD11*.

En évaluant le rôle de BCL2A1 au niveau mitochondrial, nous avons montré que cet antiapoptotique est impliqué dans la séquestration des pro-apoptotiques suite au ciblage de BCL2, MCL1 et BCL-XL. En conséquence, la surexpression de *BCL2A1* conduit à une résistance des cellules de LCM à la tri-combinaison OAsIs soulignant ainsi le besoin de cibler cette protéine afin de contrecarrer la résistance. Contrairement à BCL2 (Venetoclax), MCL1 (S63845) et BCL-XL (A1155463), aucun inhibiteur spécifique de BCL2A1 n'est actuellement disponible. Nos données soulignent le rôle de ce membre anti-apoptotique dans la résistance du LCM et le besoin de développer des inhibiteurs sélectifs. Nous avons montré que l'expression de *BCL2A1* est contrôlée par la voie BTK/NFkB est fortement inhibée par l'Ibrutinib dans les cellules *CARD11^{WT}* entrainant ainsi une synergie avec le Venetoclax contrairement aux cellules *CARD11^{MUT}* indépendantes à BTK.

La protéine CARD11 interagit avec ses deux partenaires BCL10 et MALT1 afin de former le CBM responsable de l'activation de la voie classique de NFkB. Parmi les trois protéines du CBM, MALT1 représente une cible intéressante grâce à ses deux fonctions. En effet, MALT1 présente un rôle de protéine d'échafaudage lui permettant ainsi le recrutement de protéines impliquées dans l'activation de la signalisation NFkB. Cette protéine présente également un rôle de paracaspase afin de cliver des substrats impliqués dans la régulation de la voie NFkB (Lu et al., 2018). MALT1 est devenue une cible d'intérêt thérapeutique qui a permis l'émergence de nouveaux inhibiteurs ciblant sa fonction de paracaspase qui sont en cours d'essais cliniques dans le LNH et la LLC (NCT03900598, NCT05515406, NCT05144347). Au cours de notre étude, nous avons démontré que l'inhibition de la fonction paracaspase de MALT1 entraine une diminution de la signature de résistance MCL R16 ainsi que de l'expression de BCL2A1. L'utilisation d'un inhibiteur de MALT1 a montré une action synergique en combinaison avec le Venetoclax pour induire l'apoptose des cellules de LCM indépendamment du statut mutationnel de CARD11 in vitro et in vivo. Nos données montrent que le ciblage de MALT1 représente une stratégie thérapeutique intéressante pour les patients résistants aux inhibiteurs de BTK notamment induites par les mutations GOF de CARD11. Toutefois, les inhibiteurs de la fonction paracaspase de MALT1 inhibent partiellement la protéine qui conserve probablement sa fonction de protéine d'échafaudage.

Des nouvelles stratégies visant à inhiber à la fois la fonction paracaspase et la fonction d'échafaudage, comme la technologie de PROTAC (Proteolytic Targeting Chimera), permettant d'entrainer une dégradation sélective de MALT1 est en cours d'évaluation préclinique et pourrait représenter une stratégie d'inhibition complète de cette protéine **(Fontan et al., 2019)**. Une inhibition complète de MALT1 pourrait permettre de contrecarrer l'axe CARD11-NFkB-BCL2A1 dans la résistance thérapeutique des patients atteints de LCM.

Nos résultats soulignent le développement de mécanismes de résistance à la chimiothérapie et aux thérapies ciblées dans le LCM. Ces mécanismes entrainent l'émergence de sousensembles de patients multirésistants dont la maladie progresse sous chimiothérapie, thérapie ciblée et thérapie cellulaire tel que les CAR-T cells (Jain and Wang, 2022). Nos données mettent en évidence un rôle central des voies NFkB classique et alterne, dépendantes de l'écosystème tumoral et d'altérations génomiques, dans ces résistances. L'étude de ces anomalies d'origines microenvironnementales et génomiques m'ont permis de proposer des stratégies thérapeutiques alternatives basées sur les mécanismes de résistance et ciblant les protéines NIK (NFkB alterne) et MALT1 (NFkB classique).

ANNEXES

Durant ma thèse, j'ai eu l'occasion de présenter mes travaux de thèse lors de l'American Society of Hematology à Atlanta en décembre 2021 et à la Nouvelle-Orléans en décembre 2022. Annexe 1 : Abstract soumis à l'ASH en 2021 et retenu pour une communication orale à Atlanta : <u>Decombis</u> et al., *« The IL32/BAFF axis supports prosurvival dialogs in the lymphoma ecosystem and is disrupted by NIK inhibition »*, 2021.





Blood 138 (2021) 781-782

63rd ASH Annual Meeting Abstracts

ORAL ABSTRACTS

602.DISORDERED GENE EXPRESSION AND EPIGENETICS IN HEMATOLOGIC MALIGNANCIES: BASIC

The IL32/BAFF Axis Supports Prosurvival Dialog in the Lymphoma Ecosystem and Is Disrupted By NIK Inhibition

Salome Decombis¹, Antonin Papin¹, Celine Bellanger¹, Clara Sortais¹, Christelle Dousset¹, Yannick Le Bris², Stephanie Blandin³, Philippe Hulin³, Benoit Tessoulin⁴, Mathieu Rouel¹, Steven Le Gouill⁴, Agnes Moreau-Aubry¹, Catherine Pellat-Deceunynck¹, David Chiron¹

¹Université de Nantes, CNRS, INSERM, CRCINA, Nantes, France

²Hematology Biology Department, Nantes University Hospital, Nantes, France

³SFR-Santé, INSERM UMS016, CNRS UMS 3556, FED 4202, UNIV Nantes, CHU, Nantes, France

⁴Clinical Hematology, Nantes University Hospital, Nantes, France

Abstract Background

Aggressive B-cell lymphomas, such as Mantle cell lymphoma (MCL), are microenvironment-dependent tumors but, in contrast to tumoral intrinsic anomalies, complex interplays within their ecosystems are largely ignored. A better understanding of these dialogs could provide new perspectives integrating the key role of the microenvironment to increase treatment efficiency of this hard to cure B-cell malignancy.

Methods

To identify novel molecular regulations occurring in lymphoma protective ecosystems, we performed a transcriptomic analysis based on the comparison of publicly available datasets from circulating (PB, n=77) versus MCL lymph nodes (LN, n=107) together with deep RNA sequencing of purified CD19+CD5+ MCL (n=8) versus normal B-cells (n=6). This integrated analysis led to the discovery of microenvironment-dependent and tumor-specific secretion of the cytokine IL32 β by lymphoma cells. Using *in situ* multiplex immunohistochemistry , *ex vivo* models of primary MCL cells (n=23) and IL32^{KO} MCL cell lines (Crispr/Cas9), we studied the regulation and the functional impact of IL32 β in the MCL context, especially in the dialog with tumor-associated macrophages.

Results

Among the 6887 genes differentially expressed in MCL LN compared to PB *in vivo*, 70% were confirmed in CD19+ MCL cells cocultured ex vivo and 39% were tumor-specific, that is to say not upregulated in cocultured normal B cells (NBC). Top-genes scoring revealed that IL32 was the most upregulated genes within the "Tumor-specific" transcriptional program. Using ex vivo models of primary MCL cells, we demonstrated that the microenvironment-dependent secretion of IL32 β was controlled by the CD40/NFKB2 axis whereas its tumor specificity was the consequence of *IL32* promoter hypomethylation in MCL compared to NBC.

IL32 protein expression was confirmed in MCL LN *in situ* by multiplex IHC. The latter allowed the concurrent detection of MCL cells, T cells, macrophages and IL32. Consistently with the microenvironment-dependent induction of IL32 in MCL, we observed that IL32 expression was enriched *in situ* in tumor zones infiltrated with T cells, compared to tumor-exclusive zones. Based on *in v*itro experiments using IL32 ^{KO} MINO cells (Crispr/Cas9), we demonstrated that, through the secretion of IL32 β , the tumor was able to corrupt its microenvironment by polarizing monocytes into specific protumoral CD163^{mid} MCL-associated macrophages, which secrete both pro- (e.g. IL6, OSM, IL1a/b) and anti- inflammatory (e.g. IL10, IDO, IL18, IL4L1) soluble factors. We next highlighted that IL32 β -stimulated macrophages supported tumor survival mostly through a soluble dialog, which is driven by BAFF.

Finally, we demonstrated the efficacy of selective NIK/alternative-NFkB inhibition to counteract both microenvironmentdependent induction of IL32 β (RNA expression inhibition: 62 %; n= 3) and BAFF-dependent survival of MCL cells (survival support inhibition : 47 %; n=6).

Conclusions

In summary, our data uncovered the IL32 β /BAFF axis as a previously undescribed pathway involved in MCL-associated macrophage polarization and tumor survival. Dependent on alternative-NFkB signaling, tumor-specific secretion of IL32 β led to the corruption of the microenvironment through the polarization of monocytes into specific MCL-associated macrophages,



which in turn favor tumor survival. While $IL32\beta$ -stimulated macrophages secreted several protumoral factors, they supported MCL survival through BAFF and consequent alternative-NFkB activation in tumor cells. Our data shows that targeting IL32b, BAFF or the alternative NFkB pathway through NIK inhibition could also be of major interest for counteracting the multiple cross-talks that occur in the MCL microenvironment and, especially, the CD40L ⁺ T-cell / MCL / CD163 ⁺ MCL-associated macrophage triad.

Disclosures No relevant conflicts of interest to declare.

https://doi.org/10.1182/blood-2021-144839

Annexe 2 : Abstract soumis à l'ASH en 2022 et retenu pour une communication orale à la Nouvelle-Orléans : <u>Decombis</u> et al., « *CARD11 and BCL2A1 Join Forces to Promote Resistance to Ibrutinib/Venetoclax Combination in Lymphoma Patients* », 2022.





Blood (2022) 140 (Supplement 1): 2044–2045

64th ASH Annual Meeting Abstracts

ORAL ABSTRACTS

621.LYMPHOMAS: TRANSLATIONAL-MOLECULAR AND GENETIC

CARD11 and BCL2A1 Join Forces to Promote Resistance to Ibrutinib/Venetoclax Combination in Lymphoma Patients

Salomé Decombis¹,*, Celine Bellanger¹,*, Yannick Le Bris, PharmD,PhD^{2,1},*, Delphine Boulet, PhD¹,*, Jane Jardine, PhD¹,*, Christelle Dousset¹,*, Audrey Ménard²,*, Charlotte Kervoelen, PhD³,*, Elise Douillard¹,*, Philippe Moreau, MD^{4,1},*, Stephane Minvielle, PhD¹,*, Agnes Moreau-Aubry, PhD¹,*, Benoit Tessoulin, MD^{5,6},*, Nicolas Bidère, PhD¹,*, Steven Le Gouill, MD PhD⁷, Catherine Pellat-Deceunynck, PhD¹, David Chiron, PhD¹,*

¹CRCI2NA, Integrated Research Center in Immunology and Oncology, Nantes University, Nantes, France

- ²Department of Biological Hematology, CHU Nantes, Nantes, France
- ³Therassay (Onco-Hemato) Core Facility, Nantes Université, Capacités, Nantes, France

⁴Hematology Department, University Hospital Hôtel-Dieu, Nantes, France

⁵CRCI2NA, Integrated Research Center in Immunology and Oncology, Nantes University, Nantes, France

⁶Hematology Department, Nantes University Hospital, Nantes, France

⁷Institut Curie, Paris, Paris, France

*Asterisk with author names denotes non-ASH members.

Abstract Background Mantle cell lymphoma (MCL) is a hard to cure malignancy with conventional chemotherapy. We previously reported that combinations targeting CD20 (obinutuzumab), BTK (ibrutinib) and BCL2 (venetoclax) counteracted both tumor intrinsic anomalies and dialogs within corrupted MCL ecosystems. Importantly, this chemo-free combination provided durable complete responses in patients both at relapse or naïve of treatments (OAsIs trial, NCT02558816). Despite high initial response rates, nearly 1/3 of patients rapidly relapsed. To understand this *in vivo* resistance, we performed targeted sequencing and single-cell RNA-seq to identify key actors involved.

Methods Tumor DNA from patients enrolled in the OAsls trial were sequenced at baseline (n=12) or relapse (n=5) (Capture xGen technology, IDT). Forty-nine genes and the 9p21 region, described for their impact in lymphoma resistance, were targeted for recurrent SNVs/CNVs. Single cell RNA-seq (3' gene expression, 10X genomics) was performed before treatment (n=4) or after relapse (n=3). Integrated omics analysis was performed to define resistance signatures, at the single cell resolution and associated to gain of function (GOF) mutations. Functional analysis (i.e., reporter assay, BH3-profiling, drug testing) using primary MCL cells and cell lines were performed.

Results Targeted sequencing of tumor cells at relapse highlighted an enrichment of CARD11 GOF mutations (p=0.01). The selective advantage of CARD11^{MUT} cells under OAsls pressure was further documented with a patient who achieved a complete response before relapsing 12 months after inclusion. Whereas CARD11^{MUT} tumor cells were in a minority (0.0005 %) at the onset of treatment, all the cells carried a heterozygous mutation at relapse (VAF: 50.56%). scRNA-seq of the same longitudinal samples identified a minor cluster (187/4860 sequenced cells) enriched at relapse that was characterized by expression of *NFKB1* target genes consistent with constitutive CARD11 activity (Enrichr p<5x10⁻⁴). By combining scRNA-seq and mutations, we identified a signature associated with CARD11 GOF, which we named "OAsls-R" signature. Applied to additional patients' samples, this novel signature allowed the segregation of OAsls sensitive from resistant cells (scRNA-seq). Of major interest, OAsls-R signature was also predictive for OS/PFS in MCL patients treated with conventional chemotherapy (GSE93291 and in-house cohorts).

Among the top genes of OAsIs-R signature, we further focused on *BCL2A1*. We first highlighted its frequent expression in MCL primary cells (n=63) and cell lines (n=7). BCL2A1 overexpression, BH3-profiling (FS2 peptide) and *ex vivo* drug testing (AnnexinV) further validated a key role of CARD11-related BCL2A1 dysregulation in OAsIs resistance. Ibrutinib deeply reduced *BCL2A1* level in CARD11^{WT} cell lines but not in CARD11^{MUT} cells (RNA expression inhibition: 82%, n=4 vs. 0%, n=4), leading to synergistic apoptosis when associated to venetoclax in BCL2A1+ but not in BCL2A1- cells (mean synergy score: 17 vs. 1, n=6). Using reporter assay experiments we showed that CARD11 mutations directly led to an increase activity of BCL2A1 promoter (2 fold more activity, Mut vs. wt), reinforcing the need to target its activity to counteract resistance.

ORAL ABSTRACTS

Among druggable strategies to inhibit CARD11, selective inhibition of its partner MALT1, essential for CARD11-BCL10-MALT1 (CBM) activity, is currently tested in early phase clinical trials. We demonstrated that MALT1 protease inhibition led to the reduction of genes involved in OAsls resistance, including *BCL2A1* (RNA inhibition: 40%, n=6), and induced synergistic cell death in combination with venetoclax (mean synergy score: 20, n=4), irrespective of CARD11 mutational status.

Conclusions In summary, our data uncovered control of the mitochondrial apoptosis by CARD11 through BCL2A1 expression. This network has critical implication in the resistance to BTK/BCL2 targeted inhibition. Indeed, CARD11 GOF mutations led not only to BCR-independence and consequently ibrutinib resistance but also to BCL2A1-mediated venetoclax resistance. Nevertheless, our data show that targeting the CBM through MALT1 inhibition reverts this resistance and that MALT1 targeting appears as a promising therapeutic option for counteracting MCL resistance, especially in the context of acquired CARD11 mutation.



Disclosures Kervoelen: Step Pharma: Research Funding. **Moreau:** AbbVie, Janssen, Celgene, Amgen, and Sanofi: Honoraria. **Le Gouill:** Novartis, Kite/Gilead, Janssen: Honoraria, Membership on an entity's Board of Directors or advisory committees, Other: Travel support. **Pellat-Deceunynck:** Step Pharma: Research Funding. **Chiron:** Step Pharma: Research Funding.

https://doi.org/10.1182/blood-2022-157694

Annexe 3 : « Voir, comprendre et traiter le cancer comme un organe pathologique », La Recherche, 2022.

Des images d'immunohistochimie multiplex ont été utilisées dans l'article publié dans un numéro spécial de La Recherche en Pays de la Loire (octobre-décembre 2022) pour illustrer la recherche réalisée au sein de notre centre de recherche CRCI2NA.

CRCI²NA

Région BRETAGNE & PAYS DE LOIRE

Voir, comprendre et traiter le cancer comme un « organe pathologique »



Le CRCI²NA, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Intégrée Nantes Angers a été créé en Janvier 2022. Réparti sur cinq sites, et composé de 350 membres environ, ce centre de recherche sur le cancer, le plus grand de l'interrégion Grand Ouest, entretient une dynamique collégiale et pluridisciplinaire autour de ses douze équipes labellisées par l'INSERM, le CNRS et les universités de Nantes et d'Angers. + d'infos : <u>https://crci2na.univ-nantes.fr/</u>. Plusieurs membres ont répondu à nos questions.

Sous quel angle le CRCI²NA aborde-t-il le cancer comme objet de recherche ?

Nos équipes de recherche, qui ménent des projets spécifiques et bien identifiés. partagent une vision des tumeurs et des métastases comme des écosystèmes composés de cellules distinctes (tumorales, immunitaires, vasculaires, stromales...) en relation de coopération, de compétition ou de prédation Ensemble nous explorons la structure et les changements dynamiques des écosystèmes qui progressent en dépit des traitements courants, un peu comme se développerait un organe. Nous combinons un large éventail de compétences : génomique du cancer et bio-informatique ; biologie moléculaire et cellulaire (mort cellulaire et immunologie en particulier), médecine nucléaire. Notre approche globale permet d'identifier des outils de diagnostic et de prédiction, de décrypter les mécanismes de résistance aux traitements et de concevoir des thérapies innovantes et approches théranostiques, en fonction de chaque catégorie de cancer, de chaque cas, dans un objectif de thérapies individualisées.

Quels sont les défis à relever et les perspectives d'avenir ?

Primo, décrire les cancers de manière encore plus globale et dynamique, en innovant dans la caractérisation moléculaire, l'imagerie et l'intégration des données. Secundo, mieux comprendre les interactions entre cellules qui contribuent à la pathogenèse des écosystèmes. Tertio, créer des nouvelles stratégies interventionnelles, plus efficaces. Voir, comprendre et traiter. Par souci de pertinence immédiate nous axons beaucoup nos investigations sur la pathologie humaine, et nous affrontons le challenge logistique et technologique que représente le travail sur du matériel biologique issu de patients en



Multiplicité cellulaire au sein d'un organe canceraux. Etude par immunohistochimie multiplex d'un ganglion tumoral de patient atteint de Lymphome révélant la coexistence des cellules tumorales (rouge) proliférantes (cyan). des lymphocytes T (vert), et des macrophages (blanc) (S Decombis, CRC2NA).

collaborant étroitement avec les établissements de santé de Nantes et d'Angers. L'eur appui, tout comme le soutien d'associations comme la Ligue Contre le Cancer, l'ARC, la FRM ou la Fondation de France, sont critiques. Pour agir dans la durée, nous nous engageons à attirer, accueillir, et former les chercheurs et enseignants de demain et bénéficions de l'aide de nos institutions et de la Région Pays de la Loire pour cela.

Comment votre action s'inscrit-elle dans le contexte de la santé ?

Pour contribuer à développer une médecine de précision, nous travaillons avec les CHU et l'ICO à Nantes et Angers à ameliorer le diagnostic, la classification et l'évaluation des nouvelles thérapies. Nos compétences sont en particulier importantes pour développer de nouveaux radio-médicaments produits par le cyclotron nantais. Nous nous impliquons également dans la formation et par la recherche de nos partenaires médecins. Notre recherche translation nelle implique aussi un lien très étroit avec le patient. Nous avons des relations avec des associations de patients qui nous soutiennent activement comme « Mimi pour la vie » dédiée au cancer osseux pédiatrique.

Comment associez-vous les jeunes en formation à vos recherches et à vos défis ?

Le CRCI²NA est acteur de la graduate school (GS) Health Sciences and Technologies du projet TRITON qui transformera Nantes Université en 2023. TRITON vise à former les étudiants en Master/Thèse à la recherche par la recherche, à resserrer les liens étudiants-chercheurs et à internationaliser les formations. Le CRCI2NA est laboratoire d'appui de deux de ses graduate programs : Immunology & Immunointervention (13) et Oncology, Hematology and Nuclear Medicine (OHNU). Conçus pour favoriser l'interdisciplinarité et l'internationalisation, les enseignements spécifiques à 13 et OHNU ont été pensés comme transversaux et en anglais

Comment valorisez-vous vos recherches ?

Nous avons créé une Force de Valorisation interne au CRCI²NA. Le but est d'améliorer notre visibilité et nos relations avec le monde industriel tout en conservant nos savoir-faire pour les exploiter durablement. En capitalisant sur des succès récents et exemplaires. nous valoriserons plus efficacement nos futures recherches par l'établissement de partenariats durables avec l'industrie et par le dépôt des brevets exploitables par les industriels avec l'équipe de recherche. Cette Force de Valorisation a pour but de soutenir et accompagner doctorants et chercheurs du Centre dans la creation d'entreprises en leur faisant bénéficier de l'expérience de prédécesseurs qui v ont réussi.

N°571 - Octobre-Novembre-Décembre 2022 - La Recherche - 103

REFERENCES

- 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. American Journal of Hematology 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
- Akkaya, M., Kwak, K., Pierce, S.K., 2020. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. Nat Rev Immunol 20, 229–238. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0244-2
- Albero, R., Enjuanes, A., Demajo, S., Castellano, G., Pinyol, M., García, N., Capdevila, C., Clot, G., Suárez-Cisneros, H., Shimada, M., Karube, K., López-Guerra, M., Colomer, D., Beà, S., Martin-Subero, J.I., Campo, E., Jares, P., 2018. Cyclin D1 overexpression induces global transcriptional downregulation in lymphoid neoplasms. J Clin Invest 128, 4132–4147. https://doi.org/10.1172/JCI96520
- Allen, C.D.C., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., Cyster, J.G., 2004. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. Nat Immunol 5, 943–952. https://doi.org/10.1038/ni1100
- 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
- Ameli, F., Shajareh, E., Mokhtari, M., Kosari, F., 2022. Expression of PD1 and PDL1 as immune-checkpoint inhibitors in mantle cell lymphoma. BMC Cancer 22, 848. https://doi.org/10.1186/s12885-022-09803-x
- 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. https://doi.org/10.1182/blood.V96.6.2219
- Balaji, S., Ahmed, M., Lorence, E., Yan, F., Nomie, K., Wang, M., 2018. NF-κB signaling and its relevance to the treatment of mantle cell lymphoma. J Hematol Oncol 11. https://doi.org/10.1186/s13045-018-0621-5
- Balsas, P., Palomero, J., Eguileor, Á., Rodríguez, M.L., Vegliante, M.C., Planas-Rigol, E., Sureda-Gómez, M., Cid, M.C., Campo, E., Amador, V., 2017. SOX11 promotes tumor protective microenvironment interactions through CXCR4 and FAK regulation in mantle cell lymphoma. Blood 130, 501–513. https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-776740
- Balsas, P., Veloza, L., Clot, G., Sureda-Gómez, M., Rodríguez, M.-L., Masaoutis, C., Frigola, G., Navarro, A., Beà, S., Nadeu, F., Giné, E., López-Guillermo, A., Martínez, A., Ribera-Cortada, I., Engel, P., Quintanilla-Martínez, L., Klapper, W., Campo, E., Amador, V., 2021. SOX11, CD70, and Treg cells configure the tumor immune microenvironment of aggressive mantle cell lymphoma. Blood 138, 2202–2215. https://doi.org/10.1182/blood.2020010527
- Baran-Marszak, F., Boukhiar, M., Harel, S., Laguillier, C., Roger, C., Gressin, R., Martin, A., Fagard, R., Varin-Blank, N., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Ledoux, D., 2010.

207

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. Cyclin D1 multitasks. Nature 474, 171–172. https://doi.org/10.1038/474171a
- Bartlett, N.L., Costello, B.A., LaPlant, B.R., Ansell, S.M., Kuruvilla, J.G., Reeder, C.B., Thye, L.S., Anderson, D.M., Krysiak, K., Ramirez, C., Qi, J., Siegel, B.A., Griffith, M., Griffith, O.L., Gomez, F., Fehniger, T.A., 2018. Single-agent ibrutinib in relapsed or refractory follicular lymphoma: a phase 2 consortium trial. Blood 131, 182–190. https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-804641
- 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
- Baumgarth, N., 2011. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. Nat Rev Immunol 11, 34–46. https://doi.org/10.1038/nri2901
- Beà, S., Amador, V., 2017. Role of SOX11 and Genetic Events Cooperating with Cyclin D1 in Mantle Cell Lymphoma. Curr Oncol Rep 19, 43. https://doi.org/10.1007/s11912-017-0598-1
- Beà, S., Valdés-Mas, R., Navarro, A., Salaverria, I., Martín-Garcia, 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 Sci U cell lymphoma. Proc Natl Acad S A 110. 18250-18255. https://doi.org/10.1073/pnas.1314608110
- Beaudin, A.E., Forsberg, E.C., 2016. To B1a or not to B1a: do hematopoietic stem cells contribute to tissue-resident immune cells? Blood 128, 2765–2769. https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-697813
- 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
- Bedsaul, J.R., Carter, N.M., Deibel, K.E., Hutcherson, S.M., Jones, T.A., Wang, Z., Yang, C., Yang, Y.-K., Pomerantz, J.L., 2018. Mechanisms of Regulated and Dysregulated CARD11 Signaling in Adaptive Immunity and Disease. Front Immunol 9, 2105. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02105
- 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. International Journal of Cancer 136, 2761–2774. https://doi.org/10.1002/ijc.29326
- Bewarder, M., Kiefer, M., Will, H., Olesch, K., Moelle, C., Stilgenbauer, S., Christofyllakis, K., Kaddu-Mulindwa, D., Bittenbring, J.T., Fadle, N., Regitz, E., Kaschek, L., Hoth, M., Neumann, F., Preuss, K.-D., Pfreundschuh, M., Thurner, L., 2021. The B-cell Receptor Autoantigen LRPAP1 Can Replace Variable Antibody Regions to Target Mantle Cell Lymphoma Cells. Hemasphere 5, e620. https://doi.org/10.1097/HS9.000000000000000000
- 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
- Biram, A., Davidzohn, N., Shulman, Z., 2019. T cell interactions with B cells during germinal center formation, a three-step model. Immunological Reviews 288, 37–48. https://doi.org/10.1111/imr.12737

- Body, S., Esteve-Arenys, A., Miloudi, H., Recasens-Zorzo, C., Tchakarska, G., Moros, A., Bustany, S., Vidal-Crespo, A., Rodriguez, V., Lavigne, R., Com, E., Casanova, I., Mangues, R., Weigert, O., Sanjuan-Pla, A., Menéndez, P., Marcq, B., Picquenot, J.-M., Pérez-Galán, P., Jardin, F., Roué, G., Sola, B., 2017. Cytoplasmic cyclin D1 controls the migration and invasiveness of mantle lymphoma cells. Sci Rep 7. https://doi.org/10.1038/s41598-017-14222-1
- Bond, D.A., Martin, P., Maddocks, K.J., 2021. Relapsed Mantle Cell Lymphoma: Current Management, Recent Progress, and Future Directions. J Clin Med 10, 1207. https://doi.org/10.3390/jcm10061207
- Bošnjak, B., Do, K.T.H., Förster, R., Hammerschmidt, S.I., 2022. Imaging dendritic cell functions*. Immunological Reviews 306, 137–163. https://doi.org/10.1111/imr.13050
- Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Walewska, R., Brown, D., Dyer, M.J.S., Čain, K., 2009. Protein Profiling of Plasma Membranes Defines Aberrant Signaling Pathways in Mantle Cell Lymphoma. Mol Cell Proteomics 8, 1501–1515. https://doi.org/10.1074/mcp.M800515-MCP200
- Brightbill, H.D., Suto, E., Blaquiere, N., Ramamoorthi, N., Sujatha-Bhaskar, S., Gogol, E.B., Castanedo, G.M., Jackson, B.T., Kwon, Y.C., Haller, S., Lesch, J., Bents, K., Everett, C., Kohli, P.B., Linge, S., Christian, L., Barrett, K., Jaochico, A., Berezhkovskiy, L.M., Fan, P.W., Modrusan, Z., Veliz, K., Townsend, M.J., DeVoss, J., Johnson, A.R., Godemann, R., Lee, W.P., Austin, C.D., McKenzie, B.S., Hackney, J.A., Crawford, J.J., Staben, S.T., Alaoui Ismaili, M.H., Wu, L.C., Ghilardi, N., 2018. NF-κB inducing kinase is a therapeutic target for systemic lupus erythematosus. Nat Commun 9, 179. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02672-0
- 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–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. Seminars in Cancer Biology, Mantle Cell Lymphoma 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. Seminars in Cancer Biology, The microenvironment in lymphomas 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
- Caeser, R., Walker, I., Gao, J., Shah, N., Rasso-Barnett, L., Anand, S., Martin, J.-E., Hodson, D.J., 2021. Acquired CARD11 Mutation Promotes BCR Independence in Diffuse Large B Cell Lymphoma. JCO Precis Oncol 5, PO.20.00360. https://doi.org/10.1200/PO.20.00360
- 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
- Carbone, A., Roulland, S., Gloghini, A., Younes, A., von Keudell, G., López-Guillermo, A., Fitzgibbon, J., 2019. Follicular lymphoma. Nat Rev Dis Primers 5, 1–20. https://doi.org/10.1038/s41572-019-0132-x
- Castellino, A., Wang, Y., Larson, M.C., Maurer, M.J., Link, B.K., Farooq, U., Feldman, A.L., Syrbu, S.I., Habermann, T.M., Paludo, J., Inwards, D.J., Witzig, T.E., Ansell, S.M., Allmer, C., Slager, S.L., Cohen, J.B., Martin, P., Cerhan, J.R., Nowakowski, G.S., 2022. Evolving frontline immunochemotherapy for mantle cell lymphoma and the impact on survival outcomes. Blood Adv 6, 1350–1360. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005715
- 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. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401664

- 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
- Chao, M.P., Alizadeh, A.A., Tang, C., Myklebust, J.H., Varghese, B., Gill, S., Jan, M., Cha, A.C., Chan, C.K., Tan, B.T., Park, C.Y., Zhao, F., Kohrt, H.E., Malumbres, R., Briones, J., Gascoyne, R.D., Lossos, I.S., Levy, R., Weissman, I.L., Majeti, R., 2010. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. Cell 142, 699–713. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.044
- Chao, M.P., Tang, C., Pachynski, R.K., Chin, R., Majeti, R., Weissman, I.L., 2011. Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy. Blood 118, 4890–4901. https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-338020
- Chao, M.P., Weissman, I.L., Majeti, R., 2012. The CD47-SIRPα Pathway in Cancer Immune Evasion and Potential Therapeutic Implications. Curr Opin Immunol 24, 225–232. https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.01.010
- 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., Bellanger, C., Papin, A., Tessoulin, B., Dousset, C., Maiga, S., Moreau, A., Esbelin, J., Trichet, V., Chen-Kiang, S., Moreau, P., Touzeau, C., Le Gouill, S., Amiot, M., Pellat-Deceunynck, C., 2016. Rational targeted therapies to overcome microenvironment-dependent expansion of mantle cell lymphoma. Blood 128, 2808–2818. https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-720490
- 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 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 rational 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.
- Choi, S.M., O'Malley, D.P., 2018. Diagnostically relevant updates to the 2017 WHO classification of lymphoid neoplasms. Annals of Diagnostic Pathology 37, 67–74. https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.09.011
- 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. Clinical Cancer Research 10, 964–971. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-1182-3
- Dai, B., Grau, M., Juilland, M., Klener, P., Höring, E., Molinsky, J., Schimmack, G., Aukema, S.M., Hoster, E., Vogt, N., Staiger, A.M., Erdmann, T., Xu, W., Erdmann, K., Dzyuba, N., Madle, H., Berdel, W.E., Trneny, M., Dreyling, M., Jöhrens, K., Lenz, P., Rosenwald, A., Siebert, R., Tzankov, A., Klapper, W., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Ott, G., Thome, M., Lenz, G., 2017. B-cell receptor–driven MALT1 activity regulates MYC

signaling in mantle cell lymphoma. Blood 129, 333–346. https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-718775

- Davids, M.S., Roberts, A.W., Seymour, J.F., Pagel, J.M., Kahl, B.S., Wierda, W.G., Puvvada, S., Kipps, T.J., Anderson, M.A., Salem, A.H., 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 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
- Decombis, S., Papin, A., Bellanger, C., Sortais, C., Dousset, C., Bris, Y.L., Riveron, T., Blandin, S., Hulin, P., Tessoulin, B., Rouel, M., Gouill, S.L., Moreau-Aubry, A., Pellat-Deceunynck, C., Chiron, D., 2022. The IL32/BAFF axis supports prosurvival dialogs in the lymphoma ecosystem and is disrupted by NIK inhibition. Haematologica 107, 2905– 2917. https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279800
- Demajo, S., Albero, R., Clot, G., Castellano, G., Navarro, A., Capdevila, C., Enjuanes, A., Nadeu, F., Giné, E., Pinyol, M., Jaffe, E.S., Ott, G., Staudt, L.M., Rosenwald, A., Scott, D.W., Rimsza, L.M., López-Guillermo, A., Beà, S., Campo, E., Jares, P., 2021. A cyclin D1-dependent transcriptional program predicts clinical outcome in mantle cell lymphoma. Clin Cancer Res 27, 213–225. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2868
- Domagala, M., Ysebaert, L., Ligat, L., Lopez, F., Fournié, J.-J., Laurent, C., Poupot, M., 2021. IL-10 Rescues CLL Survival through Repolarization of Inflammatory Nurse-like Cells. Cancers (Basel) 14, 16. https://doi.org/10.3390/cancers14010016
- Efremov, D.G., Turkalj, S., Laurenti, L., 2020. Mechanisms of B Cell Receptor Activation and Responses to B Cell Receptor Inhibitors in B Cell Malignancies. Cancers 12, 1396. https://doi.org/10.3390/cancers12061396
- Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A.-K., Rizzi, M., 2014. B cell Biology: An Overview. Curr Allergy Asthma Rep 14, 434. https://doi.org/10.1007/s11882-014-0434-8
- 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. International Journal of Cancer 118, 2092– 2097. https://doi.org/10.1002/ijc.21579
- Elpek, K.G., Lacelle, C., Singh, N.P., Yolcu, E.S., Shirwan, H., 2007. CD4+CD25+ T Regulatory Cells Dominate Multiple Immune Evasion Mechanisms in Early but Not Late Phases of Tumor Development in a B Cell Lymphoma Model. The Journal of Immunology 178, 6840–6848. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.6840
- Esmeray Sönmez, E., Hatipoğlu, T., Kurşun, D., Hu, X., Akman, B., Yuan, H., Erşen Danyeli, A., Alacacıoğlu, İ., Özkal, S., Olgun, A., Erdağ, T.K., You, H., Küçük, C., 2022. Whole Transcriptome Sequencing Reveals Cancer-Related, Prognostically Significant Transcripts and Tumor-Infiltrating Immunocytes in Mantle Cell Lymphoma. Cells 11, 3394. https://doi.org/10.3390/cells11213394
- Esteve-Arenys, A., Valero, J.G., Chamorro-Jorganes, A., Gonzalez, D., Rodriguez, V., Dlouhy, I., Salaverria, I., Campo, E., Colomer, D., Martinez, A., Rymkiewicz, G., Pérez-Galán, P., Lopez-Guillermo, A., Roué, G., 2018. The BET bromodomain inhibitor CPI203 overcomes resistance to ABT-199 (venetoclax) by downregulation of BFL-1/A1 in in vitro and in vivo models of MYC+/BCL2+ double hit lymphoma. Oncogene 37, 1830– 1844. https://doi.org/10.1038/s41388-017-0111-1
- Eyre, T.A., Walter, H.S., Iyengar, S., Follows, G., Cross, M., Fox, C.P., Hodson, A., Coats, J., Narat, S., Morley, N., Dyer, M.J.S., Collins, G.P., 2019. Efficacy of venetoclax monotherapy in patients with relapsed, refractory mantle cell lymphoma after Bruton tyrosine kinase inhibitor therapy. Haematologica 104, e68–e71. https://doi.org/10.3324/haematol.2018.198812
- Federmann, B., Frauenfeld, L., Pertsch, H., Borgmann, V., Steinhilber, J., Bonzheim, I., Fend, F., Quintanilla-Martinez, L., 2020. Highly sensitive and specific in situ hybridization

assay for quantification of SOX11 mRNA in mantle cell lymphoma reveals association of TP53 mutations with negative and low SOX11 expression. Haematologica 105, 754–764. https://doi.org/10.3324/haematol.2019.219543

- Fontan, L., Hatcher, J., Scott, D., Qiao, Q., Us, I., Du, G., Durant, M., Wilson, J., Wu, H., Gray, N., Melnick, A., 2019. Chemically Induced Degradation of MALT1 to Treat B-Cell Lymphomas. Blood 134, 2073. https://doi.org/10.1182/blood-2019-130666
- Franciszkiewicz, 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 Research 72, 6325–6332. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2027
- Fu, L., Lin-Lee, Y.-C., Pham, L.V., Tamayo, A., Yoshimura, L., Ford, R.J., 2006. Constitutive NF-κB 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
- Goebeler, M.-E., Knop, S., Viardot, A., Kufer, P., Topp, M.S., Einsele, H., Noppeney, R., Hess, G., Kallert, S., Mackensen, A., Rupertus, K., Kanz, L., Libicher, M., Nagorsen, D., Zugmaier, G., Klinger, M., Wolf, A., Dorsch, B., Quednau, B.D., Schmidt, M., Scheele, J., Baeuerle, P.A., Leo, E., Bargou, R.C., 2016. Bispecific T-Cell Engager (BiTE) Antibody Construct Blinatumomab for the Treatment of Patients With Relapsed/Refractory Non-Hodgkin Lymphoma: Final Results From a Phase I Study. JCO 34, 1104–1111. https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.1586
- 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
- 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
- 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
- Han, L., Chen, S., Chen, Z., Zhou, B., Zheng, Y., Shen, L., 2021. Interleukin 32 Promotes Foxp3+ Treg Cell Development and CD8+ T Cell Function in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma Microenvironment. Front Cell Dev Biol 9, 704853. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.704853
- 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., Shana'ah, A.Y., Youssef, Y., Smith, L., Hassan, 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 60, 2498–2507. https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1569231
- Haselager, M.V., Eldering, E., 2022. The Therapeutic Potential of Targeting NIK in B Cell Malignancies. Front Immunol 13, 930986. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.930986
- Haselager, M.V., Kielbassa, K., ter Burg, J., Bax, D.J.C., Fernandes, S.M., Borst, J., Tam, C., Forconi, F., Chiodin, G., Brown, J.R., Dubois, J., Kater, A.P., Eldering, E., 2020. Changes in Bcl-2 members after ibrutinib or venetoclax uncover functional hierarchy in determining resistance to venetoclax in CLL. Blood 136, 2918–2926. https://doi.org/10.1182/blood.2019004326

- Hazan-Halevy, I., Rosenblum, D., Weinstein, S., Bairey, O., Raanani, P., Peer, D., 2015. Cellspecific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and nonmalignant B-lymphocytes. Cancer Lett 364, 59–69. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.04.026
- Heini, A.D., Bacher, U., Porret, N., Wiedemann, G., Legros, M., Zeerleder, D.S., Seipel, K., Novak, U., Daskalakis, M., Pabst, T., 2022. Experiences with Glofitamab Administration following CAR T Therapy in Patients with Relapsed Mantle Cell Lymphoma. Cells 11. https://doi.org/10.3390/cells11172747
- 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., 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. The Lancet 388. 565-575. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00739-X
- Herzog, S., Jumaa, H., 2012. Self-recognition and clonal selection: autoreactivity drives the generation of B cells. Current Opinion in Immunology, Lymphocyte development/Tumour immunology 24, 166–172. https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.02.004
- 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
- Hildebrand, J.M., Luo, Z., Manske, M.K., Price-Troska, T., Ziesmer, S.C., Lin, W., Hostager, B.S., Slager, S.L., Witzig, T.E., Ansell, S.M., Cerhan, J.R., Bishop, G.A., Novak, A.J., 2010. A BAFF-R mutation associated with non-Hodgkin lymphoma alters TRAF recruitment and reveals new insights into BAFF-R signaling. J Exp Med 207, 2569–2579. https://doi.org/10.1084/jem.20100857
- Hill, H.A., Qi, X., Jain, P., Nomie, K., Wang, Y., Zhou, S., Wang, M.L., 2020. Genetic mutations and features of mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. Blood Adv 4, 2927–2938. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001350
- Inamdar, A.A., Goy, A., Ayoub, N.M., Attia, C., Oton, L., Taruvai, V., Costales, M., Lin, Y.-T., Pecora, A., Suh, S.K., 2016. Mantle cell lymphoma in the era of precision medicinediagnosis, biomarkers and therapeutic agents. Oncotarget 7, 48692–48731. https://doi.org/10.18632/oncotarget.8961
- Inoue, T., Moran, I., Shinnakasu, R., Phan, T.G., Kurosaki, T., 2018. Generation of memory B cells and their reactivation. Immunological Reviews 283, 138–149. https://doi.org/10.1111/imr.12640
- Jain, A.G., Chang, C.-C., Ahmad, S., Mori, S., 2019. Leukemic Non-nodal Mantle Cell Lymphoma: Diagnosis and Treatment. Curr Treat Options Oncol 20, 85. https://doi.org/10.1007/s11864-019-0684-8
- Jain, P., Nastoupil, L., Westin, J., Lee, H.J., Navsaria, L., Steiner, R.E., Ahmed, S., Moghrabi, O., Oriabure, O., Chen, W., Badillo, M., Flowers, C.R., Wang, M.L., 2021. Outcomes and management of patients with mantle cell lymphoma after progression on brexucabtagene autoleucel therapy. British Journal of Haematology 192, e38–e42. https://doi.org/10.1111/bjh.17197
- Jain, P., Wang, M.L., 2022. Mantle cell lymphoma in 2022—A comprehensive update on molecular pathogenesis, risk stratification, clinical approach, and current and novel treatments. American Journal of Hematology 97, 638–656. https://doi.org/10.1002/ajh.26523
- 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

- Jares, P., Colomer, D., Campo, E., 2007. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. Nat Rev Cancer 7, 750–762. https://doi.org/10.1038/nrc2230
- Jatiani, S.S., Christie, S., Leshchenko, V.V., Jain, R., Kapoor, A., Bisignano, P., Lee, C., Kaniskan, H.Ü., Edwards, D., Meng, F., Laganà, A., Youssef, Y., Wiestner, A., Alinari, L., Jin, J., Filizola, M., Aggarwal, A.K., Parekh, S., 2021. SOX11 inhibitors are cytotoxic in mantle cell lymphoma. Clin Cancer Res 27, 4652–4663. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-5039
- Jiang, V.C., Hao, D., Jain, P., Li, Y., Cai, Q., Yao, Y., Nie, L., Liu, Y., Jin, J., Wang, W., Lee, H.-H., Che, Y., Dai, E., Han, G., Wang, R., Rai, K., Futreal, A., Flowers, C., Wang, L., Wang, M., 2022. TIGIT is the central player in T-cell suppression associated with CAR T-cell relapse in mantle cell lymphoma. Mol Cancer 21, 185. https://doi.org/10.1186/s12943-022-01655-0
- Juilland, M., Thome, M., 2018. Holding All the CARDs: How MALT1 Controls CARMA/CARD-Dependent Signaling. Front Immunol 9, 1927. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01927
- Jullien, M., Gomez-Bougie, P., Chiron, D., Touzeau, C., 2020. Restoring Apoptosis with BH3 Mimetics in Mature B-Cell Malignancies. Cells 9. https://doi.org/10.3390/cells9030717
- 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
- Kageyama, Y., Katayama, N., 2020. Ontogeny of human B1 cells. Int J Hematol 111, 628– 633. https://doi.org/10.1007/s12185-019-02775-y
- Kanduri, M., Sander, B., Ntoufa, S., Papakonstantinou, N., Sutton, L.-A., Stamatopoulos, K., Kanduri, C., Rosenquist, R., 2013. A key role for EZH2 in epigenetic silencing of HOX genes in mantle cell lymphoma. Epigenetics 8, 1280–1288. https://doi.org/10.4161/epi.26546
- 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
- Kerkar, S.P., Restifo, N.P., 2012. Cellular Constituents of Immune Escape within the Tumor Microenvironment. Cancer Res 72, 3125–3130. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4094
- Khoury, J.D., Şen, F., Abruzzo, L.V., Hayes, K., Glassman, A., Medeiros, L.J., 2003. Cytogenetic findings in blastoid mantle cell lymphoma. Human Pathology 34, 1022– 1029. https://doi.org/10.1053/S0046-8177(03)00412-X
- Kim, S.-H., Han, S.-Y., Azam, T., Yoon, D.-Y., Dinarello, C.A., 2005. Interleukin-32: A Cytokine and Inducer of TNFα. Immunity 22, 131–142. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.12.003
- Klener, P., Sovilj, D., Renesova, N., Andera, L., 2021. BH3 Mimetics in Hematologic Malignancies. Int J Mol Sci 22, 10157. https://doi.org/10.3390/ijms221810157
- 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. Hematological Oncology 32, 178–186. https://doi.org/10.1002/hon.2106
- Kuo, P.-Y., Jatiani, S.S., Rahman, A.H., Edwards, D., Jiang, Z., Ahr, K., Perumal, D., Leshchenko, V.V., Brody, J., Shaknovich, R., Ye, B.H., Parekh, S., 2018. SOX11 augments BCR signaling to drive MCL-like tumor development. Blood 131, 2247–2255. https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-832535
- Küppers, R., 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. Nat Rev Cancer 5, 251– 262. https://doi.org/10.1038/nrc1589
- 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. The Journal of Pathology 199, 84–89. https://doi.org/10.1002/path.1253
- 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
- Le Bris, Y., Magrangeas, F., Moreau, A., Chiron, D., Guérin-Charbonnel, C., Theisen, O., Pichon, O., Canioni, D., Burroni, B., Maisonneuve, H., Thieblemont, C., Oberic, L., Gyan, E., Pellat-Deceunynck, C., Hermine, O., Delfau-Larue, M.-H., Tessoulin, B., Béné, M.-C., Minvielle, S., Le Gouill, S., 2020. Whole genome copy number analysis in search of new prognostic biomarkers in first line treatment of mantle cell lymphoma. A study by the LYSA group. Hematological Oncology 38, 446–455. https://doi.org/10.1002/hon.2750
- Le Bris, Y., Normand, A., Bouard, L., Ménard, A., Bossard, C., Moreau, A., Béné, M.C., 2022. Aggressive, early resistant and relapsed mantle cell lymphoma distinct extrinsic microenvironment highlighted by transcriptome analysis. EJHaem 3, 1165–1171. https://doi.org/10.1002/jha2.549
- Le Gouill, S., Morschhauser, F., Chiron, D., Bouabdallah, K., Cartron, G., Casasnovas, O., Bodet-Milin, C., Ragot, S., Bossard, C., Nadal, N., Herbaux, C., Tessoulin, B., Tchernonog, E., Rossi, C., McCulloch, R., Gastinne, T., Callanan, M.B., Rule, S., 2021. Ibrutinib, obinutuzumab, and venetoclax in relapsed and untreated patients with mantle cell lymphoma: a phase 1/2 trial. Blood 137, 877–887. https://doi.org/10.1182/blood.2020008727
- 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., 2017. Rituximab after Autologous Stem-Cell Transplantation in Mantle-Cell Lymphoma. N Engl J Med 377, 1250–1260. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1701769
- Le, K., Sun, J., Khawaja, H., Shibata, M., Maggirwar, S.B., Smith, M.R., Gupta, M., 2021. Mantle cell lymphoma polarizes tumor-associated macrophages into M2-like macrophages, which in turn promote tumorigenesis. Blood Adv 5, 2863–2878. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003871
- LeBlanc, F.R., Hasanali, Z.S., Stuart, A., Shimko, S., Sharma, K., Leshchenko, V.V., Parekh, S., Fu, H., Zhang, Y., Martin, M.M., Kester, M., Fox, T., Liao, J., Loughran, T.P., Evans, J., Pu, J.J., Spurgeon, S.E., Aladjem, M.I., Epner, E.M., 2022. Combined epigenetic and immunotherapy for blastic and classical mantle cell lymphoma. Oncotarget 13, 986. https://doi.org/10.18632/oncotarget.28258
- Lenz, G., Davis, R.E., Ngo, V.N., Lam, L., George, T.C., Wright, G.W., Dave, S.S., Zhao, H., Xu, W., Rosenwald, A., Ott, G., Muller-Hermelink, H.K., Gascoyne, R.D., Connors,
J.M., Rimsza, L.M., Campo, E., Jaffe, E.S., Delabie, J., Smeland, E.B., Fisher, R.I., Chan, W.C., Staudt, L.M., 2008. Oncogenic CARD11 Mutations in Human Diffuse Large B Cell Lymphoma. Science 319, 1676–1679. https://doi.org/10.1126/science.1153629

- Lesokhin, A.M., Ansell, S.M., Armand, P., Scott, E.C., Halwani, A., Gutierrez, M., Millenson, M.M., Cohen, A.D., Schuster, S.J., Lebovic, D., Dhodapkar, M., Avigan, D., Chapuy, B., Ligon, A.H., Freeman, G.J., Rodig, S.J., Cattry, D., Zhu, L., Grosso, J.F., Bradley Garelik, M.B., Shipp, M.A., Borrello, I., Timmerman, J., 2016. Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study. J Clin Oncol 34, 2698–2704. https://doi.org/10.1200/JCO.2015.65.9789
- 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 populationbased study in France. Ann Hematol 93, 1327–1333. https://doi.org/10.1007/s00277-014-2049-5
- Li, P., Yuan, J., Ahmed, F.S., McHenry, A., Fu, K., Yu, G., Cheng, H., Xu, M.L., Rimm, D.L., Pan, Z., 2021. High Counts of CD68+ and CD163+ Macrophages in Mantle Cell Lymphoma Are Associated With Inferior Prognosis. Front Oncol 11, 701492. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.701492
- Li, X.-Y., Li, Y., Zhang, L., Liu, X., Feng, L., Wang, X., 2017. The antitumor effects of arsenic trioxide in mantle cell lymphoma via targeting Wnt/β-catenin pathway and DNA methyltransferase-1. Oncology Reports 38, 3114–3120. https://doi.org/10.3892/or.2017.5945
- Liu, Y., Zhou, X., Wang, X., 2021. Targeting the tumor microenvironment in B-cell lymphoma: challenges and opportunities. J Hematol Oncol 14, 125. https://doi.org/10.1186/s13045-021-01134-x
- López-Giral, S., Quintana, N.E., Cabrerizo, M., Alfonso-Pérez, M., Sala-Valdés, M., de Soria, V.G.G., Fernández-Rañada, J.M., Fernández-Ruiz, E., Muñoz, C., 2004. Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. Journal of Leukocyte Biology 76, 462–471. https://doi.org/10.1189/jlb.1203652
- Lork, M., Staal, J., Beyaert, R., 2019. Ubiquitination and phosphorylation of the CARD11-BCL10-MALT1 signalosome in T cells. Cellular Immunology, Special Issue: E3 ubiquitin ligases, the match makers and grim reapers of immune cells 340, 103877. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.11.001
- Lu, H.Y., Bauman, B.M., Arjunaraja, S., Dorjbal, B., Milner, J.D., Snow, A.L., Turvey, S.E., 2018. The CBM-opathies—A Rapidly Expanding Spectrum of Human Inborn Errors of Immunity Caused by Mutations in the CARD11-BCL10-MALT1 Complex. Front Immunol 9, 2078. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02078
- 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, M.C.J., Tadros, S., Bouska, A., Heavican, T., Yang, H., Deng, Q., Moore, D., Akhter, A., Hartert, K., Jain, N., Showell, J., Ghosh, S., Street, L., Davidson, M., Carey, C., Tobin, J., Perumal, D., Vose, J.M., Lunning, M.A., Sohani, A.R., Chen, B.J., Buckley, S., Nastoupil, L.J., Davis, R.E., Westin, J.R., Fowler, N.H., Parekh, S., Gandhi, M., Neelapu, S., Stewart, D., Bhalla, K., Iqbal, J., Greiner, T., Rodig, S.J., Mansoor, A., Green, M.R., 2021. Subtype-specific and co-occurring genetic alterations in B-cell non-Hodgkin lymphoma. Haematologica 107, 690–701. https://doi.org/10.3324/haematol.2020.274258
- Maman, S., Witz, I.P., 2018. A history of exploring cancer in context. Nat Rev Cancer 18, 359– 376. https://doi.org/10.1038/s41568-018-0006-7

- Mancini, S.J.C., Balabanian, K., Corre, I., Gavard, J., Lazennec, G., Le Bousse-Kerdilès, M.-C., Louache, F., Maguer-Satta, V., Mazure, N.M., Mechta-Grigoriou, F., Peyron, J.-F., Trichet, V., Herault, O., 2021. Deciphering Tumor Niches: Lessons From Solid and Hematological Malignancies. Front Immunol 12, 766275. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.766275
- Mansouri, L., Noerenberg, D., Young, E., Mylonas, E., Abdulla, M., Frick, M., Asmar, F., Ljungström, V., Schneider, M., Yoshida, K., Skaftason, A., Pandzic, T., Gonzalez, B., Tasidou, A., Waldhueter, N., Rivas-Delgado, A., Angelopoulou, M., Ziepert, M., Arends, C.M., Couronné, L., Lenze, D., Baldus, C.D., Bastard, C., Okosun, J., Fitzgibbon, J., Dörken, B., Drexler, H.G., Roos-Weil, D., Schmitt, C.A., Munch-Petersen, H.D., Zenz, T., Hansmann, M.-L., Strefford, J.C., Enblad, G., Bernard, O.A., Ralfkiaer, E., Erlanson, M., Korkolopoulou, P., Hultdin, M., Papadaki, T., Grønbæk, K., Lopez-Guillermo, A., Ogawa, S., Küppers, R., Stamatopoulos, K., Stavroyianni, N., Kanellis, G., Rosenwald, A., Campo, E., Amini, R.-M., Ott, G., Vassilakopoulos, T.P., Hummel, M., Rosenquist, R., Damm, F., 2016. Frequent NFKBIE deletions are associated with poor outcome in primary mediastinal B-cell lymphoma. Blood 128, 2666–2670. https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-704528
- Martin, P., Maddocks, K., Leonard, J.P., Ruan, J., Goy, A., Wagner-Johnston, N., Rule, S., Advani, R., Iberri, D., Phillips, T., Spurgeon, S., Kozin, E., Noto, K., Chen, Z., Jurczak, W., Auer, R., Chmielowska, E., Stilgenbauer, S., Bloehdorn, J., Portell, C., Williams, M.E., Dreyling, M., Barr, P.M., Chen-Kiang, S., DiLiberto, M., Furman, R.R., Blum, K.A., 2016. Postibrutinib outcomes in patients with mantle cell lymphoma. Blood 127, 1559– 1563. https://doi.org/10.1182/blood-2015-10-673145
- 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. The Journal of Immunology 177, 7303–7311. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7303
- Martín-Garcia, D., Navarro, A., Valdés-Mas, R., Clot, G., Gutiérrez-Abril, J., Prieto, M., Ribera-Cortada, I., Woroniecka, R., Rymkiewicz, G., Bens, S., de Leval, L., Rosenwald, A., Ferry, J.A., Hsi, E.D., Fu, K., Delabie, J., Weisenburger, D., de Jong, D., Climent, F., O'Connor, S.J., Swerdlow, S.H., Torrents, D., Beltran, S., Espinet, B., González-Farré, B., Veloza, L., Costa, D., Matutes, E., Siebert, R., Ott, G., Quintanilla-Martinez, L., Jaffe, E.S., López-Otín, C., Salaverria, I., Puente, X.S., Campo, E., Beà, S., 2019. CCND2 and CCND3 hijack immunoglobulin light-chain enhancers in cyclin D1– mantle cell lymphoma. Blood 133, 940–951. https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-862151
- Matsuoka, R., Sakamoto, N., Sakata-Yanagimoto, M., Chiba, S., Noguchi, M., Nakamura, N., 2020. An overlapping case of in situ mantle cell neoplasia and leukemic non-nodal mantle cell lymphoma. J Clin Exp Hematop 60, 169–173. https://doi.org/10.3960/jslrt.20022
- McHeyzer-Williams, M., Okitsu, S., Wang, N., McHeyzer-Williams, L., 2011. Molecular programming of B cell memory. Nat Rev Immunol 12, 24–34. https://doi.org/10.1038/nri3128
- McWilliams, E.M., Lucas, C.R., Chen, T., Harrington, B.K., Wasmuth, R., Campbell, A., Rogers, K.A., Cheney, C.M., Mo, X., Andritsos, L.A., Awan, F.T., Woyach, J., Carson, W.E., Butchar, J., Tridandapani, S., Hertlein, E., Castro, C.E., Muthusamy, N., Byrd, J.C., 2019. Anti–BAFF-R antibody VAY-736 demonstrates promising preclinical activity in CLL and enhances effectiveness of ibrutinib. Blood Adv 3, 447–460. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018025684
- Medina, D.J., Goodell, L., Glod, J., Gelinas, 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 B pathways. Haematologica 97, 1255–1263. https://doi.org/10.3324/haematol.2011.040659

- Medina, K.L., Singh, H., 2005. Genetic networks that regulate B lymphopoiesis. Curr Opin Hematol 12, 203–209. https://doi.org/10.1097/01.moh.0000160735.67596.a0
- Meitlis, I., Allenspach, E.J., Bauman, B.M., Phan, I.Q., Dabbah, G., Schmitt, E.G., Camp, N.D., Torgerson, T.R., Nickerson, D.A., Bamshad, M.J., Hagin, D., Luthers, C.R., Stinson, J.R., Gray, J., Lundgren, I., Church, J.A., Butte, M.J., Jordan, M.B., Aceves, S.S., Schwartz, D.M., Milner, J.D., Schuval, S., Skoda-Smith, S., Cooper, M.A., Starita, L.M., Rawlings, D.J., Snow, A.L., James, R.G., 2020. Multiplexed Functional Assessment of Genetic Variants in CARD11. Am J Hum Genet 107, 1029–1043. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.10.015
- Melchers, F., 2015. Checkpoints that control B cell development. J Clin Invest 125, 2203– 2210. https://doi.org/10.1172/JCI78083
- Merolle, M.I., Ahmed, M., Nomie, K., Wang, M.L., 2018. The B cell receptor signaling pathway in mantle cell lymphoma. Oncotarget 9, 25332–25341. https://doi.org/10.18632/oncotarget.25011
- Mesin, L., Ersching, J., Victora, G.D., 2016. GERMINAL CENTER B CELL DYNAMICS. Immunity 45, 471–482. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.001
- Mestre-Escorihuela, C., Rubio-Moscardo, F., Richter, J.A., Siebert, R., Climent, J., Fresquet, V., Beltran, E., Agirre, X., Marugan, I., Marín, M., Rosenwald, A., Sugimoto, K., Wheat, L.M., Karran, E.L., García, J.F., Sanchez, L., Prosper, F., Staudt, L.M., Pinkel, D., Dyer, M.J.S., Martinez-Climent, J.A., 2007. Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. Blood 109, 271–280. https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-026500
- Milne, C.D., Paige, C.J., 2006. IL-7: A key regulator of B lymphopoiesis. Seminars in Immunology, The Origin of Signals Predicting Life and Development of B Cell Precursors: Inside Out or Outside In? 18, 20–30. https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.10.003
- Mittal, S., Marshall, N.A., Duncan, L., Culligan, D.J., Barker, R.N., Vickers, M.A., 2008. Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. Blood 111, 5359–5370. https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-105395
- Mohanty, A., Sandoval, N., Das, M., Pillai, R., Chen, L., Chen, R.W., Amin, H.M., Wang, M., Marcucci, G., Weisenburger, D.D., Rosen, S.T., Pham, L.V., Ngo, V.N., 2016. CCND1 mutations increase protein stability and promote ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma. Oncotarget 7, 73558–73572. https://doi.org/10.18632/oncotarget.12434
- 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., Müschen, 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
- Mondragón, L., Mhaidly, R., De Donatis, G.M., Tosolini, M., Dao, P., Martin, A.R., Pons, C., Chiche, J., Jacquin, M., Imbert, V., Proïcs, E., Boyer, L., Doye, A., Luciano, F., Neels, J.G., Coutant, F., Fabien, N., Sormani, L., Rubio-Patiño, C., Bossowski, J.P., Muller, F., Marchetti, S., Villa, E., Peyron, J.-F., Gaulard, P., Lemonnier, F., Asnafi, V., Genestier, L., Benhida, R., Fournié, J.-J., Passeron, T., Ricci, J.-E., Verhoeyen, E., 2019. GAPDH Overexpression in the T Cell Lineage Promotes Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma through an NF-κB-Dependent Mechanism. Cancer Cell 36, 268-287.e10. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.07.008
- Morschhauser, F.A., Cartron, G., Thieblemont, C., Solal-Céligny, P., Haioun, C., Bouabdallah, R., Feugier, P., Bouabdallah, K., Asikanius, E., Lei, G., Wenger, M., Wassner-Fritsch, E., Salles, G.A., 2013. Obinutuzumab (GA101) Monotherapy in Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma or Mantle-Cell Lymphoma: Results From the Phase II GAUGUIN Study. JCO 31, 2912–2919. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.9585
- 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

- Mössner, E., Brünker, P., Moser, S., Püntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijenbroek, E., Ferrara, C., Sondermann, P., Jäger, C., Strein, P., Fertig, G., Friess, T., Schüll, C., Bauer, S., Dal Porto, J., Del Nagro, C., Dabbagh, K., Dyer, M.J.S., Poppema, S., Klein, C., Umaña, P., 2010. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell–mediated B-cell cytotoxicity. Blood 115, 4393–4402. https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-225979
- 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
- Nadeu, F., Martin-Garcia, D., Clot, G., Díaz-Navarro, A., Duran-Ferrer, M., Navarro, A., Vilarrasa-Blasi, R., Kulis, M., Royo, R., Gutiérrez-Abril, J., Valdés-Mas, R., López, C., Chapaprieta, V., Puiggros, M., Castellano, G., Costa, D., Aymerich, M., Jares, P., Espinet, B., Muntañola, A., Ribera-Cortada, I., Siebert, R., Colomer, D., Torrents, D., Gine, E., López-Guillermo, A., Küppers, R., Martin-Subero, J.I., Puente, X.S., Beà, S., Campo, E., 2020. Genomic and epigenomic insights into the origin, pathogenesis, and clinical behavior of mantle cell lymphoma subtypes. Blood 136, 1419–1432. https://doi.org/10.1182/blood.2020005289
- Nagata, S., 2018. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. Annu Rev Immunol 36, 489– 517. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053010
- Navarro, A., Beà, S., Jares, P., Campo, E., 2020. Molecular pathogenesis of Mantle Cell Lymphoma. Hematol Oncol Clin North Am 34, 795–807. https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.05.002
- Nemazee, D., 2017. Mechanisms of central tolerance for B cells. Nat Rev Immunol 17, 281– 294. https://doi.org/10.1038/nri.2017.19
- Niitsu, N., Iijima, K., Chizuka, A., 2001. A high serum-soluble interleukin-2 receptor level is associated with a poor outcome of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. European Journal of Haematology 66, 24–30. https://doi.org/10.1034/j.1600-0609.2001.00334.x
- Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., Corcoran, L.M., 2015. The generation of antibodysecreting 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
- Oeckinghaus, A., Ghosh, S., 2009. The NF-κB Family of Transcription Factors and Its Regulation. Cold Spring Harb Perspect Biol 1, a000034. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000034
- 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
- Pal Singh, S., Dammeijer, F., Hendriks, R.W., 2018. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. Mol Cancer 17. https://doi.org/10.1186/s12943-018-0779-z
- Palomba, M.L., Gordon, L.I., Siddiqi, T., Abramson, J.S., Kamdar, M., Lunning, M.A., Maloney, D.G., Andreadis, C., Arnason, J.E., Ghosh, N., Mehta, A., Solomon, S.R., Farazi, T., Garcia, J., Dehner, C., Ogasawara, K., Gao, J., Wang, M., 2020. Safety and Preliminary Efficacy in Patients with Relapsed/Refractory Mantle Cell Lymphoma Receiving Lisocabtagene Maraleucel in Transcend NHL 001. Blood 136, 10–11. https://doi.org/10.1182/blood-2020-136158
- Papin, A., Gouill, S.L., Chiron, D., 2018. Rationale for targeting tumor cells in their microenvironment for mantle cell lymphoma treatment. Leukemia & Lymphoma 59, 1064–1072. https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1357177
- Papin, A., Tessoulin, B., Bellanger, C., Moreau, A., Le Bris, Y., Maisonneuve, H., Moreau, P., Touzeau, C., Amiot, M., Pellat-Deceunynck, C., Le Gouill, S., Chiron, D., 2019. CSF1R

and BTK inhibitions as novel strategies to disrupt the dialog between mantle cell lymphoma and macrophages. Leukemia 33, 2442–2453. https://doi.org/10.1038/s41375-019-0463-3

- Passegué, E., Jamieson, C.H.M., Ailles, L.E., Weissman, I.L., 2003. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl Acad Sci U S A 100, 11842–11849. https://doi.org/10.1073/pnas.2034201100
- Pathria, P., Louis, T.L., Varner, J.A., 2019. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. Trends in Immunology 40, 310–327. https://doi.org/10.1016/j.it.2019.02.003
- Pérez-Galán, P., Dreyling, M., Wiestner, A., 2011. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. Blood 117, 26–38. https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-189977
- Petty, A.J., Yang, Y., 2017. Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy. Immunotherapy 9, 289–302. https://doi.org/10.2217/imt-2016-0135
- 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., Lo, P., Ford, R.J., 2003. Inhibition of Constitutive NF-kB Activation in Mantle Cell Lymphoma B Cells Leads to Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis. The Journal of Immunology 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
- Phillips, T., Barr, P.M., Park, S.I., Kolibaba, K., Caimi, P.F., Chhabra, S., Kingsley, E.C., Boyd, T., Chen, R., Carret, A.-S., Gartner, E.M., Li, H., Yu, C., Smith, D.C., 2019. A phase 1 trial of SGN-CD70A in patients with CD70-positive diffuse large B cell lymphoma and mantle cell lymphoma. Investigational New Drugs 37, 297. https://doi.org/10.1007/s10637-018-0655-0
- Phillips, T., Dickinson, M., Morschhauser, F., Bachy, E., Crump, M., Trněný, M., Bartlett, N.L., Zaucha, J., Humphrey, K., Perez-Callejo, D., Lundberg, L., Relf, J., Filézac de L'Étang, A., Carlile, D., Clark, E., Carlo-Stella, C., 2021. Glofitamab Step-up Dosing Induces High Response Rates in Patients (pts) with Relapsed or Refractory (R/R) Mantle Cell Lymphoma (MCL), Most of Whom Had Failed Prior Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor (BTKi) Therapy. Blood 138, 130. https://doi.org/10.1182/blood-2021-148949
- Pieters, T., T'Sas, S., Vanhee, S., Almeida, A., Driege, Y., Roels, J., Van Loocke, W., Daneels, W., Baens, M., Marchand, A., Van Trimpont, M., Matthijssens, F., Morscio, J., Lemeire, K., Lintermans, B., Reunes, L., Chaltin, P., Offner, F., Van Dorpe, J., Hochepied, T., Berx, G., Beyaert, R., Staal, J., Van Vlierberghe, P., Goossens, S., 2021. Cyclin D2 overexpression drives B1a-derived MCL-like lymphoma in mice. J Exp Med 218, e20202280. https://doi.org/10.1084/jem.20202280
- 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
- Postow, M.A., Callahan, M.K., Wolchok, J.D., 2015. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. J Clin Oncol 33, 1974–1982. https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4358
- Prevodnik, V.K., Lavrenčak, J., Horvat, M., Novakovič, B.J., 2011. The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas. Diagn Pathol 6, 33. https://doi.org/10.1186/1746-1596-6-33
- 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 25, 4455–4465. 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
- Queirós, A.C., Beekman, R., Vilarrasa-Blasi, R., Duran-Ferrer, M., Clot, G., Merkel, A., Raineri, E., Russiño, 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., Chun Chan, F., 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-KB-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 NFkB-signaling induces resistance to BCR-inhibitors in patients with mantle cell lymphoma. Cell Death Dis 9. https://doi.org/10.1038/s41419-017-0157-6
- Reimann, M., Schrezenmeier, J., Richter-Pechanska, P., Dolnik, A., Hick, T.P., Schleich, K., Cai, X., Fan, D.N.Y., Lohneis, P., Maßwig, S., Denker, S., Busse, A., Knittel, G., Flümann, R., Childs, D., Childs, L., Gätjens-Sanchez, A.-M., Bullinger, L., Rosenwald, A., Reinhardt, H.C., Schmitt, C.A., 2021. Adaptive T-cell immunity controls senescence-prone MyD88- or CARD11-mutant B-cell lymphomas. Blood 137, 2785– 2799. https://doi.org/10.1182/blood.2020005244
- Rinaldi, A., Kwee, I., Taborelli, 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., Bertoni, F., 2006. Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. British Journal of Haematology 132, 303– 316. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05883.x
- Rizzatti, E.G., Falcão, R.P., Panepucci, R.A., Proto-Siqueira, R., Anselmo-Lima, W.T., Okamoto, O.K., Zago, M.A., 2005. Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFβ signalling pathways. British Journal of Haematology 130, 516–526. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05630.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., 2015. Bortezomib-Based Therapy for Newly Diagnosed Mantle-Cell Lymphoma. N Engl J Med 372, 944– 953. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412096
- Roco, J.A., Mesin, L., Binder, S.C., Nefzger, C., Gonzalez-Figueroa, P., Canete, P.F., Ellyard, J., Shen, Q., Robert, P.A., Cappello, J., Vohra, H., Zhang, Y., Nowosad, C.R., Schiepers, A., Corcoran, L.M., Toellner, K.-M., Polo, J., Meyer-Hermann, M., Victora, G., Vinuesa, C.G., 2019. Class Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. Immunity 51, 337-350.e7. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.07.001

- Rodrigues, J.M., Nikkarinen, A., Hollander, P., Weibull, C.E., Räty, R., Kolstad, A., Amini, R.-M., Porwit, A., Jerkeman, M., Ek, S., Glimelius, I., 2021. Infiltration of CD163-, PD-L1and FoxP3-positive cells adversely affects outcome in patients with mantle cell lymphoma independent of established risk factors. British Journal of Haematology 193, 520–531. https://doi.org/10.1111/bjh.17366
- Roué, G., Sola, B., 2020. Management of Drug Resistance in Mantle Cell Lymphoma. Cancers 12, 1565. https://doi.org/10.3390/cancers12061565
- Royo, C., Salaverria, I., Hartmann, E.M., Rosenwald, A., Campo, E., Beà, S., 2011. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. Seminars in Cancer Biology, Mantle Cell Lymphoma 21, 322–334. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.09.007
- Rudelius, M., Rosenfeldt, M.T., Leich, E., Rauert-Wunderlich, H., Solimando, A.G., Beilhack, A., Ott, G., Rosenwald, A., 2018. Inhibition of focal adhesion kinase overcomes resistance of mantle cell lymphoma to ibrutinib in the bone marrow microenvironment. Haematologica 103, 116–125. https://doi.org/10.3324/haematol.2017.177162
- Rule, S., 2019. The modern approach to mantle cell lymphoma. Hematological Oncology 37, 66–69. https://doi.org/10.1002/hon.2596
- Rummel, M.J., de Vos, S., Hoelzer, D., Koeffler, H.P., Hofmann, W.-K., 2004. Altered Apoptosis Pathways in Mantle Cell Lymphoma. Leukemia & Lymphoma 45, 49–54. https://doi.org/10.1080/1042819031000151112
- 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-κB activation in mantle cell lymphoma. Blood 128, 82–92. https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-681460
- Sadeghi, L., Wright, A.P., 2021. Migration and Adhesion of B-Lymphocytes to Specific Microenvironments in Mantle Cell Lymphoma: Interplay between Signaling Pathways and the Epigenetic Landscape. Int J Mol Sci 22, 6247. https://doi.org/10.3390/ijms22126247
- Saleh, K., Cheminant, M., Chiron, D., Burroni, B., Ribrag, V., Sarkozy, C., 2022. Tumor Microenvironment and Immunotherapy-Based Approaches in Mantle Cell Lymphoma. Cancers (Basel) 14, 3229. https://doi.org/10.3390/cancers14133229
- Sanz, E., Muñoz-A., N., Monserrat, J., Van-Den-Rym, A., Escoll, P., Ranz, I., Álvarez-Mon, M., de-la-Hera, A., 2010. Ordering human CD34+CD10-CD19+ pre/pro-B-cell and CD19common lymphoid progenitor stages in two pro-B-cell development pathways. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 5925–5930. https://doi.org/10.1073/pnas.0907942107
- Scharer, C.D., Blalock, E.L., Mi, T., Barwick, B.G., Jenks, S.A., Deguchi, T., Cashman, K.S., Neary, B.E., Patterson, D.G., Hicks, S.L., Khosroshahi, A., Lee, F.E.-H., Wei, C., Sanz, I., Boss, J.M., 2019. Epigenetic programming underpins B cell dysfunction in human SLE. Nat Immunol 20, 1071–1082. https://doi.org/10.1038/s41590-019-0419-9
- Schwickert, T.A., Victora, G.D., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Mugnier, M.R., Gitlin, A.D., Dustin, M.L., Nussenzweig, M.C., 2011. A dynamic T cell–limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. 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
- Seifert, M., Küppers, R., 2016. Human memory B cells. Leukemia 30, 2283–2292. https://doi.org/10.1038/leu.2016.226
- Seifert, M., Scholtysik, R., Küppers, R., 2019. Origin and Pathogenesis of B Cell Lymphomas, in: Küppers, R. (Ed.), Lymphoma: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer, New York, NY, pp. 1–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9151-8_1
- Shapiro-Shelef, M., Calame, K., 2005. Regulation of plasma-cell development. Nat Rev Immunol 5, 230–242. https://doi.org/10.1038/nri1572

- Shin, H.G., Yang, H.R., Yoon, A., Lee, S., 2022. Bispecific Antibody-Based Immune-Cell Engagers and Their Emerging Therapeutic Targets in Cancer Immunotherapy. International Journal of Molecular Sciences 23, 5686. https://doi.org/10.3390/ijms23105686
- Shishodia, S., Amin, H.M., Lai, R., Aggarwal, B.B., 2005. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. Biochemical Pharmacology 70, 700–713. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.04.043
- Silkenstedt, E., Linton, K., Dreyling, M., 2021. Mantle cell lymphoma advances in molecular biology, prognostication and treatment approaches. British Journal of Haematology 195, 162–173. https://doi.org/10.1111/bjh.17419
- 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
- Sloot, Y.J.E., Smit, J.W., Joosten, L.A.B., Netea-Maier, R.T., 2018. Insights into the role of IL-32 in cancer. Seminars in Immunology, Hidden Dangers Signals that Promotes Inflammation and Cancer: Intracellular Alarmins 38, 24–32. https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.03.004
- 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-2Rα, IL-8, and MIP-1β Levels are Associated with Inferior Outcome and are Independent of MIPI Score in Patients with Mantle Cell Lymphoma. Am J Hematol 89, E223–E227. https://doi.org/10.1002/ajh.23838
- 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
- Steele, K.E., Tan, T.H., Korn, R., Dacosta, K., Brown, C., Kuziora, M., Zimmermann, J., Laffin, B., Widmaier, M., Rognoni, L., Cardenes, R., Schneider, K., Boutrin, A., Martin, P., Zha, J., Wiestler, T., 2018. Measuring multiple parameters of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers by image analysis. J Immunother Cancer 6. https://doi.org/10.1186/s40425-018-0326-x
- Tandler, C., Schmidt, M., Heitmann, J.S., Hierold, J., Schmidt, J., Schneider, P., Dörfel, D., Walz, J., Salih, H.R., 2020. Neutralization of B-Cell Activating Factor (BAFF) by Belimumab Reinforces Small Molecule Inhibitor Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. Cancers 12, 2725. https://doi.org/10.3390/cancers12102725
- Tessoulin, B., Papin, A., Gomez-Bougie, P., Bellanger, C., Amiot, M., Pellat-Deceunynck, C., Chiron, D., 2019. BCL2-Family Dysregulation in B-Cell Malignancies: From Gene Expression Regulation to a Targeted Therapy Biomarker. Front Oncol 8. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00645
- Thys, A., Douanne, T., Bidère, N., 2018. Post-translational Modifications of the CARMA1-BCL10-MALT1 Complex in Lymphocytes and Activated B-Cell Like Subtype of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Front Oncol 8, 498. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00498
- 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., Kuliczkowski, K., Giza, A., Milpied, N., Stelitano, C., Marks, R., Trümper, L., Biyukov, T., Patturajan, M., Bravo, M.-L.C., Arcaini, L., 2016. Lenalidomide versus investigator's choice in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL-002; SPRINT): a phase 2, randomised, multicentre trial. The Lancet Oncology 17, 319–331. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00559-8
- Turvey, S.E., Durandy, A., Fischer, A., Fung, S.-Y., Geha, R.S., Gewies, A., Giese, T., Greil, J., Keller, B., McKinnon, M.L., Neven, B., Rozmus, J., Ruland, J., Snow, A.L.,

Stepensky, P., Warnatz, K., 2014. The CARD11-BCL10-MALT1 (CBM) signalosome complex: Stepping into the limelight of human primary immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol 134, 276–284. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.06.015

- Upadhyay, R., Hammerich, L., Peng, P., Brown, B., Merad, M., Brody, J.D., 2015. Lymphoma: immune evasion strategies. Cancers (Basel) 7, 736–762. https://doi.org/10.3390/cancers7020736
- Vaca, A.M., Ioannou, N., Sivina, M., Vlachonikola, E., Clise-Dwyer, K., Kim, E., Li, D., Ma, Q., Ferrajoli, A., Estrov, Z., Wierda, W.G., Patten, P.E.M., Ramsay, A.G., Burger, J.A., 2022. Activation and expansion of T-follicular helper cells in chronic lymphocytic leukemia nurselike cell co-cultures. Leukemia 1–12. https://doi.org/10.1038/s41375-022-01519-y
- Valiño-Rivas, L., Vaquero, J.J., Sucunza, D., Gutierrez, S., Sanz, A.B., Fresno, M., Ortiz, A., Sanchez-Niño, M.D., 2019. NIK as a Druggable Mediator of Tissue Injury. Trends in Molecular Medicine 25, 341–360. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.02.005
- van der Horst, H.J., de Jonge, A.V., Hiemstra, I.H., Gelderloos, A.T., Berry, D.R.A.I., Hijmering, N.J., van Essen, H.F., de Jong, D., Chamuleau, M.E.D., Zweegman, S., Breij, E.C.W., Roemer, M.G.M., Mutis, T., 2021. Epcoritamab induces potent anti-tumor activity against malignant B-cells from patients with DLBCL, FL and MCL, irrespective of prior CD20 monoclonal antibody treatment. Blood Cancer J 11, 38. https://doi.org/10.1038/s41408-021-00430-6
- Victora, G.D., Nussenzweig, M.C., 2012. Germinal centers. Annu Rev Immunol 30, 429–457. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075032
- 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 Using a Photoactivatable Fluorescent Reporter. Cell 143, 592– 605. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.032
- Vidal-Crespo, A., Rodriguez, V., Matas-Cespedes, A., Lee, E., Rivas-Delgado, A., Giné, E., Navarro, A., Beà, S., Campo, E., López-Guillermo, A., Lopez-Guerra, M., Roué, G., Colomer, D., Pérez-Galán, P., 2017. The Bruton tyrosine kinase inhibitor CC-292 shows activity in mantle cell lymphoma and synergizes with lenalidomide and NIK inhibitors depending on nuclear factor-kB mutational status. Haematologica 102, e447– e451. https://doi.org/10.3324/haematol.2017.168930
- Vincent-Fabert, C., Roland, L., Zimber-Strobl, U., Feuillard, J., Faumont, N., 2019. Pre-clinical blocking of PD-L1 molecule, which expression is down regulated by NF-κB, JAK1/JAK2 and BTK inhibitors, induces regression of activated B-cell lymphoma. Cell Commun Signal 17, 89. https://doi.org/10.1186/s12964-019-0391-x
- 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.J., Tewis, M., Willemze, R., Kluin-Nelemans, J.C., 2000. Mantle cell lymphoma proliferates upon IL-10 in the CD40 system. Leukemia 14, 1483–1489. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401829
- Vose, J.M., 2017. Mantle cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. American Journal of Hematology 92, 806–813. https://doi.org/10.1002/ajh.24797
- 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., 2013. 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, 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. The Lancet Oncology 13, 716–723. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70200-0

- Wang, M., Munoz, J., Goy, A., Locke, F.L., Jacobson, C.A., Hill, B.T., Timmerman, J., Holmes, H., Jaglowski, S., Flinn, I., McSweeney, P.A., Miklos, D.B., Kersten, M.J., Bouabdallah, K., Topp, M.S., Shen, R., Kloos, I., Peng, W., Fang, X., Reagan, P.M., 2021. Outcomes with KTE-X19 in patients (pts) with relapsed/refractory (R/R) mantle cell lymphoma (MCL) in ZUMA-2 who had progression of disease within 24 months of diagnosis (POD24). JCO 39, 7547–7547. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.7547
- Wang, M., Munoz, J., Goy, A., Locke, F.L., Jacobson, C.A., Hill, B.T., Timmerman, J.M., Holmes, H., Jaglowski, S., Flinn, I.W., McSweeney, P.A., Miklos, D.B., Pagel, J.M., Kersten, M.J., Milpied, N., Fung, H., Topp, M.S., Houot, R., Beitinjaneh, A., Peng, W., Zheng, L., Rossi, J.M., Jain, R.K., Rao, A.V., Reagan, P.M., 2020. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. N Engl J Med 382, 1331–1342. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1914347
- Wang, M.L., Jurczak, W., Jerkeman, M., Trotman, J., Zinzani, P.L., Belada, D., Boccomini, C., Flinn, I.W., Giri, P., Goy, A., Hamlin, P.A., Hermine, O., Hernández-Rivas, J.-Á., Hong, X., Kim, S.J., Lewis, D., Mishima, Y., Özcan, M., Perini, G.F., Pocock, C., Song, Y., Spurgeon, S.E., Storring, J.M., Walewski, J., Zhu, J., Qin, R., Henninger, T., Deshpande, S., Howes, A., Le Gouill, S., Dreyling, M., 2022. Ibrutinib plus Bendamustine and Rituximab in Untreated Mantle-Cell Lymphoma. N Engl J Med 386, 2482–2494. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2201817
- Weniger, M.A., Wiestner, A., 2011. Molecular Targeted Approaches in Mantle Cell lymphoma. Semin Hematol 48, 214–226. https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2011.05.001
- Wilson, A., Trumpp, A., 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nat Rev Immunol 6, 93–106. https://doi.org/10.1038/nri1779
- 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. Clinical Cancer Research 17, 3956–3968. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3412
- Xue, J., Schmidt, S.V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T.D., Emde, M., Schmidleithner, L., Ganesan, H., Nino-Castro, A., Mallmann, M.R., Labzin, L., Theis, H., Kraut, M., Beyer, M., Latz, E., Freeman, T.C., Ulas, T., Schultze, J.L., 2014. Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. Immunity 40, 274–288. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.006
- 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. https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-740993
- Yan, H., Dong, M., Liu, X., Shen, Q., He, D., Huang, X., Zhang, E., Lin, X., Chen, Q., Guo, X., Chen, J., Zheng, G., Wang, G., He, J., Yi, Q., Cai, Z., 2019. Multiple myeloma cellderived IL-32γ increases the immunosuppressive function of macrophages by promoting indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression. Cancer Letters 446, 38–48. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.012
- Yang, Z.-Z., Novak, A.J., Ziesmer, S.C., Witzig, T.E., Ansell, S.M., 2007. CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce Foxp3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25- T cells. Blood 110, 2537–2544. https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-082578

- Yang, Z.-Z., Novak, A.J., Ziesmer, S.C., Witzig, T.E., Ansell, S.M., 2006. Attenuation of CD8+ T-Cell Function by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. Cancer Res 66, 10145–10152. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1822
- Yi, S., Yan, Y., Jin, M., Bhattacharya, S., Wang, Y., Wu, Y., Yang, L., Gine, E., Clot, G., Chen, L., Yu, Y., Zou, D., Wang, Jun, Phan, A.T., Cui, R., Li, F., Sun, Q., Zhai, Q., Wang, T., Yu, Z., Liu, L., Liu, W., Lyv, R., Sui, W., Huang, W., Xiong, W., Wang, H., Li, C., Xiao, Z., Hao, M., Wang, Jianxiang, Cheng, T., Bea, S., Herrera, A.F., Danilov, A., Campo, E., Ngo, V.N., Qiu, L., Wang, L., 2022. Genomic and transcriptomic profiling reveals distinct molecular subsets associated with outcomes in mantle cell lymphoma. J Clin Invest 132. https://doi.org/10.1172/JCI153283
- Young, R.M., Phelan, J.D., Wilson, W.H., Staudt, L.M., 2019. Pathogenic B cell receptor signaling in lymphoid malignancies: new insights to improve treatment. Immunol Rev 291, 190–213. https://doi.org/10.1111/imr.12792
- 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
- Zahoor, M., Westhrin, M., Aass, K.R., Moen, S.H., Misund, K., Psonka-Antonczyk, K.M., Giliberto, M., Buene, G., Sundan, A., Waage, A., Sponaas, A.-M., Standal, T., 2017. Hypoxia promotes IL-32 expression in myeloma cells, and high expression is associated with poor survival and bone loss. Blood Adv 1, 2656–2666. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017010801
- 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
- Zavidij, O., Haradhvala, N.J., Mouhieddine, T.H., Sklavenitis-Pistofidis, R., Cai, S., Reidy, M., Rahmat, M., Flaifel, A., Ferland, B., Su, N.K., Agius, M.P., Park, J., Manier, S., Bustoros, M., Huynh, D., Capelletti, M., Berrios, B., Liu, C.-J., He, M.X., Braggio, E., Fonseca, R., Maruvka, Y., Guerriero, J.L., Goldman, M., van Allen, E., McCarroll, S.A., Azzi, J., Getz, G., Ghobrial, I.M., 2020. Single-cell RNA sequencing reveals compromised immune microenvironment in precursor stages of multiple myeloma. Nat Cancer 1, 493–506. https://doi.org/10.1038/s43018-020-0053-3
- 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, 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., Xu, J., Zhu, H., Wang, Y., Wang, L., Fan, L., Wu, Y., Li, J., 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
- Zhang, Y., Garcia-Ibanez, L., Toellner, K., 2016. Regulation of germinal center B-cell differentiation. Immunol Rev 270, 8–19. https://doi.org/10.1111/imr.12396
- Zhang, Y., Garcia-Ibanez, L., Ulbricht, C., Lok, L.S.C., Pike, J.A., Mueller-Winkler, J., Dennison, T.W., Ferdinand, J.R., Burnett, C.J.M., Yam-Puc, J.C., Zhang, L., Alfaro, R.M., Takahama, Y., Ohigashi, I., Brown, G., Kurosaki, T., Tybulewicz, V.L.J., Rot, A., Hauser, A.E., Clatworthy, M.R., Toellner, K.-M., 2022. Recycling of memory B cells between germinal center and lymph node subcapsular sinus supports affinity maturation to antigenic drift. Nat Commun 13, 2460. https://doi.org/10.1038/s41467-022-29978-y
- 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

Zou, W., 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol 6, 295–307. https://doi.org/10.1038/nri1806



Titre : Etude de la résistance dans le Lymphome à Cellules du Manteau : Rôle des voies NFkB dépendantes d'anomalies génomiques et du microenvironnement

Mots clés : Lymphome B, Lymphocytes T, Macrophages, Thérapie ciblée, CARD11, BCL2A1, IL32

Résumé : Le Lymphome à Cellules du Manteau (LCM) est un lymphome non hodgkinien rare, agressif et de mauvais pronostic. Malgré des progrès thérapeutiques ces dernières années, les patients rechutent systématiquement. Les nouvelles technologies haut débit dites 'omiques' ont permis d'identifier les anomalies intrinsèques à la cellule tumorale définissant la carte d'identité de ce Lymphome. D'autre part, plusieurs travaux ont mis en évidence un rôle majeur du microenvironnement démontrant la nécessité de considérer la tumeur comme un écosystème. Ainsi, des études récentes ont confirmé le rôle majeur du microenvironnement dans le soutien de la survie, la prolifération et la chimiorésistance des cellules de LCM.

Au cours de mon doctorat, j'ai tout d'abord étudié les interactions et le dialogue soluble entre les cellules de LCM, les lymphocytes T et les macrophages au sein de la niche tumorale.

Ce premier projet, basé sur des techniques de cocultures de cellules primaires et d'immunohistochimie, a mis en avant le rôle protumoral de l'axe IL32/BAFF contrôlé par la voie NFkB2. J'ai également participé à un projet de recherche des déterminants de la réponse aux traitements ciblant CD20/BCL2/ BTK. Dans cette deuxième étude, en intégrant des analyses génomiques, transcriptomiques à résolution de la cellule unique et la fonctionnelles, j'ai démontré le rôle central de la signalisation CARD11/NFkB1/BCL2A1 dans la résistance.

Enfin, l'étude de ces anomalies d'origines génomiques et microenvironnementales m'a permis de proposer des stratégies thérapeutiques alternatives basées sur les mécanismes de résistance et ciblant les protéines MALT1 et NIK, toutes deux impliquées dans la signalisation NFkB.

Title : Therapeutic resistance in Mantle Cell Lymphoma : Central role of NFkB pathways dependent on both genomic alterations and microenvironment

Keywords : B Lymphoma, T Lymphocytes, Macrophages, Targeted therapies, CARD11, BCL2A1, IL32

Abstract: Mantle Cell Lymphoma (MCL) is a rare and aggressive non-Hodgkin's lymphoma prognosis. Despite recent with а poor therapeutic advances, patients systematically technologies relapse. Novel 'omics' have identified intrinsic tumor anomalies, thus defining the identity card of this lymphoma. In addition, several studies have highlighted a major role of the microenvironment demonstrating the necessity to consider the tumor as an ecosystem. Recent studies have confirmed the major role of the microenvironment in the survival, proliferation and chemoresistance of MCL cells. During my PhD training, I first studied the interactions and the soluble dialogue between MCL cells, T cells and macrophages within the tumor niche.

A first project, based on primary cell coculture and immunohistochemistry, highlighted the protumoral role of the IL32/BAFF axis controlled by NFkB2 pathway.

I also participated in a project to investigate the determinants of response to CD20/BCL2/BTK targeted therapies. In this second study, by integrating genomic, single cell transcriptomic and functional analyses, I demonstrated the central role of CARD11/NFkB1/BCL2A1 signaling in resistance.

Finally, studying both genomic and microenvironmental anomalies allowed me to propose alternative therapeutic strategies based on mechanisms of resistance and targeting MALT1 and NIK proteins, both involved in NFkB signaling.