

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe MAUPAS »

Année 2020

N°56

MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES

Spécialité biologie médicale

TENANT LIEU DE THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

GENEBRIER Steve-Alexandre, né le 10/06/1993 à Beaumont (63110)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 21/10/2020

Dialogue tumeur – microenvironnement dans le lymphome folliculaire :
interaction BCR / DC-SIGN

JURY

Président	Monsieur le Professeur Gilles THIBAUT Faculté de Pharmacie, Tours
Directeur de thèse	Madame le Professeur Karin TARTE Faculté de Médecine, Rennes
Membres	Monsieur le Professeur Hervé WATIER Faculté de Médecine, Tours Monsieur le Docteur Mikaël ROUSSEL Faculté de Médecine, Rennes

ANNEE : 2019 - 2020

Directrice : Pr Véronique MAUPOIL

Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS

Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN

ENSEIGNANTS

17 PROFESSEURS

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	PHARMACOGNOSIE
GIRAUDEAU	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAULT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

2 PROFESSEURS EMERITES

AGAFONOV	Viatcheslav	CHIMIE PHYSIQUE
GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES

38 MAITRES DE CONFERENCES

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BOUESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE

DELAYE
DENEVAULT
DOUZIECH-EYROLLES
DUMAS
GERMON
GLEVAREC
HERVE-AUBERT
JUSTE
LAJOIE
LANOUE
MARC
MARCHAIS
MAVEL
MUNNIER
OMBETTA-GOKA
OUDIN
PASQUALIN
PRIE
RESPAUD
SOUCE
TAUBER
VELGE-ROUSSEL
VERCOUILLIE
VERGOTE
VIERRON
ZHANG

Pierre-Olivier
Caroline
Laurence
Jean-François
Stéphanie
Gaëlle
Katel
Matthieu
Laurie
Arnaud
Jillian
Hervé
Sylvie
Emilie
Jean-Edouard
Audrey
Côme
Gildas
Renaud
Martin
Clovis
Florence
Johnny
Jackie
Emilie
Bei-Li

CHIMIE THERAPEUTIQUE
CHIMIE THERAPEUTIQUE
AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
PHARMACIE GALENIQUE
CHIMIE THERAPEUTIQUE
PHARMACIE GALENIQUE
CHIMIE ORGANIQUE
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PHARMACOLOGIE
CHIMIE ORGANIQUE
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
PHARMACOLOGIE

1 DIRECTEUR DE RECHERCHE

CHALON

Sylvie

INSERM

2 CHARGES DE RECHERCHE

MEVELEC
MOIRE

Marie-Noëlle
Nathalie

INRA
INRA

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN

Susan

ANGLAIS

3 AHU

FOUCAULT
FOUCAULT-FRUCHARD
MARLET

Amélie
Laura
Julien

HEMATOLOGIE
PHARMACIE CLINIQUE
MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

4 ATER

BILLET
DRIOUCH
LAKHRIF
VERGES

Kevin
Abderrazzak
Zineb
Valentin

BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
FORMATIONS BIO3 INSTITUTE
BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

***D'**honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;*

***D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

***De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

***En** aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;*

***De** ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

***De** faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

***De** coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

***Que** les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.*

Date : 21/10/2020

L'étudiant

M Steve-Alexandre Genebrier

Le Doyen de la Faculté

Mme Véronique Maupoil

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le **Pr Gilles Thibault**, Professeur des Universités de Pharmacie de Tours, qui me fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie également le **Pr Hervé Watier**, Professeur des Universités de Médecine de Tours, Chef de service du laboratoire d'immunologie du CHU de Tours, d'avoir accepté de porter un regard sur ce travail en participant à ce jury.

J'adresse toute ma reconnaissance au **Pr Karin Tarte**, Professeur des Universités de Médecine de Rennes, Chef de service du laboratoire d'immunologie du CHU de Rennes, pour m'avoir guidé au cours de ce travail et pour m'avoir soutenu depuis mon arrivée en Bretagne. Merci de m'avoir fait une place au sein de l'équipe.

Je suis également très reconnaissant envers le **Dr Mikaël Roussel**, Praticien Hospitalier au laboratoire d'hématologie du CHU de Rennes, pour tous ses conseils et pour son soutien moral, si précieux quand les expériences étaient capricieuses.

Je voudrais avoir un message de remerciement pour tous ceux qui m'ont apporté une aide logistique au cours de ce travail : **Simon Le Gallou** pour sa relecture des protocoles et son aide en cytométrie, **Jean-Philippe Guégan** pour m'avoir épaulé dans les expériences d'internalisation, **Céline Monvoisin** pour son aide indispensable lors de l'utilisation du système Biomark®, **Céline Pangault** et les **techniciennes de biothèque** pour la mise à disposition des échantillons de patients et plus globalement à chaque membre de **l'équipe de l'unité U1236**, que j'ai forcément dû solliciter à un moment.

Je remercie bien sûr la **fondation ARC** pour le financement qu'elle m'a accordé en Master 2, période pendant laquelle j'ai réalisé une grande partie de ce travail.

J'aurai aussi un mot pour tous mes maîtres en immunologie, au premier rang desquels **Paul Rouzaire, Richard Lemal** et **Frédéric Coutant**, qui m'ont tant appris et qui m'ont encouragé à poursuivre dans cette voie. Je les en remercie chaleureusement. Mais je n'oublie pas **Pascale Jeannin** et **Alain Chevailler** à Angers, ou **Isabelle Bahon, Delphine Monnier, Patricia Amé-Thomas, Mylène de Saint-Jore, Cédric Ménard** et **Erwan Dumontet** à Rennes, qui m'ont tous fait progresser. Je suis ravi de retrouver très bientôt l'équipe rennaise.

Mon passage au laboratoire CEDI (hôpital Necker) lors de mon interCHU a aussi été riche en maîtres d'immunologie. Merci à **Capucine Picard** et **Jacinta Bustamante** pour leur bienveillance et leur enseignement d'un niveau exceptionnel. Merci à **Mathieu Fusaro**, meilleur AHU de tous les temps. J'espère pouvoir être un AHU aussi bon que toi mais cela ne va pas être simple tellement tu as placé la barre haut. Merci aux **techniciennes du CEDI (Corinne, Nathalie, Marion, Lauriane, Coralie)** qui m'ont appris tant de choses. C'est un honneur d'avoir travaillé avec vous et d'avoir pu constater de mes yeux votre incroyable expertise.

Mon internat s'achevant, je voudrais revenir sur la chance que j'ai eu d'avoir rencontré des cointernes aussi attachants. A toute la *dreamteam* d'Angers (**Maeva, Ludivine, Mathieu, Benjamin, Jérémy, Xavier, Maxime, Etienne, Cindy**) et à tous mes cointernes rennais (**Adeline, Jessica, Anne-Sophie, Zahida, Juliette V, Michel, Guillaume...**), merci d'avoir fait de mon internat une période aussi agréable et pleine de bons souvenirs.

Les mêmes remarques accompagnent mes amies **Gaëlle, Florence, Anne** et **Morgane** avec qui j'ai eu la joie de partager mes études de pharmacie dans ma belle Auvergne natale.

Je tenais aussi à dédier un petit paragraphe à **Juliette Ferrant**, « ma Ju ». Bien sûr tu m'as considérablement aidé lors des expérimentations et lors de l'analyse multidimensionnelle des données de CyTOF mais je voudrais surtout te remercier d'être là, drôle, indépendante, forte, faisant toujours preuve de recul et de discernement. C'est simple, si tu n'étais pas communiste, tu serais parfaite ! J'espère que nous travaillerons et parlerons politique ensemble encore longtemps.

Enfin je voudrais remercier ma famille. Ma **grand-mère Germaine**, qui, en regardant avec moi les émissions « C'est pas sorcier » lorsque j'étais un tout jeune enfant, ne se doutait pas qu'elle éveillerait à ce point ma curiosité et mon attrait pour les sciences.

A mes **parents Mireille et Jean**, pour avoir toujours été l'incarnation même de la valeur travail et pour m'avoir toujours soutenu. Je ne peux que me sentir privilégié d'avoir pu étudier, grâce à eux, dans des conditions matérielles optimales.

A mon **frère Jason**, pour nos souvenirs d'enfance si précieux, pour ton soutien indéfectible et pour ta franchise.

A ma **tante Elisabeth** et mon **oncle Christian**, pour toute l'affection que vous m'avez toujours témoignée. Elle est réciproque.

A mon **mari Alex**, pour être l'homme le plus bienveillant que je connaisse. Merci d'avoir fait de moi quelqu'un de meilleur. Je suis tellement chanceux que tu partages ma vie.

Table des matières

Remerciements	5
Table des matières	7
Liste des abréviations	9
Liste des figures	11
Liste des tableaux	12
I. Généralités sur le lymphome folliculaire	13
1) Définition	13
2) Epidémiologie	13
3) Clinique	14
4) Diagnostic	14
5) Pronostic	16
6) Traitement	18
II. Lymphomagenèse du FL	20
1) Translocation du gène <i>BCL2</i>	20
2) Perturbations épigénétiques	22
3) Acquisition d'un BCR N-glycosylé	24
III. Microenvironnement du FL	26
Objectifs et hypothèse de travail	29
Matériel et méthodes	30
1) Cellules et lignées	30
a) Cellules nécessaires à la validation du panel CyTOF	30
b) Cellules nécessaires pour étudier l'aspect fonctionnel de l'interaction BCR / DC-SIGN	31
c) OLS de patients	31
2) Polarisation des monocytes en macrophages	32
3) Purification des lymphocytes B	33
4) Préparation d'un échantillon OLS pour marquage CyTOF	33
a) Dissociation mécano-enzymatique	33
b) Saturation des FcγR et déplétion CD3/CD19	34
5) Cytométrie de masse (CyTOF)	34
6) Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)	37

7) Cytométrie en flux.....	40
8) Internalisation de DC-SIGN.....	41
9) Analyses bio-informatiques et statistiques	41
Résultats	42
1) Mise en place du marquage DC-SIGN en CyTOF	42
2) Hétérogénéité des cellules DC-SIGN ^{pos} au sein des ganglions de FL	45
3) Mise en place de modèles myéloïdes mimant les TAM de FL.....	48
a) Proximité d'expression génique entre les macrophages M-IL4 et M-FL, les lignées U937 et U937 DC-SIGN et les TAM	49
b) Caractérisation du phénotype des différents types de macrophages polarisés <i>in vitro</i>	50
c) Proximité phénotypique des lignées U937 et U937 DC-SIGN avec les macrophages M-IL4 et M-FL.....	52
4) Absence d'internalisation de DC-SIGN après interaction avec un BCR mannosylé	53
a) La lignée L3055 n'entraîne pas l'internalisation de DC-SIGN chez les monoblastes U937-DC-SIGN53	
b) Les lymphocytes B de FL n'entraînent pas l'internalisation de DC-SIGN chez les macrophages M-IL4.....	55
Discussion	57
Conclusion	61
Bibliographie	62

Liste des abréviations

ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*)

ADCP : phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (*antibody-dependent cellular phagocytosis*)

AID : cytidine désaminase induite par l'activation (*activation-induced cytidine deaminase*)

BAFF : *B-cell activating factor*

BCL2 : *B-cell CLL/lymphoma 2*

BCR : récepteur à l'antigène du lymphocyte B (*B cell receptor*)

B-R : bendamustine, rituximab

BTK : *Bruton tyrosine kinase*

CAR-T cells : cellules T à récepteur antigénique chimérique (*chimeric antigen receptor-T cells*)

CRD : domaine de reconnaissance des carbohydrates (*carbohydrate recognition domain*)

CPC : *cancer precursors cells*

CSR : commutation de classe (*class-switch recombination*)

DC-SIGN : *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*

DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules (*diffuse large B-cell lymphoma*)

FcγR : récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines G

FDG : 18-fluorodesoxyglucose

FISH : hybridation fluorescente in situ (*fluorescent in situ hybridization*)

FL : lymphome folliculaire (*follicular lymphoma*)

FLIPI : *follicular lymphoma international prognostic Index*

FLLC : *FL-like cells*

GC : centre germinatif (*germinal center*)

GELF : groupe d'étude des lymphomes folliculaires

GWAS : *genome wide association study*

HLA : *human leukocyte antigen*

HPF : champ microscopique (*high-power field*)

iDC : cellules dendritiques immatures (*immature dendritic cells*)

IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase

iNOS : NO synthétase inductible

ISFN : *in situ follicular neoplasia*

LOF : perte de fonction (*loss of function*)

MFI : intensité moyenne de fluorescence (*mean fluorescence intensity*)

NGS : *next-generation sequencing*

NHEJ : *non-homologous end joining*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OLS : organes lymphoïdes secondaires

PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*)

PGE₂ : prostaglandine E₂

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PRIMA-PI : PRIMA-prognostic index

qPCR : *quantitative polymerase chain reactive*

R-CHOP : rituximab, cyclophosphamide, hydroxydoxorubicine, vincristine, prednisone

R-CVP : rituximab, cyclophosphamide, vincristine, prednisone

rLN : ganglion réactionnel (*reactive lymph node*)

RMFI : ratio d'intensité moyenne de fluorescence

TAM : macrophages associés aux tumeurs (*tumor-associated macrophages*)

TEP-scanner : scanner par tomographie d'émission de positons

Lymphocytes T_{FH} : lymphocytes T auxiliaires folliculaires (*follicular helper*)

viSNE : *visualization of t-distributed stochastic neighbor embedding*

Liste des figures

Figure 1. Caractéristiques histologiques du lymphome folliculaire, d'après (19).

Figure 2. Mécanisme de translocation t(14;18), d'après (58).

Figure 3. Principales modifications épigénétiques du FL et leurs conséquences, d'après (80).

Figure 4. Lymphomagenèse du lymphome folliculaire, d'après (17).

Figure 5. Interaction entre la lectine DC-SIGN exprimée par les macrophages et le BCR mannosylé porté par les lymphocytes B de FL, d'après (51).

Figure 6. Paradoxe allélique dans le lymphome folliculaire, d'après (68).

Figure 7. Signaux protumoraux délivrés par la niche du FL, d'après (135).

Figure 8. Interaction bidirectionnelle BCR mannosylé / DC-SIGN dans le contexte du lymphome folliculaire - schéma adapté de (136).

Figure 9. Schéma du protocole de polarisation de monocytes en macrophages.

Figure 10. Discrimination des populations cellulaires par les marqueurs du panel de cytométrie de masse (CyTOF).

Figure 11. Absence de marquage membranaire DC-SIGN sur cellules myéloïdes (CD3^{neg} CD19^{neg}) issues d'OLS après dissociation mécano-enzymatique (représentation viSNE).

Figure 12. Titration CyTOF de l'anticorps anti-DC-SIGN (CD209 ; concentration 2 µg/mL).

Figure 13. Impact de la dissociation sur le marquage DC-SIGN en cytométrie en flux.

Figure 14. Discrimination des cellules DC-SIGN^{pos} au sein d'un mélange de plusieurs types cellulaires grâce au panel CyTOF - marquage DC-SIGN intracellulaire (représentation viSNE).

Figure 15. Expression de DC-SIGN en cytométrie de masse (CyTOF) au sein d'OLS de FL et de rLN, après exclusion des lymphocytes résiduels (cellules CD3^{neg} CD19^{neg}).

Figure 16. Hétérogénéité des cellules DC-SIGN^{pos} au sein des OLS de FL et de rLN.

Figure 17. Comparaison de l'expression génique des modèles macrophagiques et des cellules U937 et U937 DC-SIGN (représentation *heatmap*).

Figure 18. Différences phénotypiques entre les polarisations macrophagiques (CyTOF).

Figure 19. Différences phénotypiques entre les polarisations macrophagiques et les cellules U937 et U937 DC-SIGN (CyTOF).

Figure 20. Liaison de rhDC-SIGN aux lignées de lymphome de Burkitt, BL2 et L3055.

Figure 21. Evolution du RMFI DC-SIGN des monoblastes U937 DC-SIGN après cocultures.

Figure 22. Liaison de rhDC-SIGN aux lymphocytes B de FL et aux lignées BL2 et L3055.

Figure 23. Evolution du RMFI DC-SIGN des macrophages M-IL4 après cocultures.

Liste des tableaux

Tableau I. Grades histologiques du lymphome folliculaire selon l’OMS, d’après (5).

Tableau II. Système d’évaluation du stade des lymphomes, d’après (22).

Tableau III. Scores pronostiques du lymphome folliculaire, d’après (6).

Tableau IV. Indications de traitement du lymphome folliculaire, d’après (18).

Tableau V. Gènes de régulation épigénétique fréquemment mutés dans le lymphome folliculaire, d’après (52).

Tableau VI. Principales interactions protumorales entre le FL et son microenvironnement.

Tableau VII. Cellules utilisées pour la validation du panel CyTOF.

Tableau VIII. Lignées cellulaires utilisées pour évaluer l’interaction BCR/DC-SIGN.

Tableau IX. Caractéristiques des OLS de patients utilisés.

Tableau X. Agents de stimulation utilisés pour polariser les monocytes en macrophages.

Tableau XI. Panel de cytométrie de masse (CyTOF) utilisé pour la caractérisation des cellules myéloïdes et stromales des OLS.

Tableau XII. Liste des primers Taqman utilisés pour la PCR quantitative haut débit.

Tableau XIII. Liste des sondes utilisées en cytométrie en flux.

.

I. Généralités sur le lymphome folliculaire

1) Définition

Le lymphome folliculaire (FL) est une lymphoprolifération à cellules B matures ayant pour origine le centre germinatif (GC) (1). Composé à la fois de centrocytes et de centroblastes, il doit son nom à son organisation histologique d'aspect folliculaire (2).

Le FL est un lymphome indolent : son évolution est lente et caractérisée par des rechutes. Malgré les avancées thérapeutiques des dernières décennies, ce cancer demeure hélas incurable à l'heure actuelle (3).

2) Epidémiologie

Il s'agit du 2^{ème} lymphome le plus fréquent derrière le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) (4), un autre lymphome du centre germinatif. Représentant 20% des cas de lymphomes et 70% des lymphomes indolents (5), son incidence est estimée à environ 3500 nouveaux cas par an en France (6).

Le FL est une hémopathie maligne du sujet relativement âgé avec une médiane d'âge de survenue de 65 ans (4). Il existe une légère prédominance masculine (*sex ratio* à 1,2) (4).

Le risque de développer un FL est 4 fois plus élevé chez les apparentés au 1^{er} degré d'un patient atteint de FL que dans la population générale (7). Un tel surrisque s'explique par des facteurs génétiques, objectivés par des études d'association pangénomique (GWAS). Ces études ont retrouvés des polymorphismes génétiques dans la région du HLA (8) et dans des loci proches d'oncogènes (9).

Des facteurs environnementaux sont aussi suspectés de moduler le développement de la maladie. En effet des différences de mode de vie pourraient expliquer la fréquence accrue du FL observée en Occident par rapport à l'Asie (10) puisque la génétique seule ne peut expliquer l'incidence de la maladie nettement plus élevée chez les Asiatiques nés aux Etats-Unis que chez ceux nés en Asie (11).

Plusieurs substances chimiques ont ainsi été ponctuellement incriminées, comme le tabac (12) ou les teintures pour cheveux (13), avec parfois des résultats discordants, comme c'est le cas avec l'exposition aux pesticides (14,15). La méta-analyse issue de l'InterLymph Consortium (16) a confirmé la place du tabac au rang des facteurs de risque et a mis en évidence d'autres associations plus ou moins inattendues : indice de masse corporel élevé au début de l'âge adulte, antécédent de syndrome de Gougerot-Sjögren, être peintre au pistolet, être médecin depuis plus de 10 ans.

3) Clinique

En tant que lymphome indolent, le FL se développe lentement. Il est caractérisé par une longue phase asymptomatique qui précède sa révélation clinique (17).

Les premiers symptômes sont d'ailleurs assez légers : l'entrée dans la maladie se limite souvent à des adénopathies paucisymptomatiques, parfois découvertes de manière fortuite lors d'un examen d'imagerie, pouvant fluctuer pendant des années en l'absence de traitement (3,17). Si tous les ganglions lymphatiques peuvent être atteints, la majorité des patients présente une forme périphérique (5).

Les signes généraux, comme les « signes B » de la classification d'Ann-Arbor (fièvre, sueurs nocturnes profuses ou amaigrissement supérieur à 10%), ne sont pas fréquents (3).

Malgré cette expression clinique assez discrète, la maladie est souvent déjà disséminée avec une atteinte médullaire dans 70% des cas au diagnostic, possiblement responsable de cytopénies (3,5,17).

D'autres atteintes extranodales sont possibles mais peu fréquentes. Certaines de ces localisations représentent des cas particuliers de FL – comme le FL cutané, le FL testiculaire ou le FL duodénal – et sont d'excellent pronostic (6).

4) Diagnostic

Le diagnostic de FL repose sur l'analyse histologique de la biopsie d'une masse ganglionnaire suspecte qui mettra en évidence la prolifération maligne (18).

L'examen microscopique révèle ainsi un effacement de l'architecture normale du ganglion par des follicules néoplasiques composés de centrocytes, petites cellules au noyau clivé, et/ou de centroblastes, grandes cellules au noyau ovoïde avec plusieurs nucléoles (19). Ces follicules malins sont caractérisés par une zone du manteau réduite, une perte de polarisation zone claire / zone sombre et l'absence de macrophages à corps tingibles (19) (figure 1).

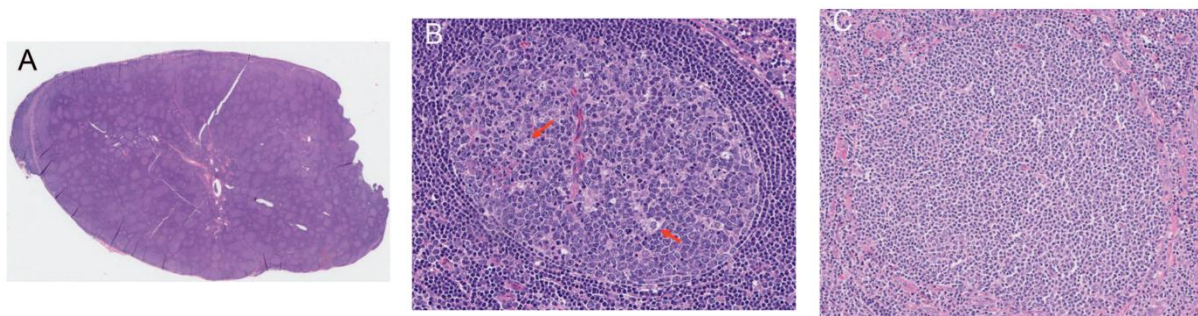


Figure 1. Caractéristiques histologiques du lymphome folliculaire, d'après (19).

A. Nombreux follicules néoplasiques contigus

B. Follicule réactionnel avec un centre germinatif polarisé (zone claire et zone sombre), une zone du manteau bien délimitée et des macrophages à corps tingibles (flèches rouges)

C. Follicule néoplasique sans polarisation avec répartition chaotique des centrocytes et des centroblastes, perte de la zone du manteau et absence de macrophages à corps tingibles

Coloration à l'hématoxyline/éosine ; grossissement x1 pour A et x200 pour B et C

Le nombre de centroblastes par champ microscopique (grossissement x40 soit 0,159 mm²) permet de distinguer 3 grades de FL, le grade 3 étant subdivisé en deux sous-groupes en fonction de la présence résiduelle de centrocytes (5) (tableau I). A noter que les FL de grade 3B sont considérés comme plus agressifs et traités comme des DLBCL (3,18).

Au diagnostic, la grande majorité des patients appartiennent aux grades 1/2 (20).

Grading	Definition
Grade 1-2 (low grade)	0-15 centroblasts per HPF
1	0-5 centroblasts per HPF
2	6-15 centroblasts per HPF
Grade 3	> 15 centroblasts per HPF
3A	Centrocytes present
3B	Solid sheets of centroblasts

Tableau I. Grades histologiques du lymphome folliculaire selon l'OMS, d'après (5).

HPF : champ microscopique (*high-power field*), grossissement x40 soit 0,159 mm²

Afin de caractériser correctement le profil de prolifération et le grade, l'exérèse chirurgicale doit être préférée à la cytoponction ganglionnaire (18). Malgré ses limites, la biopsie à l'aiguille guidée par scanner reste tout de même utile dans les cas où les ganglions suspects sont profonds et chez les patients âgés ou avec comorbidités ne pouvant être opérés (19).

Des colorations en immunohistochimie permettent d'apprécier le phénotype des cellules lymphomateuses, classiquement comme suit : CD3⁺ CD5⁺ CD10⁺ CD19⁺ CD20⁺ CD23⁺ CD43⁺ CD79a⁺ BCL2⁺ BCL6⁺ cycline-D1⁺ (2,18,19). A noter que l'intensité et la fréquence de positivité du marquage CD10 et BCL2 diminuent avec l'augmentation de grade (19). De plus, bien qu'il existe d'authentiques FL BCL2 négatifs, il est nécessaire de contrôler une négativité du marquage BCL2 devant une suspicion de FL avec d'autres anticorps anti-BCL2 afin éliminer une éventuelle mutation de l'épitope BCL2 reconnu (19).

L'index de prolifération Ki-67 peut aussi être déterminé en immunohistochimie. Il est corrélé aux grades de l'OMS : il est inférieur à 20% dans la plupart des grades 1/2 et supérieur à 20% dans la plupart des grades 3 (19).

Des analyses cytogénétiques sont parfois réalisées : un caryotype décrira la translocation t(14;18)(q32;q21) tandis qu'une FISH localisera le produit de fusion de cette translocation, le gène *IGH-BCL2* (17,18). Cette translocation est retrouvée dans plus de 90% des cas, mais, bien qu'emblématique du FL pour son rôle dans la lymphomagenèse, elle n'est pas pathognomonique et n'est ni nécessaire ni suffisante pour poser le diagnostic de FL (6).

La dissémination sanguine au diagnostic est rare (moins de 10% des cas) et de mauvais pronostic (21). Le frottis sanguin permet d'observer les centrocytes, lymphocytes à noyau clivé (aspect en « grain de café ») et la cytométrie en flux précise leur monotypie et leur phénotype (17).

5) Pronostic

La dissémination des lymphomes s'évalue selon la classification de Lugano (22).

Comme le FL est un lymphome FDG-avide, il est recommandé de réaliser un TEP-scanner pour identifier les éventuels ganglions atteints de petit volume qui ne seraient pas repérés comme malins au scanner (6,22).

Le bilan d'extension comprend aussi la réalisation d'une biopsie ostéomédullaire pour mettre en évidence un possible envahissement médullaire, présent dans près de 70% des cas au diagnostic (3).

Ces deux examens réalisés, on peut classer le FL en deux catégories : FL de stade limité (I/II) ou FL de stade avancé (III/IV) (22) (tableau II).

Stage	Involvement	Extranodal (E) Status
Limited		
I	One node or a group of adjacent nodes	Single extranodal lesions without nodal involvement
II	Two or more nodal groups on the same side of the diaphragm	Stage I or II by nodal extent with limited contiguous extranodal involvement
II bulky*	II as above with "bulky" disease	Not applicable
Advanced		
III	Nodes on both sides of the diaphragm; nodes above the diaphragm with spleen involvement	Not applicable
IV	Additional noncontiguous extralymphatic involvement	Not applicable

NOTE. Extent of disease is determined by positron emission tomography-computed tomography for avid lymphomas and computed tomography for nonavid histologies. Tonsils, Waldeyer's ring, and spleen are considered nodal tissue.

*Whether stage II bulky disease is treated as limited or advanced disease may be determined by histology and a number of prognostic factors.

Tableau II. Système d'évaluation du stade des lymphomes, d'après (22).

En plus de la détermination du stade, il est possible de calculer différents scores pronostiques pour essayer de prédire au mieux l'évolution de la maladie chez un patient donné. Les scores les plus utilisés sont le FLIPI (*Follicular Lymphoma International Prognostic Index*) (23) et le FLIPI2 (24). Le premier est plus axé sur la survie globale des patients tandis que le second se concentre plus sur la survie sans progression.

Ces scores internationaux ne sont pas toujours simples d'utilisation en pratique courante, d'où le développement d'un score simplifié, le PRIMA-PI (*PRIMA-prognostic index*) (25).

Le tableau III reprend les différents paramètres utilisés par ces trois scores pronostiques.

	FLIPI	FLIPI 2	PRIMA-PI
Âge > 60	1	1	
Hb < 120 g/L	1	1	
Nombre d'aires ganglionnaires > 4	1		
Stade Ann-Arbor 3 ou 4	1		
Envahissement médullaire		1	1
Bêta-2 microglobuline		1	1
Diamètre du plus gros ganglion > 6 cm		1	

Tableau III. Scores pronostiques du lymphome folliculaire, d'après (6).

FLIPI : *Follicular Lymphoma International Prognostic Index*

PRIMA-PI : *PRIMA-prognostic index*

Une modification de l'index FLIPI, le m7-FLIPI, incorpore le statut mutationnel de 7 gènes (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP* et *CARD11*). Dans le papier de description, la moitié des patients traités par immunochimiothérapie et considérés comme à haut risque par le FLIPI ont été reclassés comme à risque faible par le m7-FLIPI (26). Si ce genre d'approche utilisant les modifications génomiques du lymphome s'avère très prometteuse, son utilisation est aujourd'hui restreinte en raison de l'accès limité aux laboratoires de séquençage.

Enfin, la transformation histologique d'un FL au cours de l'évolution en un type de lymphome plus agressif, le plus souvent en DLBCL, est un facteur de mauvais pronostic (27). Cette situation, qui nécessite une nouvelle biopsie ganglionnaire pour être diagnostiquée, survient chez environ 20% des patients au cours de leur vie (28), soit un risque estimé à 2% par an (29).

6) Traitement

Traitement de 1^{ère} ligne

La première ligne de traitement est conditionnée par le stade de la maladie, évalué selon la classification de Lugano (22), qui servira aussi à en apprécier l'efficacité.

Pour les FL de stade limité (I/II), une radiothérapie localisée à la dose de 24 Gy représente le traitement de choix (3). L'abstention thérapeutique avec simple surveillance peut être envisagée chez certains patients, notamment ceux présentant des comorbidités, sans impact préjudiciable sur leur survie (30).

Du fait du développement à bas bruit du FL, la majorité des patients est diagnostiquée à un stade avancé (III/IV), considéré comme incurable. Toutefois, ces patients ne nécessitent pas l'instauration immédiate d'un traitement s'ils sont asymptomatiques (masse tumorale faible, absence de signes B, absence de cytopénies, absence d'atteinte d'organe) (3). Compte tenu de la lenteur de progression, du caractère incurable et des effets indésirables des traitements, l'abstention thérapeutique avec surveillance rapprochée est recommandée.

Le **tableau IV** reprend les indications de traitement.

High tumor bulk is defined as
A tumor ≥ 7 cm in diameter
Involvement of ≥ 3 nodes in three distinct areas, each ≥ 3 cm in diameter
Symptomatic spleen enlargement
Organ compression
Ascites or pleural effusion
GELF criteria
High tumor bulk
Presence of systemic symptoms (B symptoms)
Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status > 1
Serum lactate dehydrogenase (LDH) or beta 2-microglobulin level above normal values

Tableau IV. Indications de traitement du lymphome folliculaire, d'après (18).

La présence d'un seul item suffit à poser l'indication d'un traitement.

GELF : Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires

A contrario, les patients présentant une forte masse tumorale, qu'elle soit limitée (stade II « bulky ») ou disséminée (III/IV), nécessitent un traitement systémique par immunochimiothérapie (3,18). L'ajout du rituximab, anticorps monoclonal chimérique ciblant le CD20, aux protocoles de chimiothérapie au début des années 2000 a considérablement augmenté leur efficacité et ainsi amélioré la survie des patients (31,32). Les protocoles les plus répandus sont les suivants : R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, hydroxydoxorubicine, vincristine, ONCOVIN, prednisone), R-CVP (rituximab, cyclophosphamide, vincristine, prednisone) et B-R (bendamustine, rituximab).

D'autres anti-CD20 ont été testés dans le FL, comme l'obinutuzumab, un anticorps monoclonal humanisé conçu pour induire davantage de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (33). Par rapport au rituximab, ce nouvel anticorps a l'avantage d'augmenter la survie sans progression mais n'obtient pas de meilleurs résultats pour la survie globale (34). Son utilisation n'est pas encore très répandue, notamment à cause de ses effets indésirables, plus sévères que ceux du rituximab.

A la fin d'un protocole d'immunochimiothérapie, un traitement d'entretien par rituximab seul est parfois proposé. A raison d'une injection tous les 2 mois pendant 2 ans, il réduit le risque de progression de la maladie sans toutefois augmenter la survie globale (35).

Après l'introduction des anti-CD20, une seconde révolution thérapeutique est en train de voir le jour grâce aux immunomodulateurs. En effet, l'association lénalidomide REVLIMID / rituximab constitue le premier protocole (R^2) dit « *chemo-free* », c'est-à-dire sans molécule de chimiothérapie classique et donc moins toxique. Cette option thérapeutique s'est révélée aussi efficace que l'immunochimiothérapie (36,37) et pourrait donc se généraliser dans les prochaines années.

Traitement de 2^{ème} ligne

Malgré l'obtention d'une réponse satisfaisante lors d'un premier traitement, la plupart des patients rechute au bout de quelques années. Il est alors nécessaire de recourir à nouveau au PET-scanner, voire de réaliser une nouvelle biopsie ganglionnaire pour exclure une éventuelle transformation histologique (27,28).

Là encore, un traitement n'est réinstauré d'emblée qu'en cas de rechute symptomatique ou de forte masse tumorale (3,18).

De multiples options thérapeutiques sont envisageables. Parmi les plus conventionnelles, on peut utiliser le rituximab seul (38), choisir l'association R^2 (39), essayer un protocole d'immunochimiothérapie incluant l'obinutuzumab (40) ou bien procéder à une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (41). Au vu de sa toxicité, cette dernière solution doit être réservée aux sujets jeunes atteints d'une forme de FL résistante.

Citons aussi la possibilité de radiothérapie palliative, à la faible dose de 4 Gy, pour soulager les patients âgés avec rechute limitée à un seul site (42).

A côté de ces traitements classiques, de nouvelles approches thérapeutiques innovantes ont vu le jour grâce à la meilleure compréhension de la maladie.

Ainsi, le rôle prépondérant du signal BCR dans la lymphomagenèse (43,44) a inspiré le développement d'inhibiteurs enzymatiques ciblant les voies de signalisation mises en jeu. Si l'efficacité de l'ibrutinib, molécule anti-BTK, s'est révélée décevante dans les rechutes de FL (45), les inhibiteurs de PI3K comme l'idelalisib ou le copanlisib ont montré des résultats encourageants en monothérapie, malgré une certaine toxicité (46,47).

L'utilisation de lymphocytes T à récepteur antigénique chimérique anti-CD19, les fameuses *CAR-T cells*, représente une autre forme d'immunothérapie très prometteuse pour le traitement des FL réfractaires (48) ou transformés (49). Les difficultés d'obtention inhérentes à leur modalité de fabrication et leur coût très élevé limitent hélas leur utilisation en pratique courante aujourd'hui.

L'arsenal thérapeutique aujourd'hui à disposition, bien que non curatif, permet de prolonger les périodes de rémission et d'obtenir des taux de survie à 10 ans supérieurs à 90% chez les patients avec faible masse tumorale et à 80% chez ceux avec une forte masse (6).

Des progrès seraient toutefois les bienvenus : la première cause de décès chez les patients atteints de FL reste bien leur hémopathie (50).

II. Lymphomagenèse du FL

Le développement du FL est un véritable cas d'école en oncologie : il récapitule toutes les étapes clés de l'oncogenèse. Une cellule innocente, ici un lymphocyte B, acquiert une résistance à l'apoptose. Cette cellule persiste, accumule d'autres mutations et finit par se transformer en cellule maligne (51,52).

Les études génétiques réalisées sur les FL ces dernières années ont permis de dégager trois grands acteurs dans la lymphomagenèse : la translocation du gène *BCL2*, les perturbations épigénétiques et l'acquisition d'un BCR N-glycosylé (51).

1) Translocation du gène *BCL2*

La translocation réciproque t(14;18)(q32;q21) est emblématique du FL. Décrite pour la première fois en 1979 (53), associée au FL en 1982 (54), son rôle dans la pathogenèse est suspecté dès 1984 : le remaniement chromosomique modifie le positionnement d'un gène de fonction alors inconnue, *BCL2* (pour *B-cell CLL/lymphoma 2*) (55). L'année suivante, il sera démontré que cette translocation est un phénomène précoce qui s'opère par erreur lors de la recombinaison VDJ, dès le stade pro-B (56) (figure 2). La fragilité intrinsèque du gène *BCL2* explique sa susceptibilité à subir des translocations (57,58).

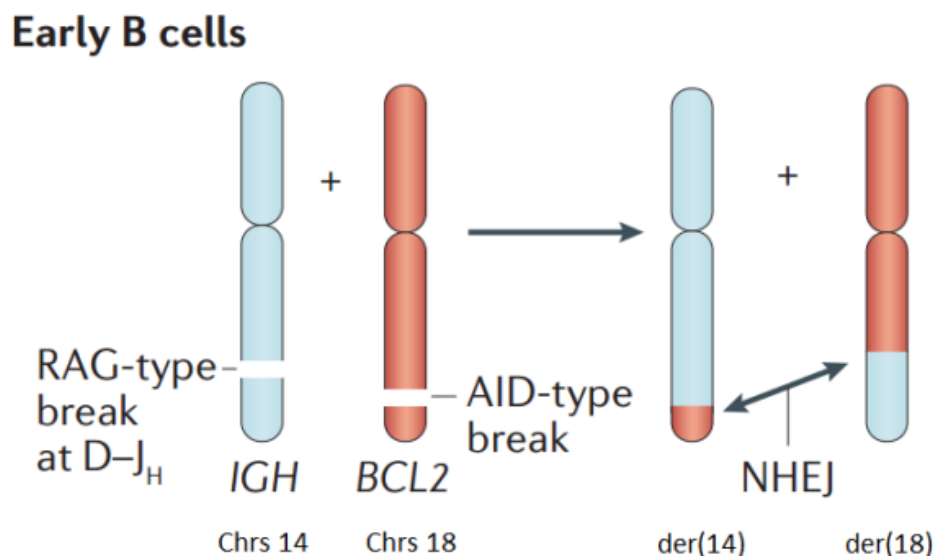


Figure 2. Mécanisme de translocation t(14;18), d'après (58).

Au cours de la recombinaison VDJ, les recombinases RAG induisent une cassure double brin sur un chromosome 14 (Chr 14, portant le gène *IGH*) tandis que l'enzyme AID provoque une cassure sur un chromosome 18 (Chr 18, portant le gène *BCL2*).

Après échange des bras chromosomiques, la voie de réparation de l'ADN NHEJ rassemble les extrémités et forme deux chromosomes dérivés : der(14) et der(18).

La reconnaissance de *BCL2* comme un proto-oncogène en 1988 (59,60) permet d'établir le modèle suivant : le positionnement du gène *BCL2* sous le contrôle du promoteur du gène de chaîne lourde des immunoglobulines *IGH* conduit à l'expression constitutive de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, protégeant ainsi le lymphocyte B contre la mort par apoptose (61).

Cette capacité à résister à l'apoptose ne perturbe pas la physiologie des lymphocytes B naïfs. Il faut attendre la réaction du centre germinatif, milieu hostile aux lymphocytes B non sélectionnés par l'antigène, pour que la translocation *IGH/BCL2* dévoile son caractère pathogène (62). La surexpression de Bcl-2 confère au lymphocyte B de FL un avantage sélectif lui permettant de survivre et de proliférer (63).

Cette théorie séduisante a longtemps dominé les hypothèses sur la lymphomagenèse du FL. Elle ne peut cependant expliquer à elle seule le développement du FL.

Dès les années 1990, des lymphocytes B portant la translocation t(14;18) ont été mis en évidence chez des sujets sains (64). Présents en faible quantité chez près de 70% de la population générale (65), leur fréquence augmente avec l'âge (65) et avec l'exposition aux pesticides (66). Ces lymphocytes sont principalement composés d'une population clonale de lymphocytes mémoires IgM⁺ CD27⁺ (67,68) et représentent bien une étape de la lymphomagenèse (69) : un individu avec plus d'une cellule t(14;18)⁺ sur 10 000 PBMC a 23 fois plus de risque de développer un FL (70). Ce surrisque est toutefois à relativiser puisque, dans les faits, la transformation en FL reste un événement rare.

De plus, bien que très fréquente, la translocation *IGH/BCL2* n'est retrouvée que dans 85% des cas de FL (3,18) et non dans 100% des cas. Ils existent donc d'authentiques FL *BCL2* négatifs, notamment parmi les FL de grade 3 (5,19). A noter que c'est aussi le cas des FL pédiatriques (71) et des FL testiculaires (19).

L'acquisition d'autres anomalies génétiques apparaît ainsi nécessaire afin d'aboutir au FL. Il a été démontré chez la souris que ce sont les multiples passages par le centre germinatif qui permettent, par le processus d'hypermutation somatique, d'accumuler ces mutations (72).

La translocation du gène *BCL2* n'est donc pas l'alpha et l'oméga du développement du FL, mais constitue seulement le premier « *hit* » oncogénique (52). C'est un phénomène précoce qui permettra au lymphocyte B pré-cancéreux de survivre dans le centre germinatif et d'acquérir des anomalies génétiques supplémentaires, responsables de la transformation en FL (second « *hit* » oncogénique).

2) Perturbations épigénétiques

Ces dernières années, l'étude du paysage mutationnel des cancers par NGS a permis de révéler une nouvelle caractéristique du FL : la présence de mutations des gènes impliqués dans l'épigénétique chez la quasi-totalité des patients adultes (73).

Ces mutations somatiques sont acquises au sein du centre germinatif par le phénomène d'hypermutation somatique, orchestré par l'enzyme AID (74,75). Ce processus, qui permet normalement de modifier la séquence du BCR pour aboutir à des lymphocytes B potentiellement plus affins pour leur antigène, est responsable d'une instabilité génétique et peut provoquer des mutations dans d'autres gènes (44). Les perturbations épigénétiques engendrées, qui sont autant de « hits » oncogéniques additionnels à la translocation du gène *BCL2*, représentent un maillon crucial dans le développement du FL (52,76).

Les gènes de la régulation épigénétique les plus fréquemment mutés dans le FL – codant pour des enzymes modificatrices d'histone – sont récapitulés dans le [tableau V](#).

Gène	Fonction	Fréquence de mutation	Effet
<i>KMT2D</i>	Histone H3K4 méthyltransférase	70 – 90 %	Perte de fonction
<i>EZH2</i>	Histone H3K27 méthyltransférase	10 – 30 %	Gain de fonction
<i>CREBBP</i>	Histone H3K27 méthyltransférase	50 – 70 %	Perte de fonction
<i>EP300</i>	Histone H3K18 acétyltransférase	10 – 20 %	Perte de fonction

Tableau V. Gènes de régulation épigénétique fréquemment mutés dans le lymphome folliculaire, d'après (52).

D'un point de vue mécanistique, les dérèglements épigénétiques conduisent au maintien du programme génétique spécifique du centre germinatif et empêchent la différenciation en plasmocytes, notamment via la persistance du facteur de transcription Bcl-6 (44,52) ([figure 3](#)). Les lymphocytes B ainsi bloqués dans un phénotype de centre germinatif (CD10⁺ BCL6⁺ AID⁺) sont dénommés par l'acronyme FLLC (*follicular lymphoma like cells*) (68). Ces cellules représentent une étape clé de la lymphomagenèse : elles disséminent, recirculent entre les organes lymphoïdes et, si elles rencontrent à nouveau leur antigène, reforment un centre germinatif et prolifèrent, créant de nombreux sous-clones. Leur état, caractérisé par une forte instabilité génétique, favorise l'apparition de nouveaux « hits » oncogéniques et ainsi la progression de la maladie (52,77).

Ainsi les FLLC peuvent conduire à deux stades précoces de FL, les cellules précurseurs de cancer (CPC) et les néoplasies folliculaires in situ (ISFN) (17,78) ([figure 4](#)) – les CPC constituent un réservoir de cellules précancéreuses, suspecté d'être responsable des rechutes de FL, tandis que les ISFN sont des entités précliniques de diagnostic fortuit, caractérisées par la présence de cellules BCL2⁺ CD10⁺ sans atteinte de l'architecture ganglionnaire et évoluant parfois en FL.

A noter qu'une étude récente a montré qu'il subsiste une hétérogénéité dans les profils transcriptionnels des lymphocytes B de FL : bien que bloqués dans un phénotype de type centre germinatif, ceux-ci ne restent pas « gelés » dans un programme génétique précis (79).

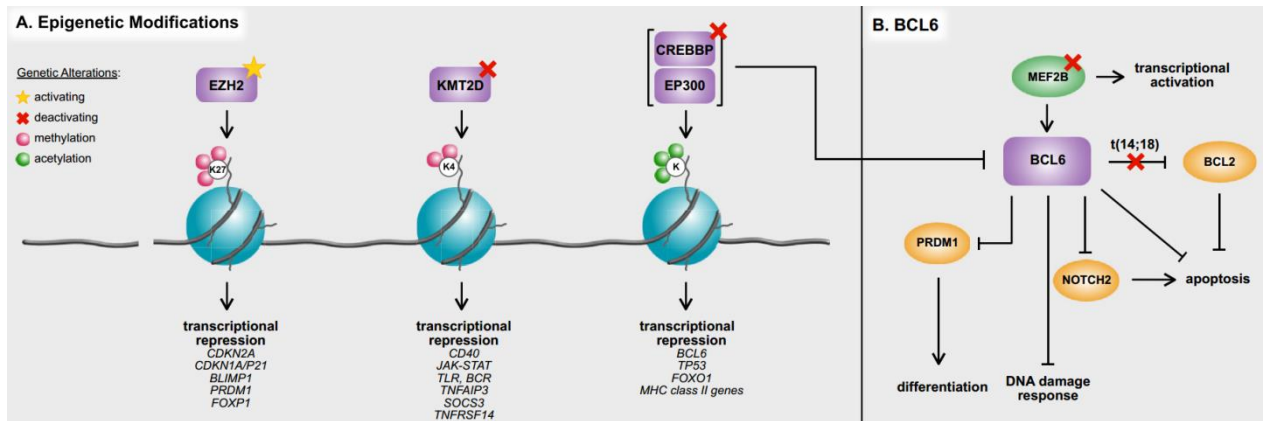


Figure 3. Principales modifications épigénétiques du FL et leurs conséquences, d'après (80).

Les mutations dans les gènes régulateurs de l'épigénétique (*CREBBP*, *EP300*, *EZH2* et *KMT2D*) répriment la transcription de nombreux gènes. Le programme génétique du centre germinatif est maintenu, notamment par (A) inhibition de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation plasmocytaire (comme *BLIMP1*) ou par (B) perte de régulation de Bcl-6.

La persistance du lymphocyte B dans le centre germinatif est propice à l'acquisition de nouvelles mutations génétiques par hypermutation somatique.

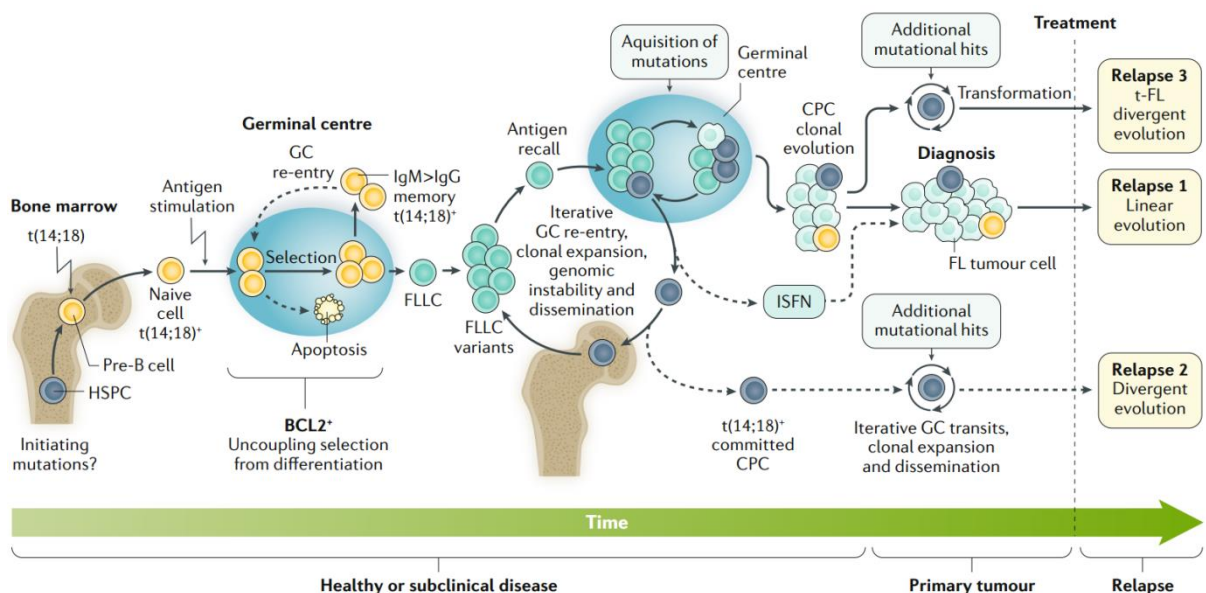


Figure 4. Lymphomagenèse du lymphome folliculaire, d'après (17)

CPC : cancer precursors cells / FLLC : FL-like cells / ISFN : in situ follicular neoplasia

Au vu de l'absence de perturbations épigénétiques chez les FL pédiatriques, maladies bénignes d'excellent pronostic (71), et de leur présence au sein des CPC (78), leur rôle dans la durabilité et l'évolution chronique des FL de l'adulte est suspecté (77).

Un tel rôle est appuyé par la capacité du score pronostique m7-FLIPI, qui comprend le statut mutationnel de 7 gènes dont 5 avec une fonction épigénétique (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300* et *CREBBP*), à prédire le devenir des patients plus efficacement que l'index FLIPI (26).

Des traitements ciblant les enzymes dérégulées, comme des inhibiteurs d'EZH2 ou de désacétylases d'histones, sont actuellement en cours de développement (77). Il est peu probable que ces molécules soient efficaces à long terme en monothérapie mais elles pourraient apporter un effet synergique intéressant dans l'éradication des CPC.

3) Acquisition d'un BCR N-glycosylé

La signalisation induite par le BCR, indispensable à la survie des lymphocytes B normaux (81), semble aussi importante au développement du FL et des lymphomes B en général (43).

En effet, malgré l'inactivation d'un allèle de chaîne lourde d'immunoglobuline par translocation du gène *BCL2*, l'expression du BCR est maintenue à la surface de l'intégralité des FL (51).

La nature de l'antigène reconnu par le BCR du FL, unique à chaque patient, a longtemps été un mystère. L'hypothèse de la reconnaissance d'un auto-antigène se révèle peu satisfaisante : peu de FL sont capables de lier un antigène du Soi (82,83) et, au vu de la mutagenèse constante du BCR causée par AID, il est très peu probable que les lymphocytes B de FL reconnaissent le même antigène tout au long de la phase préclinique qui dure plusieurs années (68).

Une nouvelle théorie s'avère plus attractive : l'interaction du BCR avec des lectines du microenvironnement (51).

Tout commence au début des années 2000 par l'observation de motifs de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) dans les régions variables des chaînes lourdes du BCR de la quasi-totalité des FL (84). L'introduction de ces séquences – rarement rencontrées à l'état germinale parmi les gènes *IGHV* d'immunoglobulines (85) – par hypermutation somatique représente un phénomène précoce et durable de la lymphomagenèse (86). En effet, les rares clones échappant au processus ou perdant ce phénotype ne persistent pas (86).

Or, il a été montré que, grâce à ces séquences spéciales, le fragment Fab des BCR de FL acquiert des glycanes de type oligomannose (87). Ces sucres immatures, relativement atypiques chez les mammifères (88,89), sont reconnus par la lectine DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*, CD209) (90) : cette interaction induit un signal persistant chez les lymphocytes B de FL (91,92) (figure 5), plus marqué chez ceux d'isotype IgM (92).

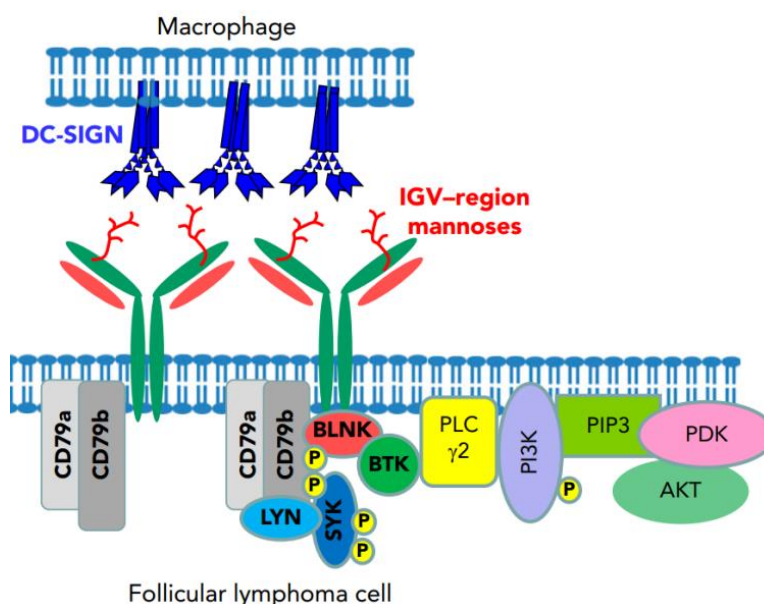


Figure 5. Interaction entre la lectine DC-SIGN exprimée par les macrophages et le BCR mannosylé porté par les lymphocytes B de FL, d'après (51).

Il est intéressant de noter que les FLLC subissent une pression de sélection pour conserver l'expression d'un BCR IgM malgré l'activation du processus de commutation de classe au plan moléculaire (93,94) : c'est le paradoxe allélique (figure 6).

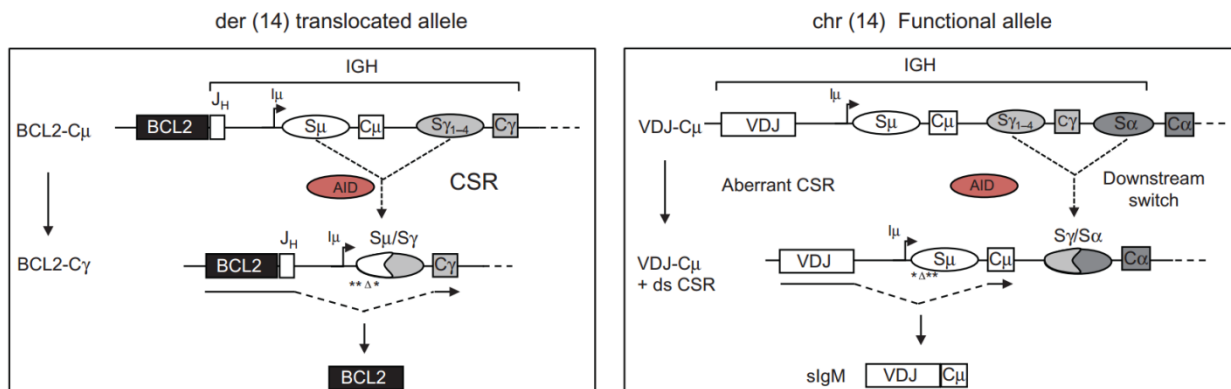


Figure 6. Paradoxe allélique dans le lymphome folliculaire, d'après (68).

Panel de gauche. L'insertion du gène *BCL2* dans le dérivé du chromosome 14 laisse intacte la partie constante du gène *IGH*. Cet allèle non fonctionnel subit la commutation de classe (CSR) et forme ainsi le locus *BCL2/Cγ*.

Panel de droite. Dans la majorité des FL, la commutation de classe de l'allèle fonctionnel est aberrante : les séquences de switch *Sγ* et *Sα* se recombinent et épargnent la région *Cμ*. L'expression de l'IgM est ainsi conservée. Ce défaut d'utilisation de la séquence switch *Sμ* semble dû aux nombreuses mutations (*) et délétions (Δ) introduites par hypermutation somatique, qui la rendrait inactive.

Le signal délivré par l'interaction du BCR avec DC-SIGN serait suffisamment fort pour permettre, avec l'expression ectopique de Bcl-2, la survie des FLLC et suffisamment faible pour éviter d'induire une répression de Bcl-6 et ainsi la différenciation en plasmocytes ou cellules mémoires (68,95).

De plus, son caractère antigène-indépendant représente un avantage pour la dissémination et la colonisation des organes lymphoïdes, d'autant plus que la synthèse de DC-SIGN, lectine présente à la surface des cellules dendritiques (96) et des macrophages associés aux tumeurs (TAM) (97), est inducible par l'IL-4 (97), cytokine très présente dans les ganglions de FL (98).

Collectivement, ces données orientent vers le rôle indispensable de la N-glycosylation du BCR dans le développement du FL et soulignent l'importance de l'interaction du FL avec son microenvironnement.

III. Microenvironnement du FL

Les tumeurs sont des structures complexes : les cellules cancéreuses évoluent dans un microenvironnement composé de cellules stromales et de cellules de la réponse immunitaire anti-tumorale (99).

Le FL ne fait pas exception : son microenvironnement est un réseau dynamique de cellules immunitaires et stromales impliqué dans la lymphomagenèse, l'évolution clonale, la résistance aux traitements et la progression (100,101).

La composition de ce microenvironnement est d'une importance capitale puisqu'elle conditionne le pronostic du FL (102). Ainsi, une forte infiltration de lymphocytes T CD8, reflet d'une bonne réponse anti-tumorale, est corrélée avec une meilleure évolution (103).

L'activité du rituximab, molécule phare du traitement du FL, repose aussi sur les cellules immunitaires de la niche tumorale : la présence de cellules NK est nécessaire à l'ADCC (104) tandis que l'infiltration de TAM, longtemps péjorative dans le FL, s'avère maintenant de bon pronostic grâce au phénomène de phagocytose médiée par les anticorps (ADCP) (105,106).

Toutefois, malgré la présence d'éléments de la réponse anti-cancéreuse, il est clair que le microenvironnement soutient plus le développement du FL qu'il ne le freine (107). En effet, le FL est considéré comme un lymphome peu inflammé : la faible infiltration de lymphocytes T anti-tumoraux expliquerait l'efficacité décevante des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire dans cette indication (108).

Pour échapper à la réponse immunitaire et prospérer, le FL rééduque le microenvironnement ganglionnaire ou médullaire à son avantage et se crée une niche constituée majoritairement de lymphocytes T_{FH}, de macrophages (TAM) et de cellules stromales (109,110). Il devient très dépendant de son microenvironnement comme en témoigne l'impossibilité de cultiver isolément des lymphocytes B de FL (107).

Ce dialogue multidirectionnel entre les lymphocytes B de FL et les différents éléments du microenvironnement est complexe et loin d'être complètement caractérisé ; le [tableau VI](#) en présente les mécanismes essentiels. La [figure 7](#) schématise plus particulièrement les signaux protumoraux délivrés par la niche tumorale au FL.

Effet protumoral du microenvironnement		
Effet	Mécanisme	Références
Signal BCR	Interaction DC-SIGN (TAM) / BCR N-glycosylé	(91,92)
Recrutement des lymphocytes B de FL	Sécrétion des chimiokines CXCL13, CCL19/21 et CXCL12 par les cellules stromales	(111)
Expansion du GC	Diminution de la podoplanine, régulatrice de la contractilité des organes lymphoïdes	(111,112)
Production de facteurs protumoraux	- Sécrétion de ligands Hedgehog et de BAFF par les cellules stromales - Sécrétion d'IL-15 par les TAM	(113,114)
Stimulation par les lymphocytes T _{FH}	- Interaction CD40L / CD40 - Sécrétion d'IL-4	(98,115,116)
Immunosuppression de la réponse anti-tumorale	- Sécrétion de PGE ₂ par les cellules stromales - Sécrétion d'IDO et d'iNOS par les TAM	(117–119)
Chimiorésistance	- Expression du transporteur ABCG2 en réponse aux ligands Hedgehog - Interaction CD106 (cellules stromales) / intégrine α4β1	(120–122)
Effet du FL sur le microenvironnement (rééducation)		
Effet	Mécanisme	Références
Génération de TAM	Différenciation locale de monocytes recrutés par sécrétion de CCL2	(123)
Différenciation et maintien des cellules stromales	Sécrétion de TNF et de lymphotoxine	(124,125)
Stimulation des lymphocytes T _{FH}	Mutation LOF <i>TNFRSF14</i> codant pour HVEM ; arrêt de l'interaction inhibitrice HVEM/BTLA (mécanisme phare dans les FL pédiatriques)	(71,126,127)
Augmentation des lymphocytes Treg	- Recrutement des lymphocytes Treg interfolliculaires par sécrétion de CCL22 - Dérégulation de la balance T _{H17} /Treg en faveur des lymphocytes Treg	(128,129)
Résistance à la réponse anti-tumorale	- Perturbation de la synapse immunologique - Réduction de la mobilité des lymphocytes T - Epuisement des lymphocytes T mémoires par sécrétion de TGFβ - Induction de TIM-3 sur les lymphocytes T anergiques par sécrétion d'IL-12 - Surexpression CD47 : inhibition de la phagocytose des TAM par interaction avec SIRPα	(130–134)

Tableau VI. Principales interactions protumorales entre le FL et son microenvironnement.

BAFF : *B-cell activating factor* / PGE₂ : prostaglandine E₂

IDO : indolamine 2,3-dioxygénase / iNOS : NO synthétase inductible

LOF : perte de fonction (*loss of function*) / TAM : macrophages associés aux tumeurs

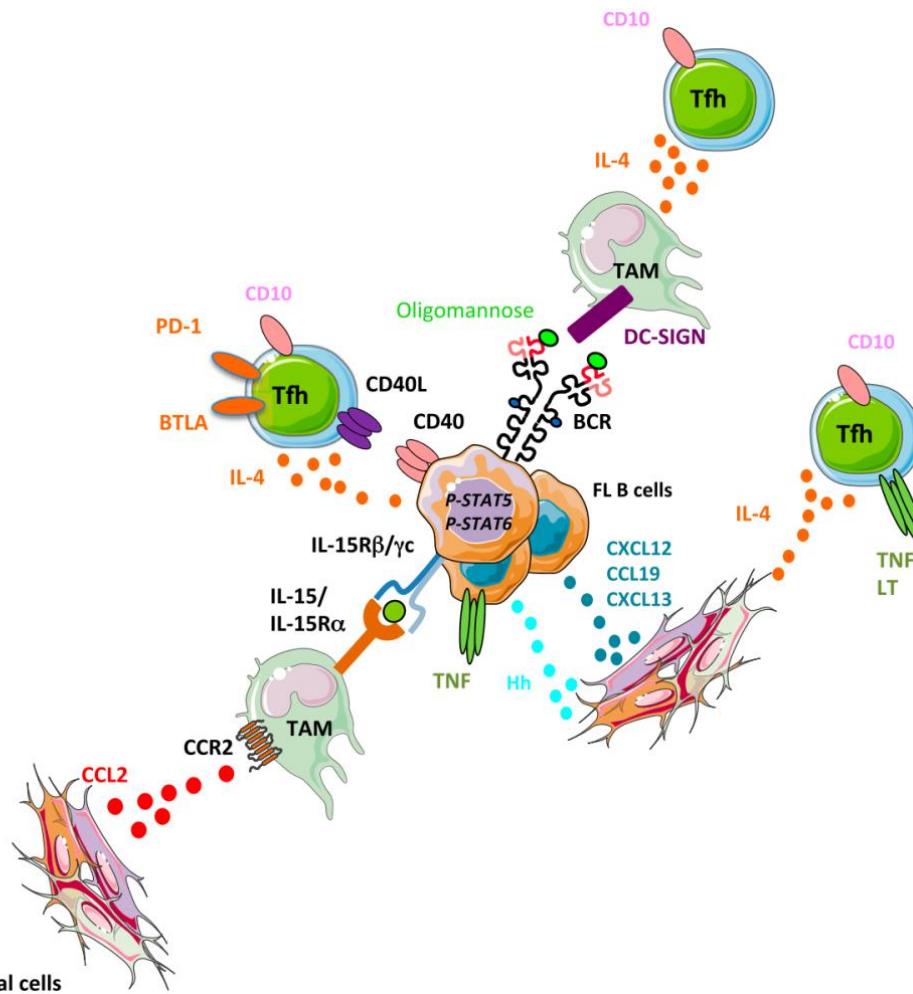


Figure 7. Signaux protumoraux délivrés par la niche du FL, d'après (135).

Objectifs et hypothèse de travail

Nous faisons l'hypothèse que dans le contexte du FL l'interaction BCR mannosylé/DC-SIGN a des conséquences bidirectionnelles : en plus de stimuler les cellules tumorales, elle pourrait délivrer un signal aux cellules myéloïdes exprimant DC-SIGN et leur permettre d'acquérir un phénotype favorisant directement la croissance tumorale et/ou inhibant la réponse immune anti-tumorale (figure 8).

Pour confirmer l'impact de ce dialogue sur les cellules myéloïdes, jusque-là jamais étudié, le travail se divise en deux axes principaux.

Le premier axe consiste en une caractérisation précise des cellules exprimant DC-SIGN au sein des organes lymphoïdes secondaires (OLS). Les techniques de cytométrie de masse (*cytometry by time-of-flight*, CyTOF) et de transcriptomique (système de qPCR haut débit Biomark®) permettent de discriminer ces populations myéloïdes qui expriment peu de marqueurs phénotypiques spécifiques.

Le second axe se concentre sur l'aspect fonctionnel de l'interaction BCR mannosylé/DC-SIGN. Afin de mimer les TAM du FL, des modèles de polarisation de monocytes en macrophages ont été développés et ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique (en CyTOF) et transcriptomique (Biomark®). Des cocultures entre des cellules exprimant DC-SIGN (monoblastes U937 DC-SIGN ou macrophages M-IL4) d'une part et de lymphocytes B exprimant un BCR mannosylé (lignée de lymphome L3055 ou lymphocytes B de FL) d'autre part ont permis de reproduire au moins partiellement le dialogue entre les cellules myéloïdes ganglionnaires DC-SIGN^{pos} et les lymphocytes B tumoraux. L'effet de ces cocultures a été apprécié par la mesure de l'internalisation de DC-SIGN en cytométrie en flux.

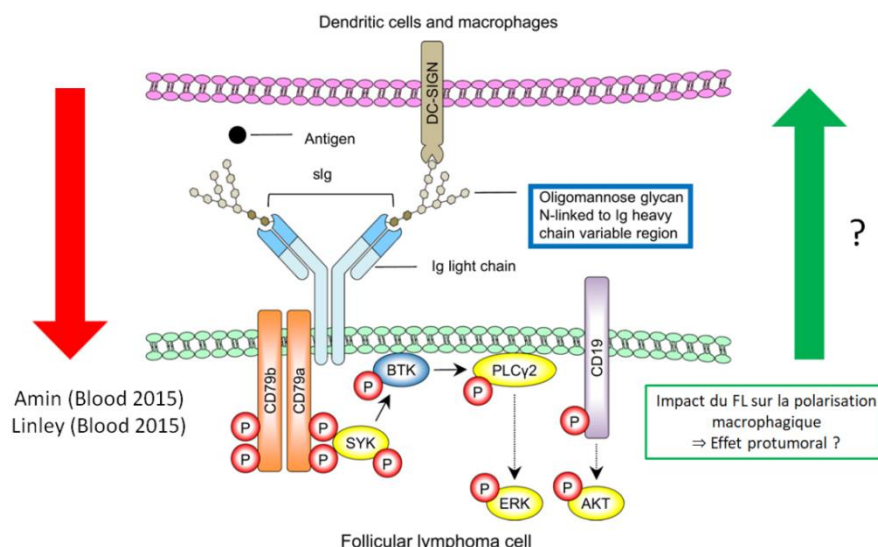


Figure 8. Interaction bidirectionnelle BCR mannosylé / DC-SIGN dans le contexte du lymphome folliculaire - schéma adapté de (136).

L'acquisition de séquences de N-glycosylation dans les gènes V_H d'immunoglobuline a été décrite pour la première fois par Zhu, 2002, (84). Ces sites sont occupés par des résidus oligomannoses qui vont être reconnus par DC-SIGN et ainsi stimuler les cellules lymphomateuses du FL (travaux d'Amin et Linley, 2015, (91,92)). L'impact de ce dialogue intercellulaire sur les cellules myéloïdes DC-SIGN^{pos} n'a pas été étudié à ce jour.

Matériel et méthodes

1) Cellules et lignées

a) Cellules nécessaires à la validation du panel CyTOF

Les OLS analysés en CyTOF sont des ganglions retirés lors d'une suspicion de lymphome (exérèse à but diagnostique), issus de notre bibliothèque. Ces échantillons sont dissociés selon un protocole décrit plus bas et traités par Tégéline® à 4 % (LFB Biomédicaments, Les Ulis, France) pour saturer les récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines G (FcγR). Une déplétion lymphocytaire est réalisée à l'aide de billes magnétiques anti-CD3 et anti-CD19 (Invitrogen, Dynabeads CD3 et CD19, Carlsbad, Etats-Unis).

Les types cellulaires utilisés pour valider le panel CyTOF sont décrits dans le [tableau VII](#).

Cellules	Origine	Stimulation
Cellules dendritiques immatures	SITI : monocytes sanguins cultivés 5 jours avec GM-CSF 1000 UI/mL et IL-4 200 UI/mL	NA
Cellules stromales adipocytaires	SITI : lipoaspirations (Loisel et al., 2017)	Lymphotoxine $\alpha 1\beta 2$ 100 ng/mL + TNF 10 ng/mL pendant 3 jours
Daudi : lignée de lymphome de Burkitt	Institut des Cordeliers	NA
K562 : lignée de leucémie myéloïde chronique	ATCC (CCL-243)	NA
U937 : lignée de leucémie aiguë monoblastique	ATCC (CRL-1593.2)	NA
Monocytes	EFS Nantes (élutriation)	IFN α 20 ng/mL pendant 3 jours
PBMC	CHU Rennes : donneurs sains (gradient de densité)	Phytohémagglutinine 5 μ g/mL pendant 3 jours
	CHU Rennes : patient atteint de LAL CD34 ⁺ (gradient de densité)	NA

Tableau VII. Cellules utilisées pour la validation du panel CyTOF.

ATCC : *American Type Culture Collection* / EFS : Etablissement Français du Sang

LAL : leucémie aiguë lymphoblastique / NA : non applicable

PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*)

SITI : Suivi Immunologique des Thérapeutiques Innovantes (Rennes)

Réactif du gradient de densité : milieu de séparation des lymphocytes, Eurobio

Réactifs de stimulation : GM-CSF, CellGenix / IL-4, CellGenix / IFN α , Roche, PEGASYS 180 μ g 0,5 mL /

Lymphotoxine $\alpha 1\beta 2$, R&D Systems / Phytohémagglutinine, Sigma-Aldrich / TNF, R&D Systems

Seule une partie des monocytes et des PBMC a été stimulée comme indiqué ci-dessus.

b) Cellules nécessaires pour étudier l'aspect fonctionnel de l'interaction BCR / DC-SIGN

Le **tableau VIII** détaille les lignées cellulaires utilisées lors de l'évaluation fonctionnelle de l'interaction BCR/DC-SIGN.

Lignée	Type cellulaire	Fournisseur (référence)
BL2	Lymphome de Burkitt	Thierry Fest, Besançon, France
L3055	Lymphome de Burkitt	John Gordon, Birmingham, UK
U937	Leucémie aiguë monoblastique	ATCC (CRL-1593.2)
U937 DC-SIGN	Leucémie aiguë monoblastique	ATCC (CRL-3253)

Tableau VIII. Lignées cellulaires utilisées pour évaluer l'interaction BCR/DC-SIGN.

c) OLS de patients

Le **tableau IX** reprend les caractéristiques des OLS de patients utilisés lors de ce travail. Ces échantillons sont issus de prélèvements de routine envoyés au laboratoire d'hématologie pour suspicion de lymphome.

Patient	Age	Sexe	Type	Grade	Isotype	Utilisation
#1	75 ans	H	Ganglion de FL au diagnostic	1/2	κ	1 ^{er} test du panel CyTOF
#2	59 ans	F	Ganglion de FL en rechute, après traitement (diagnostic à 55 ans)	1/2	λ	
#3	64 ans	H	Ganglion non tumoral Polyarthrite rhumatoïde connue	NA	NA	
#4	66 ans	H	2 ganglions de FL en rechute (diagnostic à 60 ans)	1/2	κ	Hétérogénéité du compartiment DC-SIGN ^{pos}
#5	76 ans	F	Ganglion de FL au diagnostic	1/2	κ	
#6	45 ans	F	Ganglion de FL en rechute, après traitement (diagnostic à 26 ans)	3A	κ	
#7	85 ans	F	Ganglion de FL au diagnostic	1/2	λ	
#8	18 ans	F	Ganglion non tumoral Hyperéosinophilie	NA	NA	
#9	60 ans	H	Ganglion non tumoral Hyperplasie folliculaire	NA	NA	
#10	53 ans	H	Ganglion non tumoral Hyperplasie folliculaire	NA	NA	
#11	71 ans	F	Ganglion de FL au diagnostic	1/2	λ	Liaison à rhDC-SIGN
#12	53 ans	F	Ganglion de FL au diagnostic	3A	κ	
#13	56 ans	F	Ganglion de FL au diagnostic	3A	λ	
#14	74 ans	H	Ganglion de FL en rechute, après traitement (diagnostic à 71 ans)	1/2	λ	

Tableau IX. Caractéristiques des OLS de patients utilisés.

NA : non applicable

2) Polarisation des monocytes en macrophages

Des monocytes éutriés obtenus auprès de l'EFS (Etablissement Français du Sang) de Nantes ont été polarisés par différents agents de stimulation selon le protocole décrit par la [figure 9](#). Les doses utilisées, déterminées à partir de publications ([137–139](#)) et de travaux préliminaires, sont précisées dans le [tableau X](#).

Après une étape de déplétion des lymphocytes T et B résiduels par Dynabeads CD3 et CD19 (Invitrogen), les monocytes sont repris en RPMI 1640 (Gibco - Thermo Fischer Scientific, Waltham, Etats-Unis) 10% sérum de veau fœtal (Gibco - Thermo Fischer Scientific, SVF) 1% pénicilline streptomycine (Gibco - Thermo Fischer Scientific, PS). Une stimulation basale, par M-CSF ou IL-34, est ajoutée au milieu. Pour chaque condition de polarisation, 4 millions de monocytes sont mis en culture en plaque 6 puits (Falcon - Corning, Radnor, Etats-Unis) à la concentration de 1 million/mL, soit 2 puits de 2 millions de cellules.

Une première période d'incubation en étuve, à 37°C sous 5% CO₂, est réalisée pendant 3 jours. A J3, les surnageants sont centrifugés (680g pendant 5 min) et les culots obtenus sont repris avec du RPMI 10% SVF 1% PS contenant les agents de stimulation adéquats. Ces suspensions sont remises dans les puits initiaux pour 3 jours d'incubation supplémentaires. A J6, le tapis cellulaire est décollé par traitement enzymatique (trypsine-EDTA 0,05%, Gibco - Thermo Fischer Scientific), les cellules sont lavées puis le marquage pour la cytométrie de masse et les culots secs pour extraction d'ARN sont réalisés.

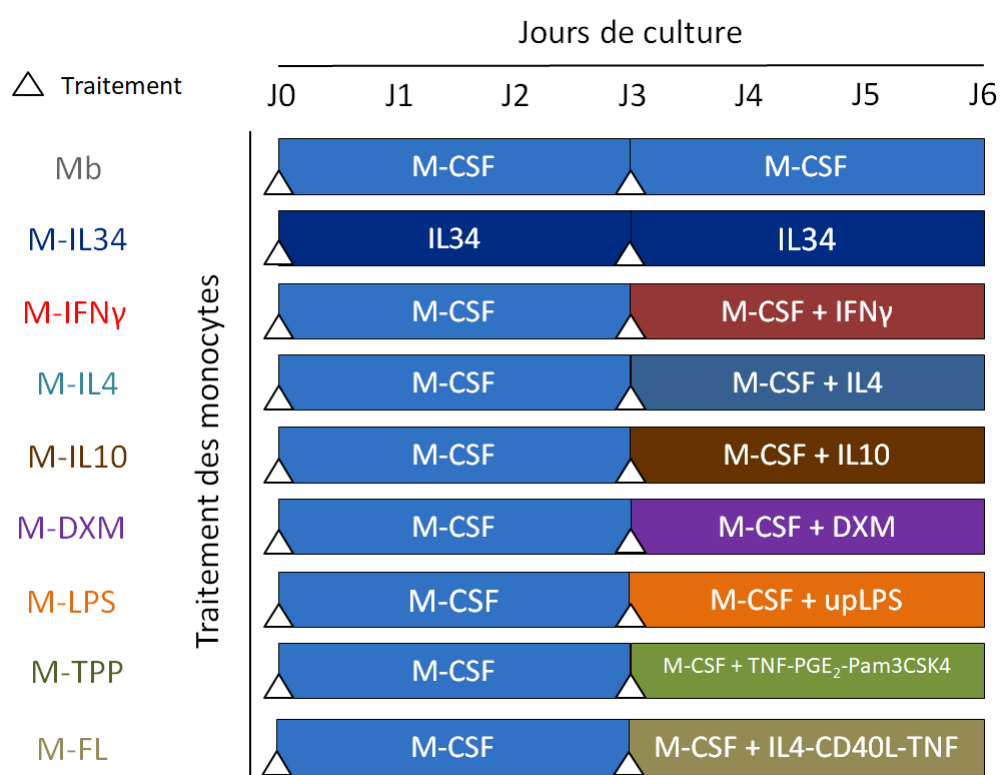


Figure 9. Schéma du protocole de polarisation de monocytes en macrophages.

M : macrophages / Mb : macrophages « *baseline* »

DXM : dexaméthasone / upLPS : lipopolysaccharide ultrapur

Agent de stimulation	Fournisseur	Référence	Concentration utilisée
M-CSF	R&D Systems	216-MC-050	8400 UI/mL
IL-34	R&D Systems	5265-IL-010	50 ng/mL
IFN γ	ImmunoTools	11343536	200 UI/mL
IL-4	Cellgenix	1403-050	100 UI/mL
IL-10	Cellgenix	1414-050	100 UI/mL
Phosphate sodique de dexaméthasone (DXM)	Mylan	Ampoule 4 mg, 1mL	1 nmol/mL
LPS ultrapur (upLPS)	InvivoGen	tlrl-pelps	10 ng/mL
TNF	R&D Systems	210-TA-100	800 UI/mL
PGE $_2$	Cayman Chemical	14010	1 μ g/mL
Pam3CSK4	InvivoGen	tlrl-pms	1 μ g/mL
CD40L	National Cancer Institute (USA)	NA	300 ng/mL

Tableau X. Agents de stimulation utilisés pour polariser les monocytes en macrophages.

NA : non applicable

3) Purification des lymphocytes B

Les ampoules d'OLS conservées dans l'azote liquide sont rapidement décongelées au bain-marie à 37°C. La suspension cellulaire est lavée en RPMI 20% SVF et reprise en RPMI 10% SVF. Les lymphocytes B sont purifiés par sélection négative grâce au B cell isolation kit II human (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne). Brièvement, les cellules sont lavées dans un tampon (*running buffer*, PBS 0,25% citrate de sodium 0,5% albumine humaine), marquées par un cocktail d'anticorps biotinylés (anti-CD2, -CD14, -CD16, -CD36, -CD43 et -CD235a) pendant 10 min. Des microbilles anti-biotine sont ensuite ajoutées au milieu pendant 15 min. La suspension est enfin transférée dans des colonnes MS (Miltenyi Biotec) fixées sur un portoir magnétique : l'éluat ne contient que des lymphocytes B, les cellules non-B ayant été retenues dans la colonne.

4) Préparation d'un échantillon OLS pour marquage CyTOF

a) Dissociation mécano-enzymatique

Nous avons utilisé le protocole établi au sein de notre laboratoire pour dissocier les OLS. L'échantillon de départ est un OLS découpé stérilement en morceaux d'environ 2 mm³. Le protocole se déroule comme suit.

L'échantillon est incubé pendant 5 min à 37°C (bain-marie) dans du RPMI 1640 (Gibco) complété de DNase à 10 UI/mL (Dornase alfa 2500 UI/2,5 mL Pulmozyme®, Roche, Bâle, Suisse), de collagénase de type 4 à 200 U/mL (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, Etats-Unis), de dispase à 1,6 U/mL (Worthington Biochemical Corporation), de MgCl $_2$ à 5 mM (Invitrogen) et de pénicilline streptomycine à 1% (Gibco).

La suspension est transférée dans un tube C (Miltenyi Biotec) et dissociée mécaniquement par l'automate gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) pendant 30 secondes (programme B1) avant d'être incubée pendant 40 min à 37°C sous agitation (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hambourg, Allemagne ; 350 rpm).

Le mélange est filtré à 100 µm (Falcon) puis traité par Easylyse® (Dako, Glostrup, Danemark). Les cellules sont ensuite suspendues dans un tampon (*tampon stroma*) dont la composition est la suivante : PBS (Eurobio, Courtaboeuf, France) complétement de citrate de sodium à 15% (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis), d'albumine humaine à 5% (Vialebex, LFB Biomédicaments), et de MgCl₂ à 5 mM (Invitrogen).

b) Saturation des FcγR et déplétion CD3/CD19

Les cellules obtenues sont incubées pendant 5 min à 4°C en Tégeline 4% afin de saturer les récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines G (FcγR).

Afin d'enrichir l'échantillon en cellules myéloïdes, une déplétion CD3/CD19 est réalisée à l'aide de billes magnétiques (Dynabeads CD3 et Dynabeads CD19, Invitrogen). Après vortexage et lavage en tampon stroma, les billes sont mises en contact de la suspension cellulaire pendant 30 min à 4°C, sous agitation douce. Un aimant permet ensuite d'éliminer les billes et de récupérer la fraction liquide déplétée.

L'opération est réalisée deux fois pour éliminer un maximum de lymphocytes T et B.

5) Cytométrie de masse (CyTOF)

Un panel de 37 anticorps permettant d'étudier les populations myéloïdes et stromales des OLS en cytométrie de masse a été mis en point au laboratoire. Les étapes préliminaires de couplage et de titration des anticorps se sont achevées fin 2018. Le [tableau XI](#) résume les caractéristiques de ce panel. La [figure 10](#) situe l'intérêt des différents marqueurs pour discriminer les populations cellulaires d'intérêt.

Le marquage des échantillons a été réalisé comme précédemment décrit ([140](#)).

Brièvement, la procédure commence par un marquage de viabilité avec du cisplatine (Fluidigm, South San Francisco, Etats-Unis) à 0,5 µM. Les cellules sont ensuite lavées en RPMI 1640 (Gibco) 10% SVF (Gibco) et incubées avec le cocktail d'anticorps à cibles membranaires (32 anticorps) pendant 30 minutes à température ambiante. S'en suit une étape de lavage en PBS (Eurobio) 0,5% albumine bovine (Sigma-Aldrich, *bovine serum albumine* BSA) puis de fixation en tampon FixPerm du kit FoxP3 Staining Buffer Set (Miltenyi Biotec).

Les cellules sont perméabilisées à l'aide d'un autre tampon de ce même kit puis incubées avec le cocktail d'anticorps à cibles intracellulaires (5 anticorps) pendant 30 minutes à 4°C. Deux lavages sont réalisés (le premier en tampon de perméabilisation, le second en PBS 0,5% BSA). L'ADN des cellules est enfin marqué à l'iridium (Fluidigm) dilué au 1/4000 en paraformaldéhyde 2% (Thermo Fischer Scientific, PFA). Les échantillons sont incubés à 4°C jusqu'au lendemain avant d'être transférés à -80°C dans un CoolCell® (BioCision, Mill Valley, Etats-Unis). Les microtubes sont envoyés à la plateforme CYPS de l'Université Pierre et Marie Curie (site de la Pitié-Salpêtrière) où ils sont analysés sur Helios® (Fluidigm) après décongélation et lavage.

Cible (clone)	Fournisseur (référence)	Isotope	Cellules cibles, description	Titre sur (contrôle positif)	Rendement de couplage	Concentration utilisée
CD45 (HI30)	Fluidigm (3089003B)	89Y	Leucocytes	PBMC	NA	200X
CD326 (9C4)	BioLegend (324229)	141Pr	Cellules de Langerhans, cellules épithéliales	K562	120 %	1 µg/mL
CD19 (HIB19)	BioLegend (302202)	142Nd	Lymphocytes B	PBMC / Lymphocytes B	53 %	0,5 µg/mL
HLA-DR (10.1)	BioLegend (307602)	143Nd	Cellules dendritiques, monocytes, lymphocytes B activés	Monocytes	72 %	2 µg/mL
CD31 (WM59)	BioLegend (303127)	144Nd	Cellules endothéliales, monocytes, granulocytes, lymphocytes (T/B/NK)	PBMC	13 %	1 µg/L
CD16 (B73.1)	BioLegend (360702)	145Nd	Monocytes, lymphocytes NK, neutrophiles, cellules dendritiques	PBMC / Monocytes	61 %	2 µg/mL
CD64 (L243)	BioLegend (305029)	146Nd	Cellules dendritiques, monocytes, granulocytes	Monocytes	92 %	2 µg/mL
CD11c (3.9)	BioLegend (301602)	147Sm	Cellules dendritiques, monocytes, granulocytes, lymphocytes (T/B/NK)	PBMC / Monocytes	80 %	2 µg/mL
CD33 (WM53)	BioLegend (303402)	148Nd	Lignée myéloïde	PBMC	61 %	0,25 µg/mL
DC-SIGN (9E9A8)	BioLegend (330102)	149Sm	Cellules dendritiques, macrophages	DC immatures	71 %	2 µg/mL
CD14 (M5E2)	BioLegend (301802)	150Nd	Monocytes, granulocytes	Monocytes	70 %	2 µg/mL
CD123 (6H6)	BioLegend (306002)	151Eu	Cellules dendritiques plasmacytoïdes, granulocytes, cellules endothéliales	PBMC / Monocytes	78 %	1 µg/mL
CD21 (Bu32)	BioLegend (354502)	152Sm	Cellules folliculaires dendritiques, lymphocytes B	Daudi	66 %	0,5 µg/mL
CCR2 (K036C2)	BioLegend (357202)	153Eu	Monocytes, lymphocytes Th1 et NK, basophiles	PBMC / Monocytes	41 %	1 µg/mL
CD163 (GHI/61)	BioLegend (333602)	154Sm	Monocytes, macrophages M2-like	Monocytes	52 %	2 µg/mL
CD36 (5-271)	BioLegend (336202)	155Gd	Monocytes, cellules dendritiques, cellules endothéliales	PBMC / Monocytes	63 %	0,5 µg/mL
CD86 (IT2.2)	BioLegend (305402)	156Gd	Cellules dendritiques, monocytes, lymphocytes B activés	PBMC / Monocytes	76 %	2 µg/mL
CD169 (7-239)	BioLegend (346002)	158Gd	Macrophages, cellules dendritiques	Monocytes (après stimulation IFN α)	50%	0,5 µg/mL
PD-L1 (29E.2A3)	BioLegend (329719)	159Tb	Point de contrôle immunologique	PBMC (après stimulation PHA)	72 %	2 µg/mL
RANKL (MIH24)	BioLegend (347501)	160Gd	Cellules stromales lymphoïdes activées, cellules endothéliales, lymphocytes T activés	K562	17 %	2 µg/mL
CD106 (EPR5047)	Abcam (ab134047)	161Dy	Cellules stromales lymphoïdes activées, cellules endothéliales	K562	45 %	1 µg/mL
CD3 (UCHT1)	BioLegend (300402)	162Dy	Lymphocytes T	PBMC	76 %	0,25 µg/mL
CD49a (TS2/7)	BioLegend (328302)	163Dy	Cellules stromales lymphoïdes, lymphocytes T activés	HFF	63 %	0,25 µg/mL
gp38 (REA446)	Miltenyi Biotec (sur demande)	164Dy	Cellules stromales lymphoïdes	ASC (après stimulation TNF + lymphotoxine)	77 %	0,5 µg/mL
CD80 (2D10)	BioLegend (305202)	165Ho	Cellules dendritiques, monocytes, lymphocytes B activés	Monocytes (après stimulation M-CSF ou GM-CSF + IL-4)	73%	2 µg/mL
CD34 (581)	BioLegend (343502)	166Er	Cellules hématopoïétiques, endothéliales, stromales lymphoïdes	PBMC de LAL B CD34 ^{hi}	77%	1 µg/mL
CD1a (HI149)	BioLegend (300102)	167Er	Cellules dendritiques, monocytes	DC immatures	59%	1 µg/mL
CX3CR1 (2A9-1)	BioLegend (341602)	168Er	Macrophages, lymphocytes Th1 et NK	PBMC / Monocytes	37%	1 µg/mL
CD32 (FUN-2)	BioLegend (303202)	169Tm	Lymphocytes B, monocytes, granulocytes	Monocytes	86%	0,5 µg/mL
CD54 (HA58)	BioLegend (353102)	170Er	Cellules stromales activées, cellules endothéliales ; lymphocytes T et B	PBMC	87%	2 µg/mL
CCR5 (J418F1)	BioLegend (359102)	171Yb	Monocytes, lymphocytes T, granulocytes	PBMC / Monocytes	68%	2 µg/mL

CD206 (15-2)	BioLegend (321102)	172Yb	Macrophages, cellules dendritiques, cellules endothéliales et épithéliales	Monocytes (après stimulation M-CSF ou GM-CSF + IL-4)	80%	2 µg/mL
S100A9 (A15105J)	BioLegend (600302)	173Yb	Monocytes, granulocytes	PBMC	87%	1 µg/mL
CD45RA (HI100)	BioLegend (304102)	174Yb	Cellules dendritiques plasmacytoïdes, lymphocytes (B, T naïfs, NK), monocytes	PBMC / Monocytes	79%	2 µg/mL
SIRPα (15-414)	BioLegend (372102)	175Lu	Macrophages, cellules dendritiques, granulocytes	U937	32%	2 µg/mL
CD68 (Y1/82A)	BioLegend (333802)	176Yb	Macrophages, granulocytes, cellules dendritiques	Monocytes (après stimulation M-CSF ou GM-CSF + IL-4)	67%	2 µg/mL
CD11b (ICRF44)	Fluidigm (3209003B)	209Bi	Monocytes, lymphocytes NK, granulocytes	PBMC	NA	100X
Iridium (NA)	Fluidigm (201192B)	191Ir 193Ir	Intercalant de l'ADN, identification des singulets	NA	NA	0,125 µmol/L
Cisplatine (NA)	Fluidigm (201198)	198Pt	Viabilité	NA	NA	0,5 µmol/L

Tableau XI. Panel de cytométrie de masse (CyTOF) utilisé pour la caractérisation des cellules myéloïdes et stromales des OLS.

ASC : cellules stromales adipocytaires (*adipose stromal cells*)

HFF : fibroblastes de prépuce humain (*human foreskin fibroblast*)

LAL : leucémie aiguë lymphoblastique / NA : non applicable

PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*), issues de sujets sains si absence de précision supplémentaire

Les anticorps CD45 et CD11b ont été achetés déjà couplés.

Les lignes en surbrillance bleue désignent les anticorps ayant fait l'objet d'un marquage intracellulaire. Les cellules préstimulées pour les besoins de la titration sont notées en rouge.

Conditions de stimulation : interféron α (IFNα, Roche, PEGASYS 180 µg 0,5 mL) à 20 ng/mL pendant 3 jours / phytohémagglutinine (PHA, Sigma-Aldrich) à 5 µg/mL pendant 3 jours / TNF (R&D Systems) à 10 ng/mL et lymphotoxine α1β2 (LT, R&D Systems) à 100 ng/mL pendant 3 jours / M-CSF (R&D Systems) à 1000 UI/mL pendant 3 jours / GM-CSF (R&D Systems) à 1000 UI/mL et IL-4 (ImmunoTools) à 200 UI/mL pendant 3 jours.

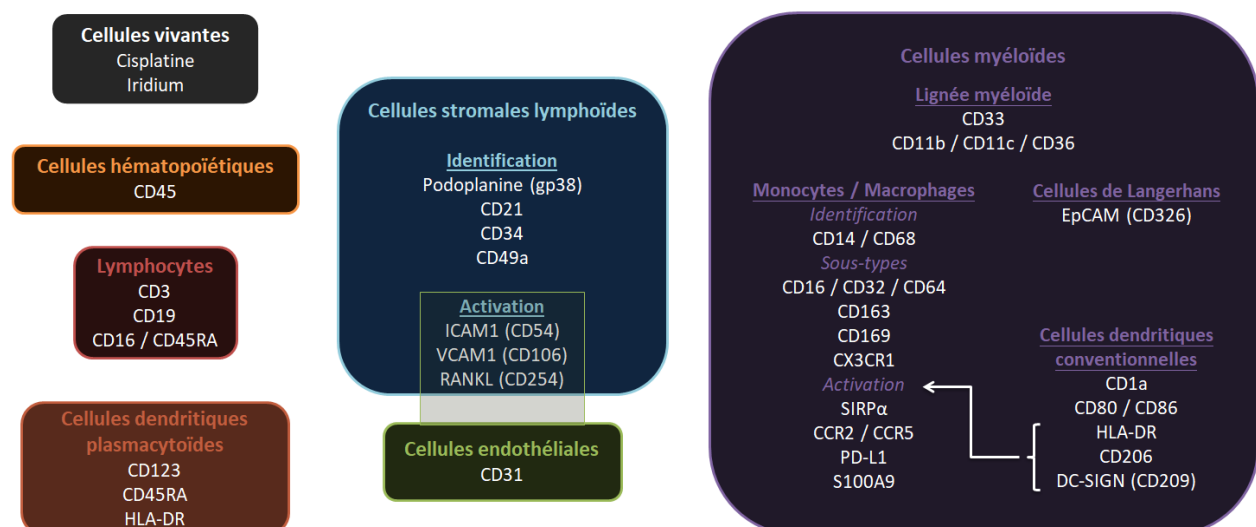


Figure 10. Discrimination des populations cellulaires par les marqueurs du panel de cytométrie de masse (CyTOF).

6) Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)

L'expression de 96 gènes d'intérêt dans la biologie des cellules myéloïdes ([tableau XII](#)) a été mesurée chez nos modèles de macrophages polarisés et les cellules U937 et U937 DC-SIGN, grâce à la technologie de PCR haut débit du système Biomark® (Fluidigm).

Succinctement, l'extraction des ARN à partir de cellules congelées a été réalisée à l'aide du kit Nucleospin RNA XS Plus® (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Les ADN complémentaires (ADNc) ont ensuite été obtenus par transcription inverse (Reverse Transcription Master Mix, Fluidigm) en utilisant un pool des 96 primers Taqman d'intérêt. Une amplification des ADNc a été effectuée pendant 14 cycles (Gene Expression Pre-amplification, Fluidigm). Le thermocycleur Mastercycler® (Eppendorf) a été utilisé pour ces étapes de transcription inverse et d'amplification. Les ADNc pré-amplifiés et les primers ont été déposés sur une plaque 96x96 (96.96 Dynamic Array™ IFC for Gene Expression, Fluidigm) avant chargement dans l'automate Biomark HD (Fluidigm).

Trois gènes de ménage (*ABL1*, *GAPDH* et *PUM1*) ont été intégrés parmi les gènes ciblés en vue d'une normalisation inter-échantillons. La linéarité des réactions de qPCR a été appréciée par la réalisation d'une dilution en cascade d'un pool d'échantillons.

Gène	Nom	Référence
Cytokines, chimiokines et leurs récepteurs		
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	Hs00234140_m1
CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	Hs00704702_s1
CCR4	Chemokine (C-C motif) receptor 4	Hs99999919_m1
CCR5	Chemokine (C-C motif) receptor 5	Hs00152917_m1
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor (M-CSF receptor)	Hs00911250_m1
CSF2RA	Colony stimulating factor 2 receptor subunit alpha (GM-CSF receptor subunit alpha)	Hs00531296_g1
CSF3R	Colony stimulating factor 3 receptor (G-CSF receptor)	Hs01114427_m1
CX3CR1	Chemokine (C-X3-C Motif) receptor 1	Hs01922583_s1
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Hs00236937_m1
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Hs00171042_m1
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Hs02330069_s1
IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	Hs01547656_m1
IFNGR1	Interferon gamma receptor 1	Hs00988304_m1
IFNGR2	Interferon gamma receptor 2	Hs00194264_m1
IL1B	Interleukin 1 beta	Hs01555410_m1
IL1R1	Interleukin 1 receptor type 1	Hs00991002_m1
IL10	Interleukin 10	Hs00961622_m1
IL10RA	Interleukine 10 receptor subunit alpha	Hs00155485_m1
IL10RB	Interleukine 10 receptor subunit beta	Hs00175123_m1
IL12A	Interleukin 12 subunit alpha (p35)	Hs01073447_m1
IL12B	Interleukin 12 subunit beta (p40)	Hs01011518_m1
IL12RB2	Interleukin 12 receptor subunit beta 2	Hs00155486_m1
IL4R	Interleukin 4 receptor	Hs00166237_m1
IL6R	Interleukin 6 receptor	Hs01075666_m1
PDGFA	Platelet derived growth factor subunit A	Hs00234994_m1
S100A8	S100 calcium binding protein A8	Hs00374263_m1
S100A9	S100 calcium binding protein A9	Hs00610058_m1
S100A12	S100 calcium binding protein A12	Hs00194525_m1
TGFB1	Transforming growth factor beta 1	Hs00998133_m1
TNF	Tumor necrosis factor	Hs00174128_m1
TNFRSF1B	TNF receptor superfamily member 1b (P75)	Hs00153550_m1
TNFRSF10A	TNF receptor superfamily member 10a	Hs00269492_m1
TNFRSF11B	TNF receptor superfamily member 11b (osteoprotegerin)	Hs00900360_m1
TNFRSF14	TNF receptor superfamily member 14 (Herpesvirus entry mediator, HVEM)	Hs00187058_m1
TNFRSF18	TNF receptor superfamily member 18 (Glucocorticoid-induced TNFR-related protein, GITR)	Hs00188346_m1
TNFRSF4	TNF receptor superfamily member 4 (OX40L receptor, CD134)	Hs00937194_g1
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Hs00173626_m1
Enzymes		
ARG1	Arginase 1	Hs00163660_m1
CYBB	Cytochrome b245 beta chain	Hs00166163_m1
HMOX1	Heme Oxygenase 1	Hs00157965_m1
IDO2	Indoleamine 2,3-dioxygenase 2	Hs00401201_m1
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B)	Hs00234579_m1
NOS2	Nitric oxide synthase 2 (NOS2)	Hs01075527_m1
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (COX2)	Hs00153133_m1
TGM2	Transglutaminase 2	Hs00190278_m1
Récepteurs des fragments constants des immunoglobulines (FcγR)		
FCGR1A/B/C	High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor Ia/Ib/Ic (CD64)	Hs00417598_m1
FCGR2A/C	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor IIa/IIc (CD32a, CD32c)	Hs00234969_m1
FCGR2B	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor IIb (CD32b)	Hs01634996_s1
FCGR3A/B	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor IIIa (CD16a, CD16b)	Hs00275547-m1
Récepteurs impliqués dans l'immunité innée		
AGER	Advanced glycosylation end product-specific receptor	Hs00542584_g1
CD209	CD209 molecule (DC-SIGN)	Hs01588349_m1
ITGAM	Integrin alpha M (CD11b)	Hs00355885_m1
MRC1	Mannose receptor C-type 1 (CD206)	Hs00267207_m1
MSR1	Macrophage scavenger receptor 1 (CD204)	Hs00234007_m1
SIGLEC1	Sialic acid binding Ig like lectin 1 (sialoadhesin, CD169)	Hs00224991_m1
SIRPA	Signal regulatory protein alpha (CD172a)	Hs00757426_s1
TLR2	Toll-like receptor 2	Hs00610101_m1
TLR3	Toll-like receptor 3	Hs00152933_m1

Gène	Nom	Référence
TLR4	Toll-like receptor 4	Hs00152939_m1
TLR5	Toll-like receptor 5	Hs00152825_m1
TLR6	Toll-like receptor 6	Hs01039989_s1
TLR7	Toll-like receptor 7	Hs01933259_s1
TLR9	Toll-like receptor 9	Hs00152973_m1
Phénotype		
CD14	CD14 molecule	Hs02621496_s1
CD163	CD163 molecule	Hs00174705_m1
CD27	CD27 molecule	Hs00386811_m1
CD274	CD274 molecule (Programmed Cell Death 1 Ligand 1, PD-L1)	Hs00204257_m1
CD276	CD276 molecule	Hs00987207_m1
CD33	CD33 molecule	Hs01076281_m1
CD36	CD36 molecule	Hs00169627_m1
CD40	CD40 molecule	Hs00374176_m1
CD44	CD44 molecule	Hs01075861_m1
CD68	CD68 molecule	Hs00154355_m1
CD69	CD69 molecule	Hs00934033_m1
CD80	CD80 molecule	Hs01045163_m1
CD86	CD86 molecule	Hs99999104_m1
HLA-DRA	Major histocompatibility complex class II DR alpha	Hs00219575_m1
PDCD1LG2	Programmed cell death 1 ligand 2 (PD-L2)	Hs01057777_m1
Voies de signalisation et différenciation cellulaire		
AHR	Aryl hydrocarbon receptor	Hs00169233_m1
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein alpha	Hs00269972_s1
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein beta	Hs00270923_s1
GATA3	GATA binding protein 3	Hs00231122_m1
HIF1A	Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha	Hs00153153_m1
IRF 4	Interferon regulatory factor 4	Hs00180031_m1
MAF	MAF BZIP transcription factor	Hs04185012_s1
MAFB	MAF BZIP transcription factor b	Hs00534343_s1
MERTK	MER proto-oncogene tyrosine kinase	Hs01031979_m1
PPARG	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	Hs00234592_m1
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	Hs01013996_m1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Hs01047580_m1
STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5A	Hs00559643_m1
STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B	Hs00560035_m1
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 1	Hs00598618_m1
Gènes de ménage		
ABL1	ABL proto-oncogene 1 non receptor tyrosine kinase	Hs01104728_m1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs99999905_m1
PUM1	Pumilio RNA binding family member 1	Hs00206469_m1

Tableau XII. Liste des primers Taqman utilisés pour la PCR quantitative haut débit.

7) Cytométrie en flux

Les sondes utilisées sont détaillées dans le [tableau XIII](#).

Les marquages ont été réalisés en membranaire (incubation pendant 30 min à 4°C).

La liaison de DC-SIGN aux lignées cellulaires de Burkitt et aux lymphocytes B de FL a été évaluée par la protéine chimérique DC-SIGN/Fc (R&D Systems, Minneapolis, Etats-Unis). Le marquage a été révélé soit indirectement par un anticorps anti-DC-SIGN soit directement par couplage de la protéine chimérique à un fluorochrome (Alexa Fluor 647 Conjugation Kit Lightning-Link, Expedeon/Innova Biosciences, Cambridge, Angleterre).

Du fait du caractère calcium-dépendant de la liaison de DC-SIGN à ses ligands, l'incubation de la protéine DC-SIGN/Fc a été réalisée dans un tampon spécial (« *lectin buffer* »). Sa composition était la suivante : Tris 10 mM pH 7,4 (Sigma-Aldrich), NaCl 154 mM (Sigma-Aldrich), BSA 3% (Sigma-Aldrich), NaN₃ (Sigma-Aldrich), CaCl₂ 10 mM (Sigma-Aldrich) (90).

Avant le marquage des lymphocytes B de FL, les récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines G (FcγR) ont été saturés par la Tégéline® 4‰.

Marquage des cellules dendritiques immatures					
Cible	Clone	Espèce	Isotype	Fournisseur	Fluorochrome
DC-SIGN	9E9A8	Souris	IgG2a	BioLegend	PE
Marquage des lymphocytes BL2 et L3055					
Cible	Clone	Espèce	Isotype	Fournisseur	Fluorochrome
CD19	J3-119	Souris	IgG1	Beckman Coulter	APC Alexa Fluor 750
rhDC-SIGN/Fc		Homme	IgG1	R&D Systems	
DC-SIGN	9E9A8	Souris	IgG2a	BioLegend	PE
Marquage des lymphocytes B de FL					
Cible	Clone	Espèce	Isotype	Fournisseur	Fluorochrome
CD19	H1B19	Souris	IgG1k	BD Horizon	BV421
Lambda	Polyclonal	Chèvre	F(ab') ₂	Beckman-Coulter	FITC
IgM	Polyclonal	Goat	F(ab') ₂	Southern Biotech	PE
rhDC-SIGN/Fc		Homme	IgG1	R&D Systems	A647 (kit Expedeon)

Tableau XIII. Liste des sondes utilisées en cytométrie en flux.

Les acquisitions ont été effectuées sur un cytomètre BD LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences, Franklin Lakes, Etats-Unis) à partir de suspensions cellulaires contenues dans des tubes en polystyrène (Falcon).

Les fichiers FCS ont été analysés sur le logiciel FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, Etats-Unis, version 10.7).

8) Internalisation de DC-SIGN

L'internalisation de DC-SIGN a été mesurée par le suivi de l'intensité de fluorescence (141) après coculture des cellules exprimant DC-SIGN (U937 DC-SIGN ou macrophages M-IL4) avec des lymphocytes B exprimant un BCR mannosylé (L3055, lymphocytes B de FL) ou non (BL2). Les cellules (rapport 1 pour 1) ont été mises en contact par culottage (centrifugation douce) et incubées à 37°C pendant 10, 30, 60 ou 90 minutes. Après resuspension, les cellules ont été marquées sur glace pendant 30 minutes. Un marquage par DAPI (Sigma-Aldrich) a été réalisé pour éliminer les cellules mortes lors de l'analyse.

Des cellules DC-SIGN^{pos} seules (sans lymphocytes B) ont été marquées afin d'obtenir la fluorescence de base et ainsi apprécier son évolution après coculture.

L'anticorps murin AZN-D1 (Beckman Coulter), connu pour se fixer sur le domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) de DC-SIGN et ainsi entraîner son internalisation (142), a été utilisé comme contrôle positif.

9) Analyses bio-informatiques et statistiques

Les données issues du CyTOF ont été analysées sur la plateforme Cytobank (Santa Clara, Etats-Unis) en procédant de la façon suivante :

- Sélection des singulets ($^{191}\text{Ir}^{\text{pos}}$ $^{193}\text{Ir}^{\text{pos}}$) et des cellules viables ($^{195}\text{Pt}^{\text{neg}}$)
- Exclusion des lymphocytes B (CD19^{pos}) et T (CD3^{pos}) résiduels si nécessaire
- Elimination des billes de normalisation résiduelles (billes couplées à l'isotope ^{140}Ce),
- Utilisation de l'algorithme t-sne (*t-distributed stochastic neighbor embedding*) (143) avec les paramètres standards (1000 itérations, perplexité 30, théta 0,5).

A noter que pour les échantillons d'OLS, des t-SNE successifs utilisant les marqueurs CD11b, CD11c, CD14, CD33, CD36, CD68, CD123 et HLA-DR ont permis de peaufiner le nettoyage des fichiers fcs et de sélectionner les populations myéloïdes d'intérêt.

Les nuages de points ont été réalisés grâce au logiciel Graphpad Prism (La Jolla California, Etats-Unis, version 5.03).

Les représentations graphiques *heatmaps* ont été réalisées par l'intermédiaire des logiciels R (R Core Team, Vienne, Autriche, <http://www.R-project.org>, version 3.6.0) et RStudio (RStudio Team, Boston, Etats-Unis, <http://www.rstudio.com>, version 1.2.1335) à l'aide du package *pheatmap*.

Les données de CyTOF ont été transformées (fonction arcsin) et mises à l'échelle par marqueurs (fonction *scale*).

Les données de transcriptomique ($2^{-\Delta\text{CT}}$) ont été nettoyées des valeurs aberrantes et mises à l'échelle par marqueurs (fonction *scale*).

Résultats

1) Mise en place du marquage DC-SIGN en CyTOF

En 2018, le laboratoire a commencé à développer un panel de cytométrie de masse pour étudier les populations stromales et myéloïdes des OLS humains. Le panel finalisé a d'abord été testé sur 3 ganglions (patients #1 à #3) traités selon le protocole de dissociation mécano-enzymatique mis en place (voir Matériel et méthodes), fin 2018.

Parmi les 37 marqueurs testés, seul DC-SIGN était complètement négatif sur les 3 échantillons (figure 11). Cette absence d'expression ganglionnaire, notamment chez le patient #1 (diagnostic de FL), nous a surpris au vu des données de la littérature (96) et de nos propres travaux qui avaient mis en évidence des cellules myéloïdes DC-SIGN^{pos} en immunofluorescence et en cytométrie en flux, dans une stratégie sans dissociation enzymatique (92).

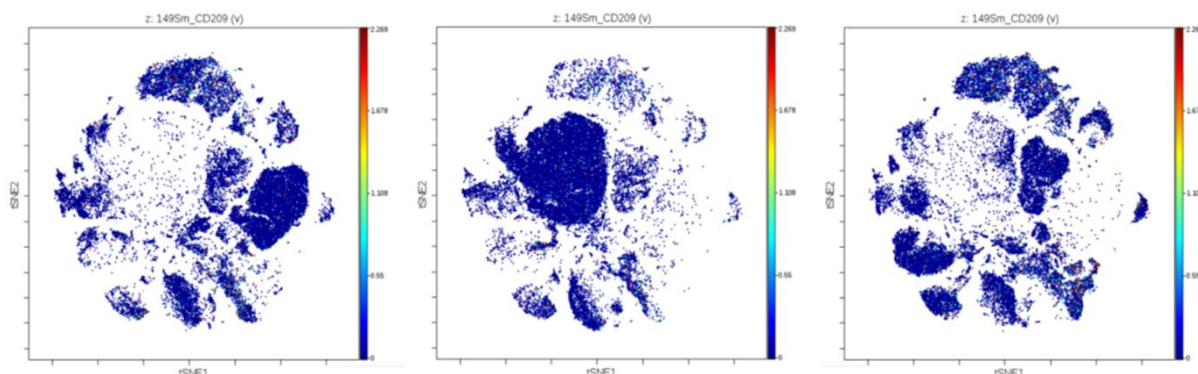


Figure 11. Absence de marquage membranaire DC-SIGN sur cellules myéloïdes (CD3^{neg} CD19^{neg}) issues d'OLS après dissociation mécano-enzymatique (représentation viSNE). De gauche à droite, patient #1 (ganglion de FL au diagnostic), #2 (ganglion de FL en rechute) et #3 (ganglion non tumoral).

viSNE : *visualization of t-distributed stochastic neighbor embedding*

L'ensemble des anticorps du panel, dont celui ciblant DC-SIGN, ayant été préalablement titrés sur des contrôles positifs (non soumis à la dissociation mécano-enzymatique) (figure 12), l'hypothèse d'une dégradation des épitopes par les enzymes de dissociation a été émise. Pour la vérifier, un marquage membranaire de DC-SIGN sur cellules dendritiques immatures (iDC) a été réalisé en cytométrie en flux en comparant l'effet de la dissociation à un échantillon contrôle. On constate une nette diminution de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI, *mean fluorescence intensity*) (figure 13A). La sensibilité du CyTOF étant plus faible que celle de la cytométrie en flux (140), cette diminution de MFI expliquerait donc l'absence de signal détecté en CyTOF pour DC-SIGN.

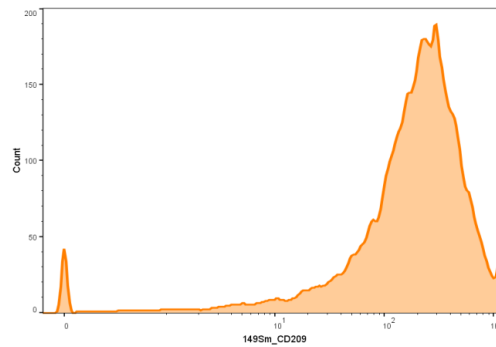


Figure 12. Titration CyTOF de l'anticorps anti-DC-SIGN (CD209 ; concentration 2 $\mu\text{g/mL}$). L'anticorps anti-DC-SIGN a été couplé à l'isotope ^{149}Sm puis titré sur un échantillon contenant des iDC (contrôle positif) et des PBMC.

A noter la nette séparation entre les cellules positives et négatives.

iDC : cellules dendritiques immatures / PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique

Nous avons ensuite testé un marquage intracellulaire de DC-SIGN pour essayer de nous affranchir des effets de la dissociation enzymatique. Une telle option apparaît très satisfaisante puisque le ratio d'intensité moyenne de fluorescence (RMFI) est élevé, de l'ordre de celui obtenu avec un marquage membranaire en l'absence de dissociation (figure 13B). A noter que le marquage intracellulaire révèle aussi bien les molécules de DC-SIGN membranaires que cytoplasmiques sur un échantillon non dissocié. Lors du traitement enzymatique, les formes membranaires sont dégradées : seules les formes intracellulaires sont détectées, d'où une RMFI plus basse qu'en l'absence de dissociation.

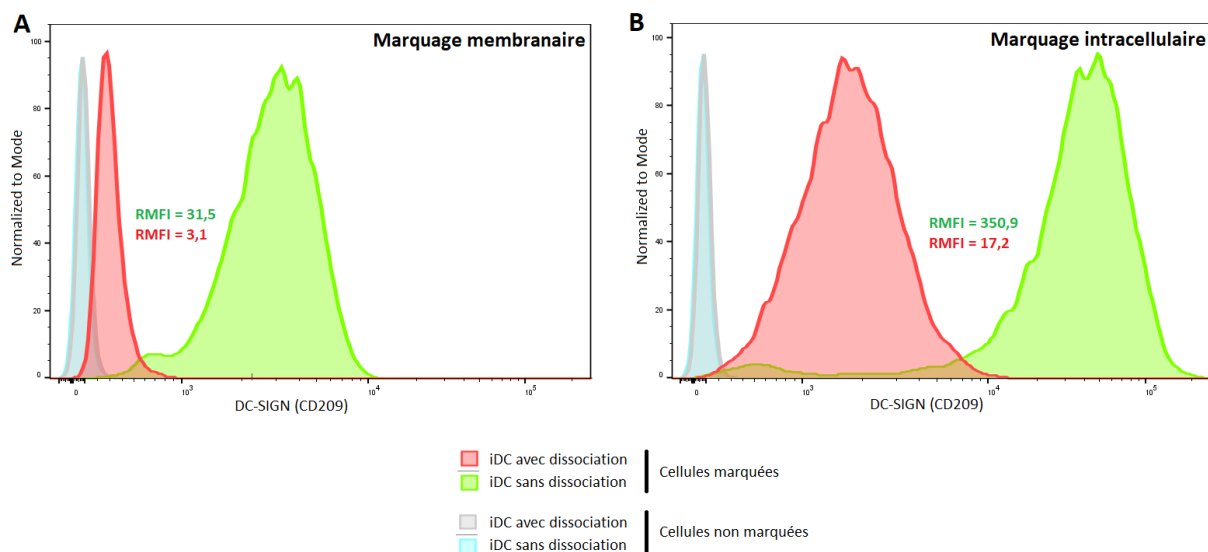


Figure 13. Impact de la dissociation sur le marquage DC-SIGN en cytométrie en flux.

13A. Marquage membranaire DC-SIGN sur iDC traitées ou non par le protocole de dissociation

13B. Marquage intracellulaire DC-SIGN sur iDC traitées ou non par le protocole de dissociation

iDC : cellules dendritiques immatures / RMFI : ratio de moyenne d'intensité de fluorescence

Le protocole de marquage CyTOF a donc été modifié en conséquence (l'anticorps DC-SIGN a intégré le cocktail d'anticorps à cibles intracellulaires) avant d'être retesté. Un mélange constitué des contrôles cellulaires positifs de tous les anticorps (10 types d'échantillons différents dont des iDC) a été marqué avec le protocole actualisé. La figure 14 montre que cette nouvelle approche est capable de discriminer les iDC parmi les cellules marquées.

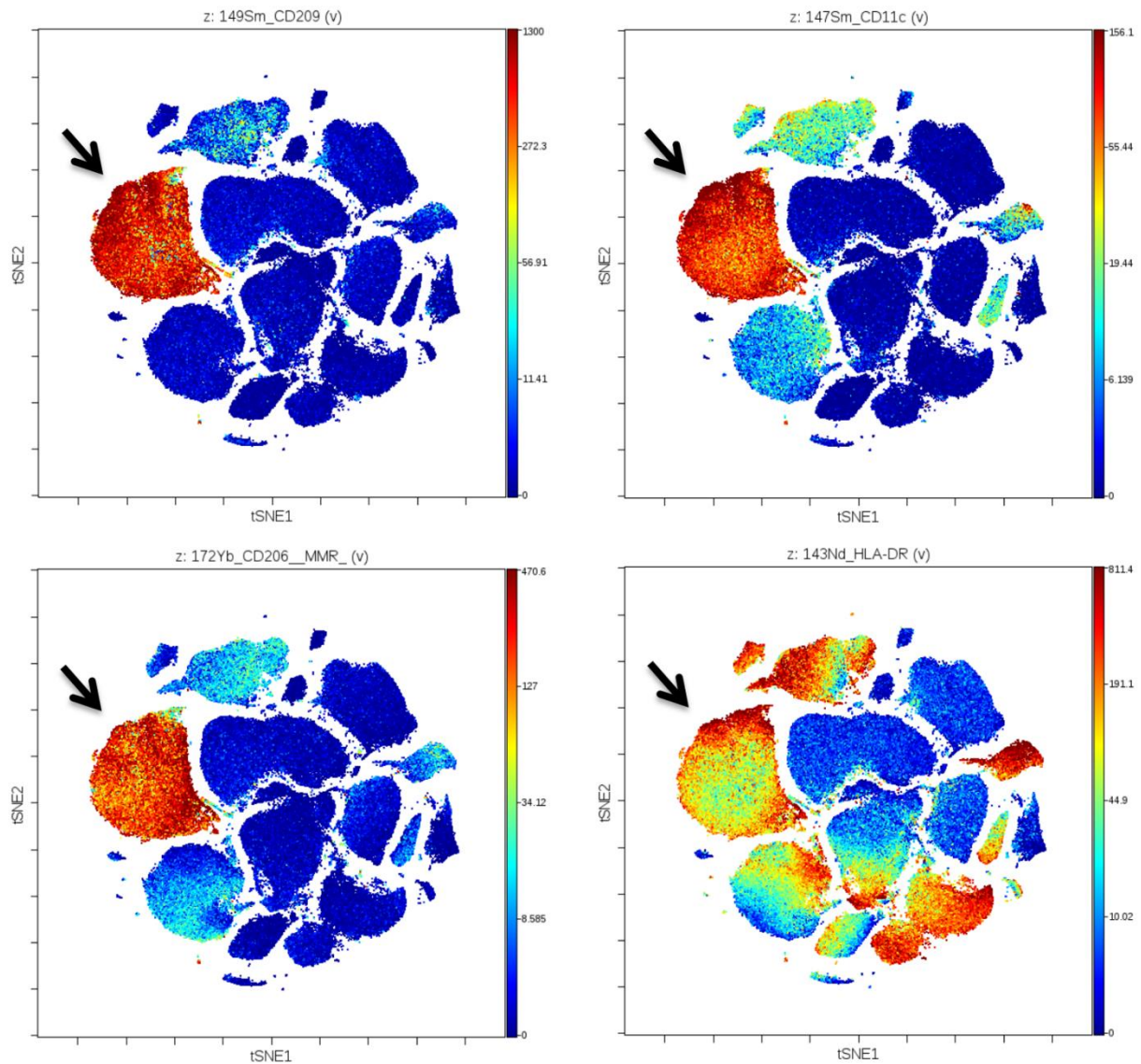


Figure 14. Discrimination des cellules DC-SIGN^{pos} au sein d'un mélange de plusieurs types cellulaires grâce au panel CyTOF - marquage DC-SIGN intracellulaire (représentation viSNE). Les cellules DC-SIGN^{pos} (indiquées par la flèche) ont bien le phénotype des iDC utilisées comme contrôle positif pour DC-SIGN : CD11b^{pos} CD11c^{pos} CD33^{pos} CD80^{low} CD86^{low} CD206^{pos} HLA-DR^{pos} SIRPα^{pos} S100A9^{pos}.

Les autres contrôles positifs étaient des lignées cellulaires (Daudi, K562, U937), des monocytes, des PBMC (issues de sujets sains et d'un patient atteint d'une leucémie aiguë CD34^{pos}) et des cellules stromales adipocytaires stimulées par TNF et lymphotoxine. Certaines cellules ont été préalablement stimulées : des monocytes par IFNα et des PBMC de sujets sains par phytohémmagglutinine.

iDC : cellules dendritiques immatures

viSNE : *visualization of t-distributed stochastic neighbor embedding*

2) Hétérogénéité des cellules DC-SIGN^{pos} au sein des ganglions de FL

Le panel CyTOF validé, nous avons pu marquer plusieurs échantillons de patients pour apprécier l'hétérogénéité du compartiment DC-SIGN^{pos} au sein des OLS. 5 ganglions de FL (patients #4 à #7) et 3 ganglions réactionnels (*reactive lymph nodes*, patients #8 à #10) ont ainsi été étudiés.

Une première visualisation des cellules exprimant DC-SIGN a été obtenue grâce au logiciel FlowJo. Les histogrammes d'expression (figure 15A) semblent montrer une certaine homogénéité dans le pourcentage des cellules DC-SIGN^{pos} chez les ganglions de FL par rapport aux rLN. Cette impression est confirmée par la figure 15B : les ganglions de FL contiennent environ 40% de cellules myéloïdes DC-SIGN^{pos} tandis que ce pourcentage varie de 10% (patient #9) à 40% (patient #10) chez les rLN. Globalement, on observe une tendance vers une plus forte proportion de cellules DC-SIGN^{pos} au sein des ganglions de FL par rapport aux ganglions rLN (figure 15C).

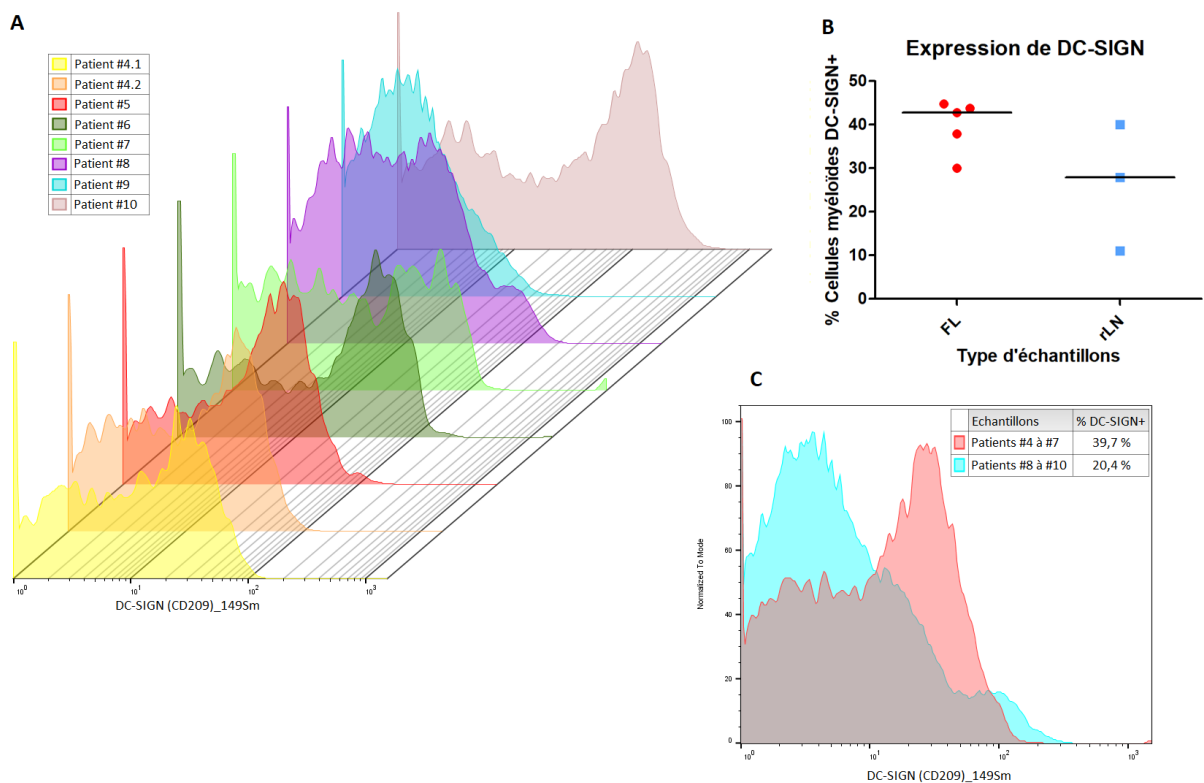


Figure 15. Expression de DC-SIGN en cytométrie de masse (CyTOF) au sein d'OLS de FL et de rLN, après exclusion des lymphocytes résiduels (cellules CD3^{neg} CD19^{neg}).

15A. Histogrammes d'expression de DC-SIGN au sein des cellules myéloïdes d'OLS des différents patients (représentation *overlay stagger offset*).

Les patients #4 à #7 sont atteints de FL. Les prélèvements des patients #8 à #10 sont des ganglions réactionnels (rLN). A noter que deux OLS différents ont été marqués pour le patient #4.

15B. Nuage de points représentant le pourcentage de cellules myéloïdes DC-SIGN^{pos} au sein des OLS de FL et de rLN.

15C. Histogramme d'expression de DC-SIGN global entre OLS de FL et de rLN.

FL : lymphome folliculaire / rLN : ganglion réactionnel

Pour déterminer la diversité phénotypique des cellules exprimant DC-SIGN, une analyse multidimensionnelle viSNE a été réalisée en utilisant les marqueurs connus pour discriminer les cellules myéloïdes (144) et inclus dans notre panel CyTOF, à savoir CD1a, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD64, CD163, CD172a, CCR2, CD206, CD209, CX3CR1, HLA-DR et S100A9.

On dénombre 5 îlots exprimant fortement DC-SIGN (figure 16A) dont les phénotypes sont comparés à l'aide d'une *heatmap* (figure 16B). A noter que toutes les cellules expriment la sous-unité de la calprotectine S100A9 – confirmant leur nature myéloïde (145) – et sont négatives pour les marqueurs CD1a, CD16, CD80, CD86, CD163, CD274 et CX3CR1.

L'îlot 1, avec seulement quelques marqueurs positifs, est le seul à exprimer fortement CD68, traditionnellement utilisé pour mettre en évidence les macrophages en immunohistochimie. L'îlot 2, lui aussi caractérisé par un faible nombre de marqueurs positifs, exprime faiblement une autre lectine de type C, le récepteur du mannose (CD206).

Les îlots 3 à 5 expriment HLA-DR et CCR2 et semblent donc de nature macrophagique. L'îlot 3 est de phénotype CD36^{pos} CD64^{lo} CCR2^{pos} CD206^{pos} DC-SIGN^{pos} HLA-DR^{pos}. Les îlots 4 et 5 présentent quant à eux des profils proches : ils partagent le phénotype CD11b^{pos} CD11c^{lo} CD14^{pos} CD64^{pos} SIRPα^{pos} CCR2^{pos} HLA-DR^{pos} et diffèrent par le niveau d'expression de certains marqueurs (CD33^{pos} CD36^{hi} CD206^{pos} DC-SIGN^{pos} pour l'îlot 4 ; CD33^{lo} CD36^{hi} CD206^{lo} DC-SIGN^{hi} pour l'îlot 5).

La répartition des îlots est très hétérogène en fonction des échantillons : on note aussi bien une variabilité intra-conditions qu'inter-conditions (figure 16C). Toutefois, on remarque que l'îlot 5 est uniquement présent au sein du ganglion réactionnel du patient #10 et que l'îlot 4 semble spécifique des ganglions de FL.

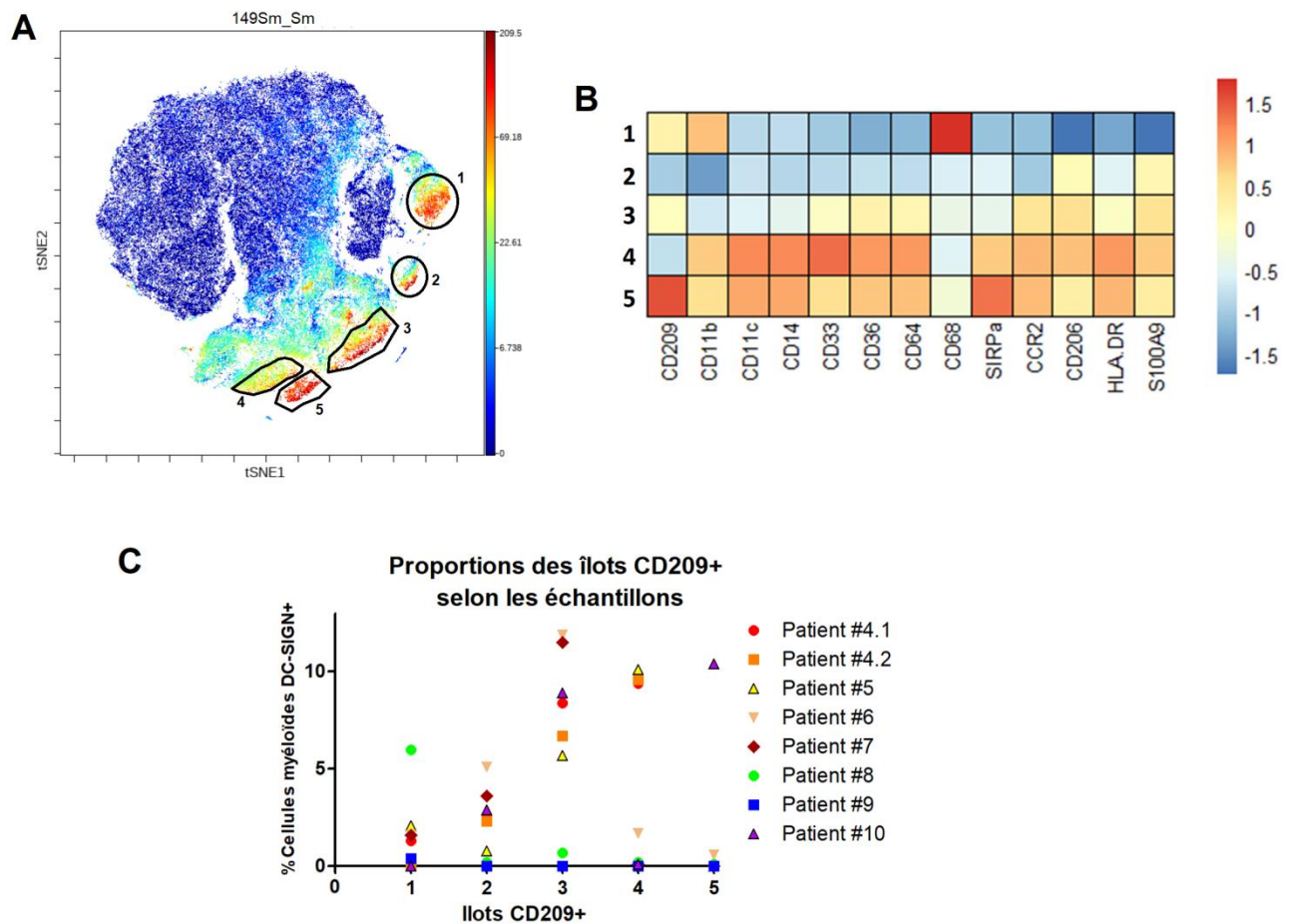


Figure 16. Hétérogénéité des cellules DC-SIGN^{pos} au sein des OLS de FL et de rLN.

16A. Discrimination des cellules myéloïdes issues de 5 OLS de FL et 3 OLS de rLN par analyse viSNE selon les marqueurs CD1a, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD64, CD163, CD172a, CCR2, CD206, CD209, CX3CR1, HLA-DR et S100A9 (proposés par (144)).

Les îlots exprimant fortement DC-SIGN sont entourés et numérotés.

16B. Comparaison phénotypique des îlots DC-SIGN^{pos} (représentation en *heatmap*).

16C. Répartition des îlots DC-SIGN^{pos} en fonction des échantillons d'OLS.

FL : lymphome folliculaire / rLN : ganglion réactionnel

viSNE : *visualization of t-distributed stochastic neighbor embedding*

3) Mise en place de modèles myéloïdes mimant les TAM de FL

Les TAM de FL étant des cellules relativement rares et difficiles à purifier, nous avons choisi dans un premier temps de développer des modèles de polarisation de monocytes en macrophages pour explorer le rôle de l'interaction BCR/DC-SIGN au sein de la niche du FL. Nous nous sommes conformés aux recommandations expérimentales sur le sujet (146).

En plus des polarisations traditionnelles par IFN γ et IL-4, nous avons utilisé d'autres agents de stimulation qui ont prouvé leur capacité à générer des macrophages différents des polarisations traditionnelles « M1-like » et « M2-like » (137–139). Nous avons aussi testé une combinaison inédite (M-FL) visant à reproduire le microenvironnement tumoral du FL, et notamment les signaux délivrés par les lymphocytes T_{FH}. La condition M-FL apporte de l'IL-4, cytokine la plus fortement dérégulée dans un ganglion de FL (98), ainsi que deux autres molécules produites par les T_{FH} et susceptibles d'impacter la polarisation macrophagique, CD40L et TNF (147). A noter que l'IL-4 présente un autre intérêt dans ce contexte : elle favorise le dialogue entre les TAM et les lymphocytes B de FL en augmentant l'expression de DC-SIGN (148) par les premiers et de l'IgM de surface par les seconds (92).

Afin d'évaluer l'interaction BCR/DC-SIGN et réaliser ultérieurement des expériences de signalisation, nous avons aussi utilisé U937 DC-SIGN, une lignée cellulaire de leucémie aigüe monoblastique transfectée pour exprimer DC-SIGN. Ces modèles ont été évalués par qPCR et CyTOF.

a) Proximité d'expression génique entre les macrophages M-IL4 et M-FL, les lignées U937 et U937 DC-SIGN et les TAM

La quantification de l'expression de 96 gènes d'intérêt a été réalisée grâce au système de qPCR Biomark® sur des échantillons de macrophages (quatre essais de polarisation P1 à P4, utilisant des monocytes de donneur différent à chaque essai) et de cellules U937 et U937 DC-SIGN. Les résultats sont présentés sous la forme d'une *heatmap* (figure 17).

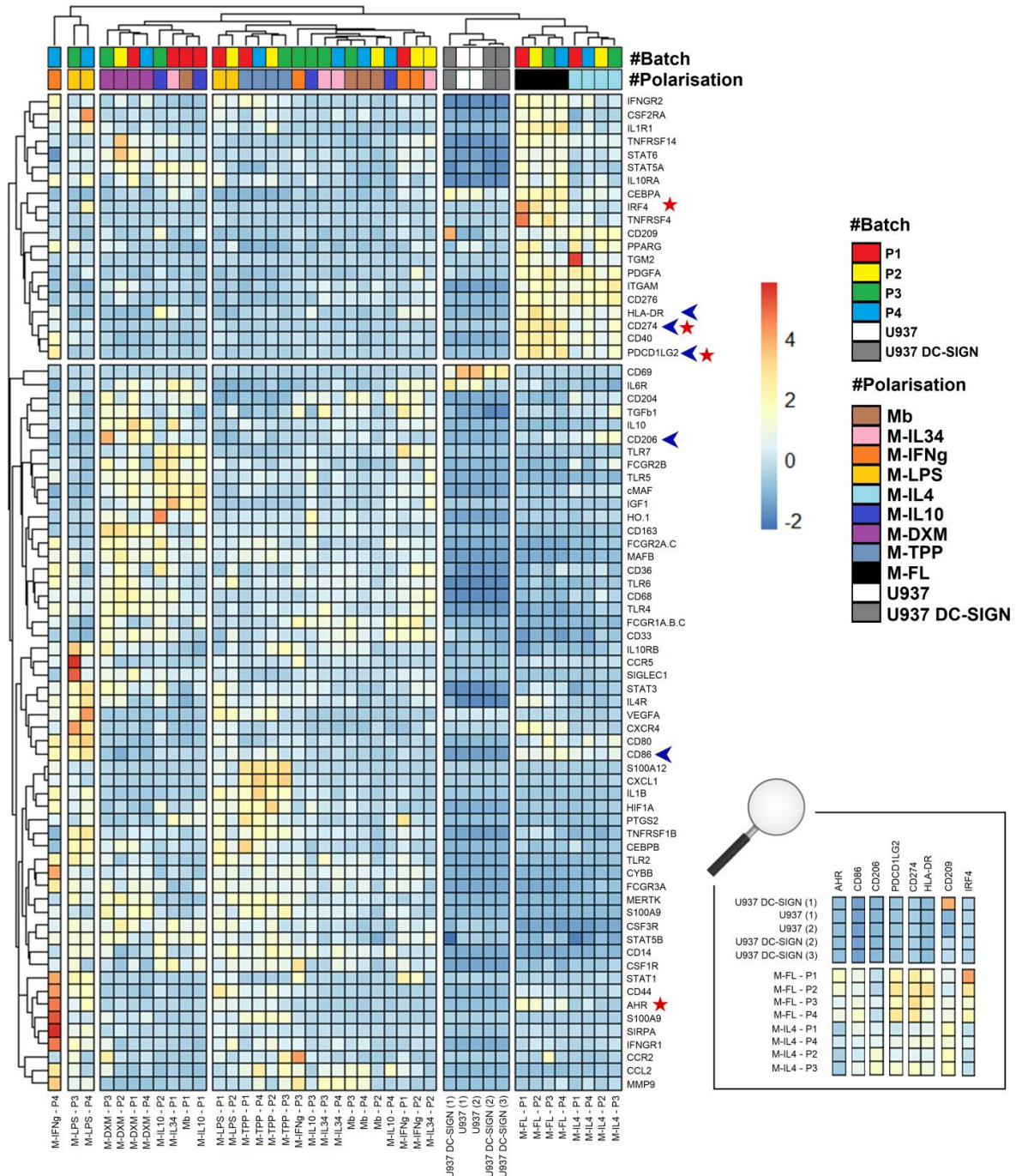


Figure 17. Comparaison de l'expression génique des modèles macrophagiques et des cellules U937 et U937 DC-SIGN (représentation *heatmap*).

Flèches bleues : gènes connus pour être exprimés par les TAM de FL (d'après (149))

Etoiles rouges : gènes de TAM surexprimés par les M-FL par rapport aux M-IL4 (*fold-change* > 2)

FL : lymphome folliculaire / TAM : macrophages associés aux tumeurs

Tout d'abord, les macrophages se rassemblent bien en fonction de leur polarisation et non en fonction du lot de monocytes utilisé pour la différenciation *in vitro* : l'effet *batch* est donc limité. Ainsi on remarque que les macrophages M-FL (rectangles noirs) clustérisent avec les macrophages M-IL4 (rectangles bleu clair), ce qui n'est pas surprenant puisque l'IL-4 est un des trois agents stimulants de la condition M-FL.

Les macrophages issus de ces deux polarisations expriment le gène *CD209*, comme attendu puisque l'IL-4 est un inducteur de DC-SIGN (148). Ces macrophages expriment d'autres gènes associés aux TAM de FL (149), comme *HLA-DR*, *CD86*, *CD206*, *CD274* et *PDCD1LG2* – qui codent respectivement pour HLA-DR, CD86, CD206, PD-L1 et PD-L2 – et apparaissent donc être de bons modèles de TAM pour nos travaux.

A noter que les macrophages M-FL présentent une expression augmentée de gènes précédemment décrits comme importants dans la biologie des TAM, comme *IRF4* et *AHR* qui codent respectivement pour les facteurs de transcription IRF4 et AhR (100,150,151), mais aussi *CD274* et *PDCD1LG2*, ce qui souligne l'intérêt d'utiliser ce modèle en plus de la simple condition M-IL4.

Les cellules U937 DC-SIGN nous semblent aussi intéressantes. Même si elles n'expriment pas de gènes de TAM, leur profil d'expression génique est plus proche de celui des macrophages M-FL et M-IL4 que d'aucun autre modèle développé ici. Cette lignée représente donc un modèle d'étude de l'interaction BCR/DC-SIGN prometteur pour une première approche. De plus, son profil d'expression génique est très semblable à celui de la lignée U937 : seule l'expression de *CD209* diffère entre la lignée transfectée et la lignée originelle, qui pourra être utilisée comme contrôle.

b) Caractérisation du phénotype des différents types de macrophages polarisés *in vitro*

Le phénotype des macrophages issus des 9 conditions de polarisation a été déterminé par CyTOF. La figure 18 montre les différences d'expression des marqueurs. Les phénotypes de nos modèles nous paraissent globalement en accord avec les données de la littérature (138,139,148,152–154) malgré quelques différences. Par exemple la molécule de costimulation CD80, classiquement associée aux macrophages « M1-like », est plus fortement exprimée sur les macrophages M-IL4 (« M2-like ») que sur les macrophages M-IFN γ . Le cas contraire se produit avec PD-L1, traditionnellement associé aux macrophages « M2-like », qui est ici exprimé à un niveau élevé chez les macrophages M-LPS (« M1-like »). Notre modèle M-FL récapitule bien le phénotype des TAM de FL décrit par une étude préliminaire (149), à savoir CD86^{pos} CD206^{pos} HLA-DR^{pos} PD-L1^{pos}. Les macrophages M-IL4 présentent eux aussi ce phénotype – l'expression élevée de CD86 dans ce modèle est cohérente avec certaines données de la littérature (138) et discordante avec d'autres (139,154).

A noter que l'effet *batch* semble plus important que lors de l'évaluation des profils d'expression génique.

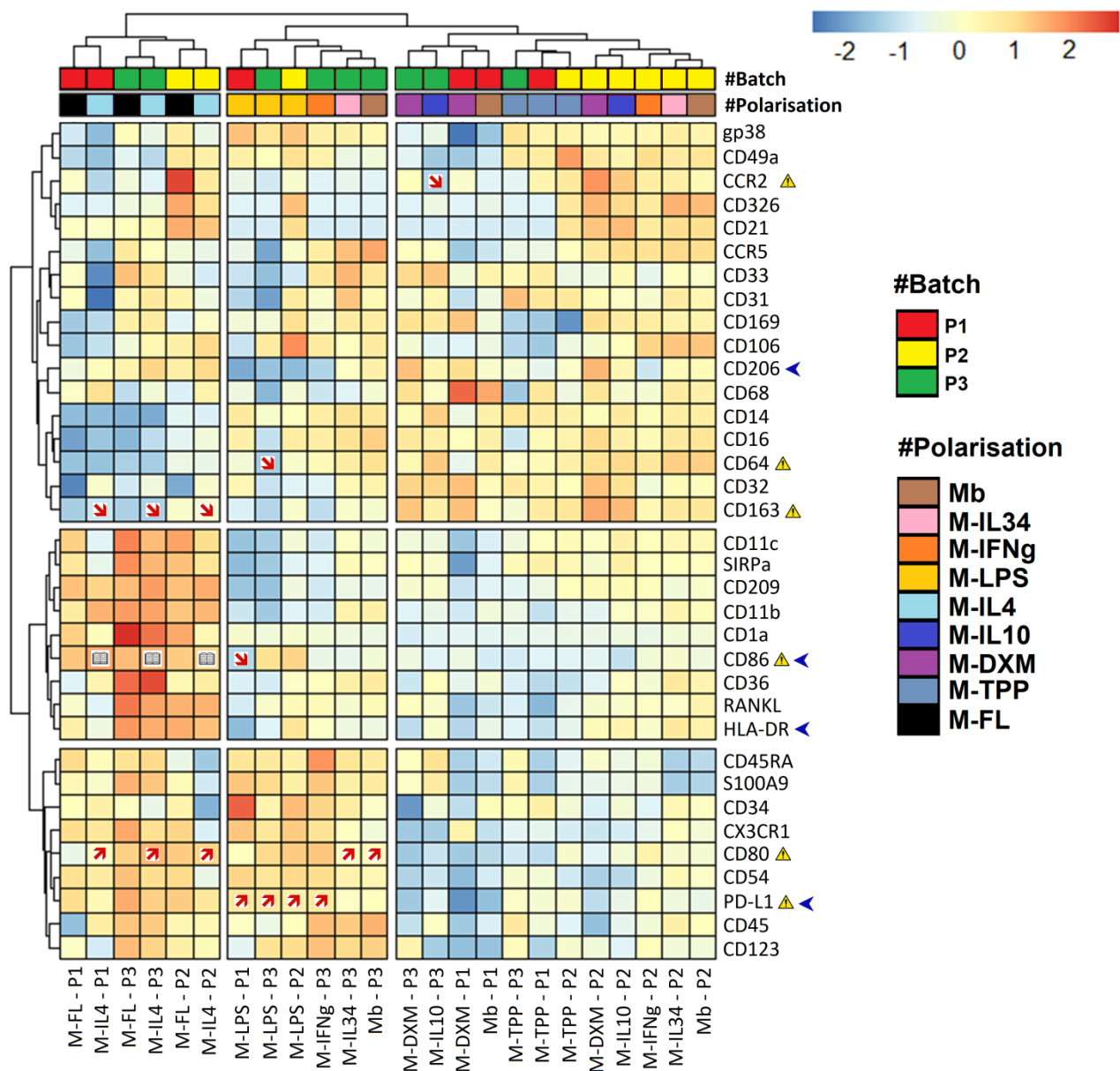


Figure 18. Différences phénotypiques entre les polarisations macrophagiques (CyTOF).

Heatmap comparant les phénotypes des 9 conditions de polarisations macrophagiques

Les panneaux jaunes signalent les marqueurs dont l'expression discord avec la littérature (138,139,148,152–154). Le sens de la discordance est précisé par une flèche montante ou descendante dans les cases concernées.

Un symbole en forme de livre signifie que les données de la littérature sont divergentes.

Les flèches bleues désignent les marqueurs connus pour être exprimés par les TAM de FL (d'après (149)) et retrouvés chez les macrophages M-IL4 et M-FL.

c) Proximité phénotypique des lignées U937 et U937 DC-SIGN avec les macrophages M-IL4 et M-FL

Le phénotype des lignées U937 et U937 DC-SIGN a aussi été déterminé en CyTOF (figure 19) : il est en accord avec les données de la littérature (155–160). Hormis l'expression de DC-SIGN, on ne note pas de différence majeure entre les phénotypes des cellules U937 et U937 DC-SIGN.

Comme ce qui était attendu au vu des très faibles niveaux d'expression des gènes *CD86*, *CD206*, *HLA-DR* et *CD274* (figure 17), ces cellules n'expriment pas les marqueurs *CD86*, *CD206*, *HLA-DR* et *PD-L1* et ne sont donc clairement pas un bon modèle de TAM de FL. Leur phénotype est nettement différent de celui des macrophages M-IL4 et M-FL : ces lignées ne seront donc utilisées qu'à but exploratoire dans l'étude des effets de l'interaction BCR/DC-SIGN.

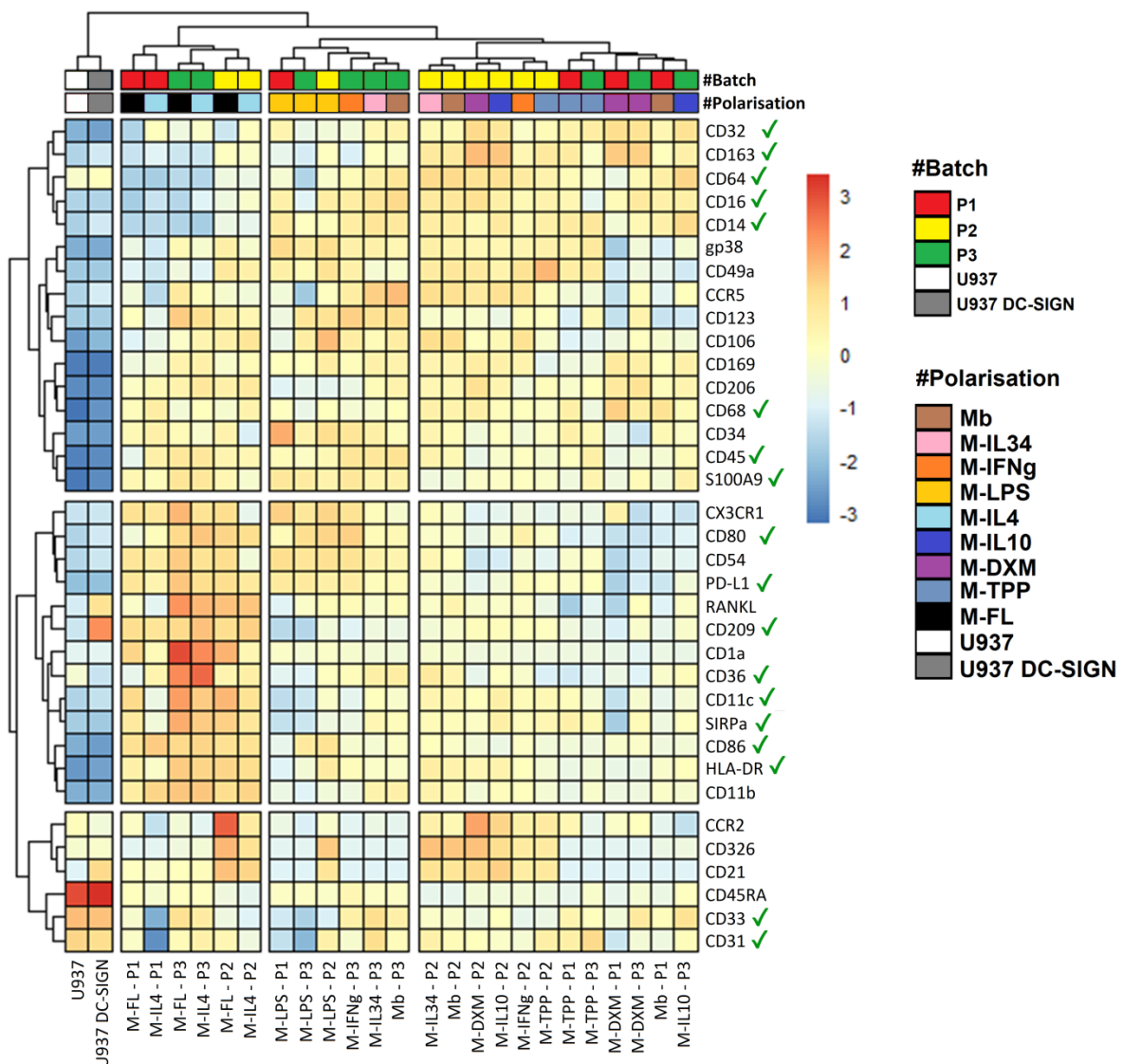


Figure 19. Différences phénotypiques entre les polarisations macrophagiques et les cellules U937 et U937 DC-SIGN (CyTOF).

Heatmap comparant les phénotypes des 9 conditions de polarisations macrophagiques et des cellules U937 et U937 DC-SIGN. Les encoches vertes représentent les marqueurs dont l'expression est en accord avec la littérature (155–160).

4) Absence d'internalisation de DC-SIGN après interaction avec un BCR mannosylé

DC-SIGN est une lectine connue pour s'internaliser après liaison à ses ligands (96). Nous nous sommes demandés si la reconnaissance d'un BCR mannosylé par DC-SIGN était capable d'entraîner son internalisation. Nous avons pour cela établi des cocultures entre des lymphocytes B exprimant un BCR mannosylé et des cellules myéloïdes exprimant DC-SIGN. L'expression membranaire de DC-SIGN avant et après coculture a été mesurée par cytométrie en flux.

a) La lignée L3055 n'entraîne pas l'internalisation de DC-SIGN chez les monoblastes U937-DC-SIGN

Comme souligné dans le paragraphe 3, les cellules primaires de FL, notamment les TAM, sont difficiles à purifier. Nous avons donc commencé par un modèle de coculture utilisant des lignées cellulaires de lymphome de Burkitt (BL2 ou L3055) d'une part et des monoblastes U937 DC-SIGN d'autre part. Il a été démontré que la lignée L3055 exprime un BCR mannosylé, contrairement à la lignée BL2 (87) qui sera utilisée ici comme contrôle.

Pour nous assurer de la capacité de DC-SIGN à se lier à L3055, nous avons incubé les cellules lymphomateuses avec une protéine chimérique, DC-SIGN/Fc (rhDC-SIGN : *recombinant human DC-SIGN*), composée de la partie extracellulaire de DC-SIGN responsable de la reconnaissance des ligands sucrés et de la partie Fc (fragment cristallisable) d'une IgG1. Comme DC-SIGN est une lectine de type C, c'est-à-dire calcium-dépendante, l'incubation a été réalisée dans un tampon contenant du chlorure de calcium (*lectin buffer*). Un anticorps anti-DC-SIGN a été utilisé pour révéler les protéines rhDC-SIGN fixées.

La figure 20 montre une nette augmentation de la MFI, plus marquée pour L3055, lorsque la protéine chimérique est incubée préalablement au marquage membranaire DC-SIGN. DC-SIGN se fixe donc plus fortement à la lignée exprimant un BCR mannosylé.

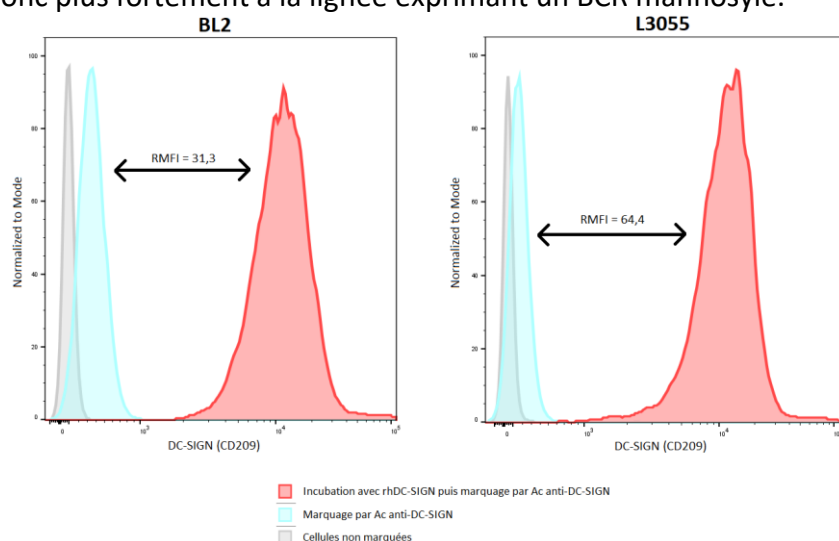


Figure 20. Liaison de rhDC-SIGN aux lignées de lymphome de Burkitt, BL2 et L3055.

Capacité de rhDC-SIGN à se lier à BL2 et L3055, évaluée par cytométrie en flux

Ac : anticorps / rhDC-SIGN : protéine DC-SIGN chimérique

RMFI : ratio de moyenne d'intensité de fluorescence

La liaison de DC-SIGN à BL2, inférieure à celle de L3055 mais bien présente, n'est cependant pas surprenante. Une telle liaison avait été décrite chez les lymphocytes B normaux (n'exprimant pas de BCR mannosylé) et ne déclenchait pas de signalisation BCR (90). On ne peut pas non plus exclure une liaison non spécifique de la protéine rhDC-SIGN via sa partie Fc – la saturation préalable des récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines G (FcγR) par Tégéline® n'ayant pas été réalisée ici.

Les cocultures ont ensuite été réalisées, toujours en *lectin buffer*, pendant 10 à 60 min. A la fin de l'incubation, les cellules ont été plongées dans la glace et marquées. La fluorescence basale pour DC-SIGN a été obtenue par marquage de monoblastes non cocultivés. L'anticorps murin AZN-D1, connu pour entraîner l'internalisation de DC-SIGN (142), a été utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont présentés par la **figure 21**.

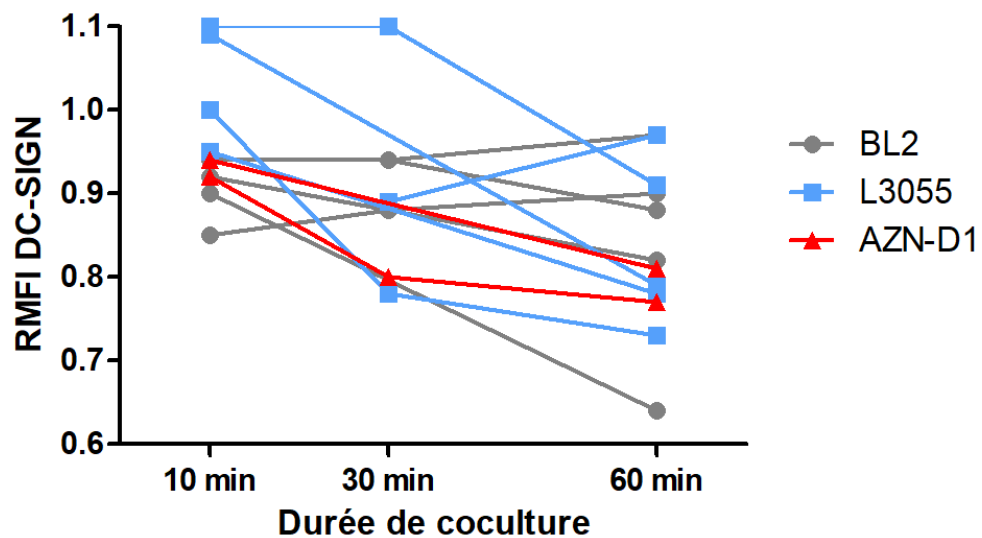


Figure 21. Evolution du RMFI DC-SIGN des monoblastes U937 DC-SIGN après cocultures. Les monoblastes U937 DC-SIGN ont été cocultivés avec des lymphocytes B des lignées cellulaires BL2 et L3055 ou ont été incubés avec l'anticorps AZN-D1. La fluorescence de DC-SIGN a été mesurée par cytométrie en flux. RMFI : ratio d'intensité moyenne de fluorescence

Les RMFI restent stables après coculture ou ajout d'AZN-D1, autour de 1. Aucun des stimuli testés n'est capable d'induire l'internalisation de DC-SIGN chez les cellules U937 DC-SIGN, pas même le contrôle positif AZN-D1. L'effet n'est pas meilleur avec L3055, lignée au BCR mannosylé, qu'avec BL2.

b) Les lymphocytes B de FL n'entraînent pas l'internalisation de DC-SIGN chez les macrophages M-IL4

L'internalisation de DC-SIGN après ligation étant une caractéristique majeure de cette lectine, nous avons voulu vérifier si l'absence d'effet de la lignée L3055 et de l'anticorps AZN-D1 n'était pas due à l'expression ectopique de DC-SIGN par les monoblastes transfectés. Un modèle de coculture plus proche des conditions *in vivo* a donc été mis en place : des lymphocytes B purifiés de FL ont été mis en contact de macrophages M-IL4, puisque ceux-ci se rapprochent des TAM de FL (cf paragraphe 3).

Des lymphocytes B de FL ont ainsi été purifiés à partir d'ampoules d'OLS de patients congelées en azote liquide. Leur capacité à lier DC-SIGN a été évaluée par incubation avec la protéine rhDC-SIGN, cette fois-ci directement couplée à un fluorochrome. Les isotypes ont également été déterminés. Les marquages ont été réalisés après saturation des récepteurs aux fragments constants des immunoglobulines par la Tégéline®. Les lignées BL2 et L3055 ont de nouveau été marquées pour servir de contrôles internes. Les résultats sont présentés dans la **figure 22**.

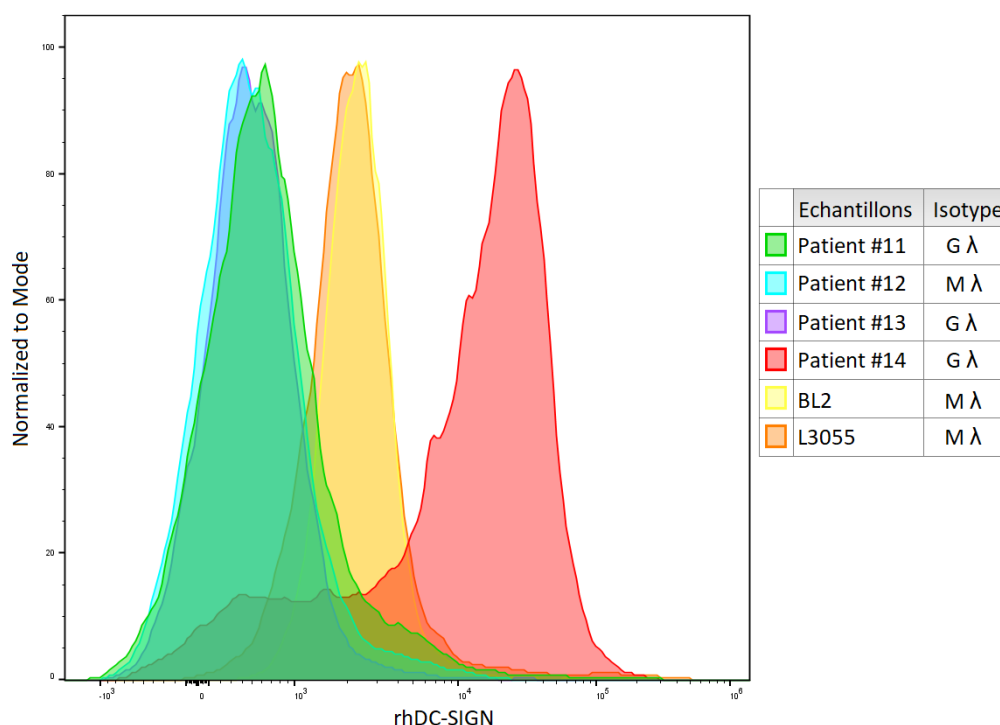


Figure 22. Liaison de rhDC-SIGN aux lymphocytes B de FL et aux lignées BL2 et L3055. Capacité de rhDC-SIGN à se lier aux lymphocytes B de FL, évaluée par cytométrie en flux. Les isotypes des clones B majoritaires sont indiqués dans le tableau. rhDC-SIGN : protéine DC-SIGN chimérique

On remarque que seul le patient #14 lie plus fortement la protéine rhDC-SIGN que les lignées BL2 et L3055. A noter qu'une partie des lymphocytes B (environ 20%) de ce patient présente une capacité de liaison moindre, équivalente à celle mesurée chez les patients #11, #12 et #13. Cette différence ne semble pas liée à l'isotype du patient #14 puisque les patients #11 et #13 sont aussi des FL à IgG λ .

L'essai d'internalisation a été répété avec les lymphocytes B des patients, en fonction de la disponibilité des ampoules d'OLS. Les lymphocytes B des patients #11, #13 et #14 ont ainsi été cocultivés avec des macrophages M-IL4 fraîchement différenciés à partir de monocytes. Les résultats sont détaillés dans la [figure 23](#).

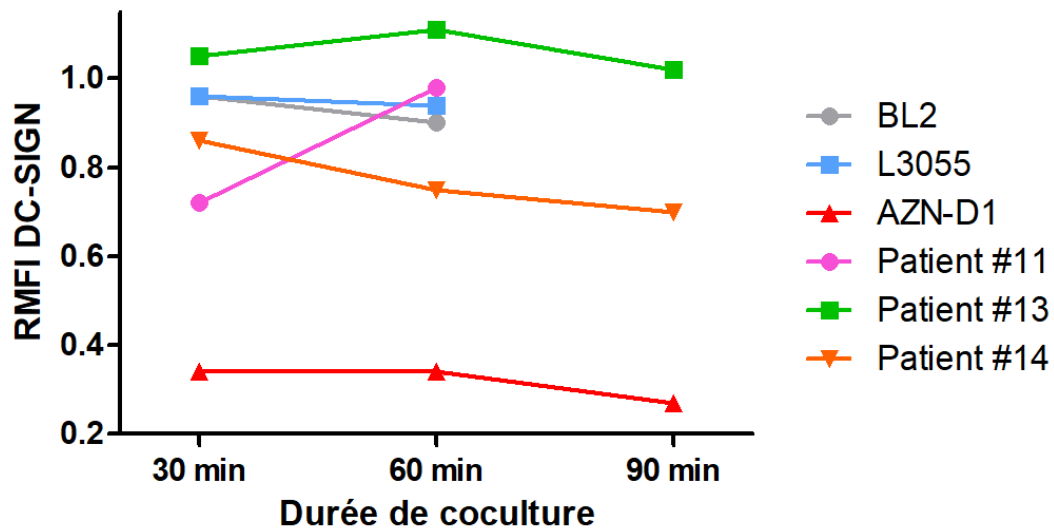


Figure 23. Evolution du RMFI DC-SIGN des macrophages M-IL4 après cocultures.

Les macrophages M-IL4 ont été cocultivés avec des lymphocytes B de patients atteints de FL, de lignées cellulaires BL2 et L3055 ou ont été incubés avec l'anticorps AZN-D1.

La fluorescence de DC-SIGN a été mesurée par cytométrie en flux.

RMFI : ratio d'intensité moyenne de fluorescence

Ce modèle semble plus fonctionnel que le précédent : l'anticorps AZN-D1 entraîne bien une nette diminution de l'expression DC-SIGN à la surface des macrophages M-IL4. Toutefois, là encore, aucun lymphocyte B n'est capable de provoquer l'internalisation de DC-SIGN : les RMFI restent stables, autour de la valeur 1. Même le patient #14, qui a pourtant la plus forte affinité pour DC-SIGN, n'occasionne pas de réponse.

Discussion

Lors de ce travail, nous nous sommes heurtés à un obstacle inattendu, la dégradation des épitopes extracellulaires de DC-SIGN par la dissociation mécano-enzymatique des OLS ([figure 13](#)). Nous avons dû adapter notre protocole de marquage CyTOF en intégrant l'anticorps anti-DC-SIGN au cocktail d'anticorps à cibles intracellulaires. Dans la mesure où nous avons montré dans de précédents travaux ([92](#)) que les expressions cytoplasmiques et membranaires de DC-SIGN semblent corrélées, il nous a paru licite d'utiliser ce moyen pour quantifier les cellules DC-SIGN^{pos}. Ce changement d'approche a été concomitant à une autre modification dans notre protocole de marquage, celui du tampon de perméabilisation. L'intégralité du panel a ainsi été retesté sur un mélange cellulaire comprenant l'ensemble des contrôles pour comparer le nouveau tampon à celui préalablement utilisé (PFA 2%). Les résultats obtenus étaient tout à fait comparables, avec même une augmentation du signal et une diminution du bruit de fond constatées pour certains marqueurs avec la nouvelle procédure. Cette première déconvenue a donc été l'occasion d'améliorer les performances globales de notre panel CyTOF.

Cet outil étant maintenant au point, la caractérisation de l'hétérogénéité des cellules DC-SIGN^{pos} au sein des OLS humains, *a priori* des cellules dendritiques et des TAM, a ainsi pu débuter. L'évaluation des performances d'un agent de conservation, le Cryostor®, décrit comme étant capable de préserver l'intégrité du tissu synovial ([161](#)), a été réalisée au sein de notre laboratoire. Il a depuis intégré notre processus de prise en charge au laboratoire des OLS de patients atteints de lymphomes, ce qui a facilité le marquage CyTOF de plusieurs échantillons, dont ceux des patients #4 à #10. Le marquage de 5 ganglions de FL (issus de 4 patients) et de 3 ganglions rLN semble montrer une plus grande proportion de cellules DC-SIGN^{pos} au sein des échantillons de FL, assez homogène, tandis que ce pourcentage apparaît beaucoup plus variable pour les échantillons réactionnels ([figure 15](#)).

Grâce à l'algorithme d'analyse multidimensionnelle viSNE, nous avons pu mettre en évidence plusieurs sous-types de cellules DC-SIGN^{pos} ([figure 16](#)). La distribution de ces îlots au sein des différents échantillons d'OLS est variable : par exemple, l'îlot 5 n'est retrouvé que dans un seul prélèvement réactionnel. A noter que parmi les îlots identifiés, seul l'îlot 1 exprime fortement CD68, ce qui souligne les limites des marquages d'immunohistochimie CD68/DC-SIGN ([92](#)). De par sa présence limitée exclusivement aux ganglions de FL, l'îlot 4 semble plus pertinent dans la biologie du FL. Toutefois, malgré la puissance apportée par le CyTOF, il reste difficile d'étiqueter précisément les cellules ainsi identifiées. En effet, en l'absence de données sur la localisation spatiale de ces cellules au sein des OLS, il est délicat de se prononcer sur leur nature exacte tant les macrophages et les cellules dendritiques partagent de marqueurs phénotypiques communs ([144,162,163](#)). La négativité de certains marqueurs comme CD1a ou CD163, censés discriminer ces différentes populations, n'aide pas à conclure. De plus, l'analyse viSNE, algorithme de réduction de dimensions sans étape de *clustering* ([143](#)), est en partie manuelle : la délimitation des îlots DC-SIGN^{pos} est subjective. Nous nous sommes concentrés ici sur les îlots contenant les cellules avec la plus forte expression de DC-SIGN. Des analyses plus poussées par des méthodes incluant une étape de *clustering*, comme les algorithmes SPADE ou X-shift, permettraient de vérifier la pertinence des îlots identifiés et leurs phénotypes ([164,165](#)).

L'évaluation de nos modèles myéloïdes, substituts de TAM de FL pour nos premières études de l'interaction BCR/DC-SIGN, a conclu à la pertinence des macrophages M-IL4 et M-FL. Ces cellules sont proches en ce qui concerne nos marqueurs d'intérêt puisqu'elles clustérisent ensemble aussi bien au niveau transcriptomique (figure 17) que phénotypique (figure 18). Notre combinaison inédite M-FL, conçue pour reproduire les signaux délivrés par les lymphocytes T_{FH} au sein de la niche du FL, nous semble même très prometteuse. En effet les macrophages obtenus grâce à cette condition expriment des gènes traditionnellement associés à la biologie des TAM, comme les facteurs de transcription IRF4 et AhR ou les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire PD-L1 et PD-L2. La caractérisation des TAM de FL (CyTOF, qPCR Biomark®) sur un plus grand nombre d'échantillons que l'étude préliminaire réalisée jusqu'alors (149) permettra toutefois d'apprécier leur véritable pertinence en tant que modèles. De plus, des analyses plus approfondies, en considérant les sous-populations présentes au sein d'une même condition de polarisation, devront être conduites pour mieux caractériser nos modèles.

Nos analyses transcriptomiques et phénotypiques ont limité l'intérêt de la lignée U937 DC-SIGN, lignée monoblastique transfectée exprimant DC-SIGN, à l'étude exploratoire de l'interaction BCR/DC-SIGN. En effet, ces cellules ne présentent pas de phénotype de TAM et sont assez éloignées des macrophages M-IL4 et M-FL (figure 19). Elles ne constituent donc pas un modèle idéal pour étudier les conséquences fonctionnelles du signal délivré par DC-SIGN aux cellules myéloïdes dans notre contexte. Toutefois, leur facilité de manipulation par rapport à des macrophages polarisés ou des cellules primaires de FL et leur proximité avec leur lignée originelle, U937, qui pourrait être utilisée comme contrôle, nous ont tout de même incités à les utiliser lors des premières expérimentations.

Les espoirs suscités par ces deux lignées monoblastiques ont cependant été refroidis par les essais d'internalisation de DC-SIGN. En effet, comme de nombreuses études ont pointé la propension de DC-SIGN à s'internaliser après avoir reconnu son ligand (142,166–169), l'internalisation de DC-SIGN nous est apparue comme une fonction simple à étudier.

Des premières expérimentations de cocultures ont été réalisées avec deux lignées B de lymphome de Burkitt, l'une exprimant un BCR mannosylé (L3055), l'autre non (BL2). Malheureusement, si les deux lignées sont bien capables de se lier à DC-SIGN (figure 20), aucune d'entre elles n'est capable d'induire son internalisation (figure 21). L'absence d'effet de l'anticorps anti-DC-SIGN AZN-D1, décrit comme agent inducteur d'internalisation (142), sur la lignée U937 DC-SIGN nous a poussé à remettre en cause la pertinence de cette lignée comme modèle de cellules myéloïdes DC-SIGN^{pos}. Comme les molécules DC-SIGN s'associent en tétramères regroupés en nanodomains à la surface cellulaire, organisation indispensable pour compenser la faible affinité de DC-SIGN pour ses ligands (96), on peut se demander si l'expression ectopique dans une lignée immortelle induit bien une telle disposition. Nous avons ainsi préféré nous tourner vers un modèle plus convaincant de TAM de FL en répétant les expérimentations avec des macrophages M-IL4. A noter que ces cellules, obtenues après polarisation de monocytes, se rapprochent davantage des cellules dendritiques dérivées de monocytes traditionnellement utilisées lors des essais d'internalisation (142,166–169) et sont *a priori* plus susceptibles d'internaliser leurs molécules DC-SIGN.

De nouvelles cocultures ont ainsi été réalisées, cette fois-ci entre des macrophages M-IL4 et des lymphocytes B de FL. L'étude de la liaison des lymphocytes tumoraux à DC-SIGN a montré que seuls ceux du patient #14 présentaient une affinité supérieure à celles des lignées cellulaires BL2 et L3055 (figure 22). Ce résultat était assez inattendu au vu de l'isotype (IgG) de ces lymphocytes. En effet, les travaux précédents de l'équipe (92) avaient suggéré que seuls les lymphocytes B tumoraux d'isotype IgM pouvaient lier fortement DC-SIGN et ainsi bénéficier du signal de survie transmis par cette interaction. Cet avantage par rapport à l'isotype IgG donnerait un sens à la pression de sélection subie par les lymphocytes B de FL pour éviter la commutation de classe isotypique et expliquerait ainsi le paradoxe allélique (93,94). La mise en évidence de lymphocytes B de FL d'isotype IgG à forte affinité pour DC-SIGN remet donc en cause ce paradigme.

Malgré le fait que les macrophages M-IL4 sont bien capables d'internaliser DC-SIGN après incubation avec l'AZN-D1, nous avons constaté leur absence de réponse suite aux cocultures avec les lymphocytes B de FL (figure 23), quelle que soit leur affinité pour DC-SIGN. Il semble donc que la mesure de l'internalisation de DC-SIGN ne soit pas un bon reflet de l'effet de l'interaction BCR/DC-SIGN sur les cellules myéloïdes. D'autres essais sont donc à prévoir pour étudier le versant fonctionnel de ce dialogue intercellulaire.

En effet, si la partie intracytoplasmique du récepteur DC-SIGN possède des motifs permettant l'internalisation vers la voie endo-lysosomale, elle contient aussi des motifs déclenchant des voies de signalisation et médiant des effets variés (96). DC-SIGN présente même la capacité unique d'induire des cascades de signalisation différentes selon le ligand reconnu (170). Classiquement, un signal pro-inflammatoire est délivré suite à l'interaction avec un mannose, sucre très rarement retrouvé en position terminale chez les glycanes de mammifères et donc synonyme de danger microbien (89). Au contraire, la reconnaissance d'un fucose déclenche un signal anti-inflammatoire et tolérogène, à rôle homéostatique et parfois détourné par les agents pathogènes (96,170). Il sera intéressant de démontrer, par des approches de cytométrie en flux et de western blot, quelle voie de signalisation est utilisée dans le FL. Au vu du phénotype traditionnellement immunosuppresseur et tolérogène des TAM (171), il semble peu probable que la reconnaissance des oligomannoses portés par la partie Fab des BCR de FL active le signalosome classique du mannose et déclenche un signal pro-inflammatoire. L'utilisation du système de qPCR haut débit Biomark® pourrait aussi être un bon moyen pour mesurer l'effet des cocultures sur l'expression de nombreux gènes chez les macrophages M-IL4 ou M-FL et révéler une signature DC-SIGN. Enfin, les TAM étant des producteurs de facteurs de croissance tumorale (171), il sera important d'évaluer de quelle façon la signalisation DC-SIGN induite par le contact avec les lymphocytes B tumoraux module l'expression de ces molécules protumorales.

Les difficultés rencontrées au cours de ce travail nous rappellent à quel point il est délicat de caractériser le microenvironnement du FL. L'absence de lignée de FL indolent et le faible accès aux prélèvements d'OLS par diminution des exérèses ganglionnaires au profit des biopsies à l'aiguille restent des obstacles techniques importants (101). De plus, les différences inter-espèces entre l'Homme et la souris – la souris possède 8 gènes homologues à *CD209* (famille SIGNR), mais aucun n'est un véritable orthologue (172) – empêche le développement d'un modèle murin pertinent.

Enfin, il est à noter que l'impact de la glycosylation sur la fonction des immunoglobulines est un domaine qui dépasse largement celui du FL. Les N-glycanes sont largement présents sur les fragments constants des chaînes lourdes des IgG (domaine CH2) et ont un impact sur leur affinité pour les récepteurs FcγR (89). La modification des motifs de N-glycosylation, ou glyco-ingénierie, est un moyen utilisé par l'industrie pharmaceutique pour améliorer les propriétés thérapeutiques des anticorps monoclonaux (173,174). Ces N-glycanes de la partie Fc ont même été suspectés d'interagir avec DC-SIGN et d'être ainsi responsables de l'effet immunomodulateur des immunoglobulines intraveineuses, avant que cette hypothèse ne soit finalement infirmée (175).

L'intérêt pour les glycanes portés par la partie Fab des anticorps est plus récent mais en plein développement (176). Le BCR unique du FL représente une opportunité d'en apprendre plus sur ces glycanes : au lieu d'être caractérisé par l'autoréactivité ou l'activation constitutionnelle (43), le BCR du FL voit apparaître des motifs de N-glycosylation dans sa partie variable, motifs qui seront sélectionnés et persisteront malgré l'hypermutation somatique (86). Les mécanismes conduisant à l'occupation de ces sites de N-glycosylation par des oligomannoses (87), sucres immatures normalement remodelés par les mannosidases du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (89), restent à élucider.

Conclusion

Dans le contexte du FL, l'axe BCR/DC-SIGN est connu pour délivrer un signal protumoral aux cellules cancéreuses. Selon notre hypothèse, il pourrait aussi polariser les cellules myéloïdes vers un phénotype protumoral et immunosuppresseur. Ses effets potentiellement bidirectionnels en font une cible intéressante dans le cadre du traitement du FL.

Ce travail a permis la mise au point d'un panel de cytométrie de masse capable de caractériser les cellules exprimant DC-SIGN au sein des OLS humains. Des premiers échantillons ont ainsi pu être analysés et ont permis d'appréhender l'hétérogénéité phénotypique du compartiment DC-SIGN^{pos}. L'analyse d'autres échantillons de FL et leur comparaison à des échantillons réactionnels ou issus d'autres lymphomes du centre germinatif permettra de préciser la signature phénotypique des TAM de FL.

Les modèles de macrophages dérivés de monocytes *in vitro* M-IL4 et M-FL ont montré leur intérêt pour la mise au point d'expérimentations démontrant l'impact de l'interaction BCR/DC-SIGN sur les cellules myéloïdes (activation des cascades de signalisation, acquisition d'un phénotype protumoral et immunosuppresseur) avant la validation finale sur TAM de FL. En effet l'étude propédeutique du phénotype des TAM de FL grâce au CyTOF permettra dans un second temps de les isoler par tri cellulaire à partir de ganglions et ainsi de reproduire ces études fonctionnelles sur des cellules primaires.

Bibliographie

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2375-90.
2. Gars E, Butzmann A, Ohgami R, Balakrishna JP, O'Malley DP. The life and death of the germinal center. *Annals of Diagnostic Pathology*. févr 2020;44:151421.
3. Freedman A, Jacobsen E. Follicular lymphoma: 2020 update on diagnosis and management. *Am J Hematol*. mars 2020;95(3):316-27.
4. Monnereau A, Remontet L, Maynadié M, Binder-Foucard F, Belot A, Troussard X, et al. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012 - Partie 2 - Hémopathies malignes. 2013. (Les Données / Epidémiologie).
5. World Health Organization Classification of Tumours. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., éditeurs. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. 585 p. (World Health Organization classification of tumours).
6. Sujobert P, Salles G. Actualités dans le lymphome folliculaire. *La Presse Médicale*. juill 2019;48(7-8):850-8.
7. Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Highly increased familial risks for specific lymphoma subtypes. *British Journal of Haematology*. juill 2009;146(1):91-4.
8. Skibola CF, Bracci PM, Halperin E, Conde L, Craig DW, Agana L, et al. Genetic variants at 6p21.33 are associated with susceptibility to follicular lymphoma. *Nat Genet*. août 2009;41(8):873-5.
9. Skibola CF, Berndt SI, Vijai J, Conde L, Wang Z, Yeager M, et al. Genome-wide Association Study Identifies Five Susceptibility Loci for Follicular Lymphoma outside the HLA Region. *The American Journal of Human Genetics*. oct 2014;95(4):462-71.
10. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: Distributions of the major subtypes differ by geographic locations. *Annals of Oncology*. juill 1998;9(7):717-20.
11. Clarke CA, Glaser SL, Gomez SL, Wang SS, Keegan TH, Yang J, et al. Lymphoid Malignancies in U.S. Asians: Incidence Rate Differences by Birthplace and Acculturation. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 1 juin 2011;20(6):1064-77.
12. Talamini R, Polesel J, Montella M, Maso LD, Crispo A, Spina M, et al. Smoking and non-Hodgkin lymphoma: Case-control study in Italy. *Int J Cancer*. juill 2005;115(4):606-10.
13. Zhang Y, Sanjose SD, Bracci PM, Morton LM, Wang R, Brennan P, et al. Personal Use of Hair Dye and the Risk of Certain Subtypes of Non-Hodgkin Lymphoma. *American Journal of Epidemiology*. 25 mars 2008;167(11):1321-31.

14. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Briand M, Pottier D, Gauduchon P. Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH Translocation in Farmers Occupationally Exposed to Pesticides. *Cancer Res.* 15 mars 2004;64(6):2264-9.
15. Leon ME, Schinasi LH, Lebailly P, Beane Freeman LE, Nordby K-C, Ferro G, et al. Pesticide use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway and the USA: a pooled analysis from the AGRICOH consortium. *International Journal of Epidemiology.* 1 oct 2019;48(5):1519-35.
16. Linet MS, Vajdic CM, Morton LM, de Roos AJ, Skibola CF, Boffetta P, et al. Medical History, Lifestyle, Family History, and Occupational Risk Factors for Follicular Lymphoma: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *JNCI Monographs.* 1 août 2014;2014(48):26-40.
17. Carbone A, Roulland S, Gloghini A, Younes A, von Keudell G, López-Guillermo A, et al. Follicular lymphoma. *Nat Rev Dis Primers.* déc 2019;5(1):83.
18. Dada R. Diagnosis and management of follicular lymphoma: A comprehensive review. *Eur J Haematol.* sept 2019;103(3):152-63.
19. Choi SM, Betz BL, Perry AM. Follicular Lymphoma Diagnostic Caveats and Updates. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* nov 2018;142(11):1330-40.
20. Wahlin BE, Yri OE, Kimby E, Holte H, Delabie J, Smeland EB, et al. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times: Clinical Significance of Grading Follicular Lymphoma. *British Journal of Haematology.* janv 2012;156(2):225-33.
21. Sarkozy C, Baseggio L, Feugier P, Callet-Bauchu E, Karlin L, Seymour JF, et al. Peripheral blood involvement in patients with follicular lymphoma: a rare disease manifestation associated with poor prognosis. *Br J Haematol.* mars 2014;164(5):659-67.
22. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *JCO.* 20 sept 2014;32(27):3059-67.
23. Solal-Celigny P. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Blood.* 1 sept 2004;104(5):1258-65.
24. Federico M, Bellei M, Marcheselli L, Luminari S, Lopez-Guillermo A, Vitolo U, et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index 2: A New Prognostic Index for Follicular Lymphoma Developed by the International Follicular Lymphoma Prognostic Factor Project. *JCO.* 20 sept 2009;27(27):4555-62.
25. Bachy E, Maurer MJ, Habermann TM, Gelas-Dore B, Maucourt-Boulch D, Estell JA, et al. A simplified scoring system in de novo follicular lymphoma treated initially with immunochemotherapy. *Blood.* 5 juill 2018;132(1):49-58.
26. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, Hoster E, Staiger AM, Szczepanowski M, et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *The Lancet Oncology.* sept 2015;16(9):1111-22.

27. Montoto S, Davies AJ, Matthews J, Calaminici M, Norton AJ, Amess J, et al. Risk and Clinical Implications of Transformation of Follicular Lymphoma to Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *JCO*. 10 juin 2007;25(17):2426-33.
28. Sarkozy C, Trneny M, Xerri L, Wickham N, Feugier P, Leppa S, et al. Risk Factors and Outcomes for Patients With Follicular Lymphoma Who Had Histologic Transformation After Response to First-Line Immunochemotherapy in the PRIMA Trial. *JCO*. 1 août 2016;34(22):2575-82.
29. Link BK, Maurer MJ, Nowakowski GS, Ansell SM, Macon WR, Syrbu SI, et al. Rates and Outcomes of Follicular Lymphoma Transformation in the Immunochemotherapy Era: A Report From the University of Iowa/Mayo Clinic Specialized Program of Research Excellence Molecular Epidemiology Resource. *JCO*. 10 sept 2013;31(26):3272-8.
30. Advani R, Rosenberg SA, Horning SJ. Stage I and II Follicular Non-Hodgkin's Lymphoma: Long-Term Follow-Up of No Initial Therapy. *JCO*. 15 avr 2004;22(8):1454-9.
31. Marcus R. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood*. 15 févr 2005;105(4):1417-23.
32. Hiddemann W. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 1 déc 2005;106(12):3725-32.
33. Ratner M. Genentech's glyco-engineered antibody to succeed Rituxan. *Nat Biotechnol*. janv 2014;32(1):6-7.
34. Marcus R, Davies A, Ando K, Klapper W, Opat S, Owen C, et al. Obinutuzumab for the First-Line Treatment of Follicular Lymphoma. *N Engl J Med*. 5 oct 2017;377(14):1331-44.
35. Salles G, Seymour JF, Offner F, López-Guillermo A, Belada D, Xerri L, et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *The Lancet*. janv 2011;377(9759):42-51.
36. Morschhauser F, Fowler NH, Feugier P, Bouabdallah R, Tilly H, Palomba ML, et al. Rituximab plus Lenalidomide in Advanced Untreated Follicular Lymphoma. *N Engl J Med*. 6 sept 2018;379(10):934-47.
37. Zucca E, Rondeau S, Vanazzi A, Østenstad B, Mey UJM, Rauch D, et al. Short regimen of rituximab plus lenalidomide in follicular lymphoma patients in need of first-line therapy. *Blood*. 25 juill 2019;134(4):353-62.
38. Martinelli G, Hsu Schmitz S-F, Utiger U, Cerny T, Hess U, Bassi S, et al. Long-Term Follow-Up of Patients With Follicular Lymphoma Receiving Single-Agent Rituximab at Two Different Schedules in Trial SAKK 35/98. *JCO*. 10 oct 2010;28(29):4480-4.
39. Leonard JP, Jung S-H, Johnson J, Pitcher BN, Bartlett NL, Blum KA, et al. Randomized Trial of Lenalidomide Alone Versus Lenalidomide Plus Rituximab in Patients With Recurrent Follicular Lymphoma: CALGB 50401 (Alliance). *JCO*. 1 nov 2015;33(31):3635-40.

40. Radford J, Davies A, Cartron G, Morschhauser F, Salles G, Marcus R, et al. Obinutuzumab (GA101) plus CHOP or FC in relapsed/refractory follicular lymphoma: results of the GAUDI study (BO21000). *Blood*. 15 août 2013;122(7):1137-43.
41. Sureda A, Zhang M-J, Dreger P, Carreras J, Fenske T, Finel H, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for relapsed follicular lymphoma: A combined analysis on behalf of the Lymphoma Working Party of the EBMT and the Lymphoma Committee of the CIBMTR: Allogeneic Transplant in Follicular Lymphoma. *Cancer*. 15 avr 2018;124(8):1733-42.
42. Russo AL, Chen Y-H, Martin NE, Vinjamoori A, Luthy SK, Freedman A, et al. Low-Dose Involved-Field Radiation in the Treatment of Non-Hodgkin Lymphoma: Predictors of Response and Treatment Failure. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. mai 2013;86(1):121-7.
43. Niemann CU, Wiestner A. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Seminars in Cancer Biology*. déc 2013;23(6):410-21.
44. Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nature Reviews Immunology*. mars 2015;15(3):172-84.
45. Gopal AK, Schuster SJ, Fowler NH, Trotman J, Hess G, Hou J-Z, et al. Ibrutinib as Treatment for Patients With Relapsed/Refractory Follicular Lymphoma: Results From the Open-Label, Multicenter, Phase II DAWN Study. *JCO*. 10 août 2018;36(23):2405-12.
46. Gopal AK, Kahl BS, de Vos S, Wagner-Johnston ND, Schuster SJ, Jurczak WJ, et al. PI3K δ Inhibition by Idelalisib in Patients with Relapsed Indolent Lymphoma. *N Engl J Med*. 13 mars 2014;370(11):1008-18.
47. Dreyling M, Santoro A, Mollica L, Leppä S, Follows GA, Lenz G, et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition by Copanlisib in Relapsed or Refractory Indolent Lymphoma. *JCO*. 10 déc 2017;35(35):3898-905.
48. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak Ö, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*. 28 déc 2017;377(26):2545-54.
49. Hirayama AV, Gauthier J, Hay KA, Voutsinas JM, Wu Q, Pender BS, et al. High rate of durable complete remission in follicular lymphoma after CD19 CAR-T cell immunotherapy. *Blood*. 15 août 2019;134(7):636-40.
50. Sarkozy C, Maurer MJ, Link BK, Ghesquieres H, Nicolas E, Thompson CA, et al. Cause of Death in Follicular Lymphoma in the First Decade of the Rituximab Era: A Pooled Analysis of French and US Cohorts. *JCO*. 10 janv 2019;37(2):144-52.
51. Küppers R, Stevenson FK. Critical influences on the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood*. 24 mai 2018;131(21):2297-306.
52. Huet S, Sujobert P, Salles G. From genetics to the clinic: a translational perspective on follicular lymphoma. *Nat Rev Cancer*. avr 2018;18(4):224-39.
53. Fukuhara S, Rowley JD, Variakojis D, Golomb HM. Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. *Cancer Res*. août 1979;39(8):3119-28.

54. Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME, Ensrud KM, Howe RR, Theologides A. Distinctive Chromosomal Abnormalities in Histologic Subtypes of Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 11 nov 1982;307(20):1231-6.
55. Tsujimoto Y, Finger L, Yunis J, Nowell P, Croce C. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science.* 30 nov 1984;226(4678):1097-9.
56. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce C. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science.* 27 sept 1985;229(4720):1390-3.
57. Cui X, Lu Z, Kurosawa A, Klemm L, Bagshaw AT, Tsai AG, et al. Both CpG Methylation and Activation-Induced Deaminase Are Required for the Fragility of the Human bcl-2 Major Breakpoint Region: Implications for the Timing of the Breaks in the t(14;18) Translocation. *Molecular and Cellular Biology.* 1 mars 2013;33(5):947-57.
58. Lieber MR. Mechanisms of human lymphoid chromosomal translocations. *Nat Rev Cancer.* juin 2016;16(6):387-98.
59. Reed JC, Cuddy M, Slabiak T, Croce CM, Nowell PC. Oncogenic potential of bcl-2 demonstrated by gene transfer. *Nature.* nov 1988;336(6196):259-61.
60. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* sept 1988;335(6189):440-2.
61. Küppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene.* sept 2001;20(40):5580-94.
62. Smith KGC, Light A, O'Reilly LA, Ang S-M, Strasser A, Tarlinton D. bcl-2 Transgene Expression Inhibits Apoptosis in the Germinal Center and Reveals Differences in the Selection of Memory B Cells and Bone Marrow Antibody-Forming Cells. *Journal of Experimental Medicine.* 7 févr 2000;191(3):475-84.
63. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, et al. bcl-2-Immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell.* avr 1989;57(1):79-88.
64. Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, et al. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood.* 1 mai 1995;85(9):2528-36.
65. Schüler F, Dölken L, Hirt C, Kiefer T, Berg T, Fusch G, et al. Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. *Int J Cancer.* 15 févr 2009;124(4):958-63.
66. Agopian J, Navarro J-M, Gac A-C, Lecluse Y, Briand M, Grenot P, et al. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *The Journal of Experimental Medicine.* 6 juill 2009;206(7):1473-83.
67. Roulland S, Navarro J-M, Grenot P, Milili M, Agopian J, Montpellier B, et al. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *Journal of Experimental Medicine.* 30 oct 2006;203(11):2425-31.

68. Roulland S, Faroudi M, Mamessier E, Sungalee S, Salles G, Nadel B. Early Steps of Follicular Lymphoma Pathogenesis. In: *Advances in Immunology* [Internet]. Elsevier; 2011 [cité 1 juill 2020]. p. 1-46. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123859914000015>
69. Hirt C, Camargo MC, Yu KJ, Hewitt SM, Dölken G, Rabkin CS. Risk of follicular lymphoma associated with BCL2 translocations in peripheral blood. *Leukemia & Lymphoma*. 2 sept 2015;56(9):2625-9.
70. Roulland S, Kelly RS, Morgado E, Sungalee S, Solal-Celigny P, Colombat P, et al. t(14;18) Translocation: A Predictive Blood Biomarker for Follicular Lymphoma. *JCO*. 1 mai 2014;32(13):1347-55.
71. Louissaint A, Schafernak KT, Geyer JT, Kovach AE, Ghandi M, Gratzinger D, et al. Pediatric-type nodal follicular lymphoma: a biologically distinct lymphoma with frequent MAPK pathway mutations. *Blood*. 25 août 2016;128(8):1093-100.
72. Sungalee S, Mamessier E, Morgado E, Grégoire E, Brohawn PZ, Morehouse CA, et al. Germinal center reentries of BCL2-overexpressing B cells drive follicular lymphoma progression. *J Clin Invest*. 1 déc 2014;124(12):5337-51.
73. Okosun J, Bödör C, Wang J, Araf S, Yang C-Y, Pan C, et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat Genet*. févr 2014;46(2):176-81.
74. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol*. mars 2015;15(3):137-48.
75. Dominguez PM, Teater M, Chambwe N, Kormaksson M, Redmond D, Ishii J, et al. DNA Methylation Dynamics of Germinal Center B Cells Are Mediated by AID. *Cell Reports*. sept 2015;12(12):2086-98.
76. Green MR, Gentles AJ, Nair RV, Irish JM, Kihira S, Liu CL, et al. Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood*. 28 févr 2013;121(9):1604-11.
77. Korfi K, Ali S, Heward JA, Fitzgibbon J. Follicular lymphoma, a B cell malignancy addicted to epigenetic mutations. *Epigenetics*. 4 mai 2017;12(5):370-7.
78. Milpied P, Nadel B, Roulland S. Premalignant cell dynamics in indolent B-cell malignancies: Current Opinion in Hematology. *juill 2015;22(4):388-96*.
79. Milpied P, Cervera-Marzal I, Mollichella M-L, Tesson B, Brisou G, Traverse-Glehen A, et al. Human germinal center transcriptional programs are de-synchronized in B cell lymphoma. *Nat Immunol*. sept 2018;19(9):1013-24.
80. Lackraj T, Goswami R, Kridel R. Pathogenesis of follicular lymphoma. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. mars 2018;31(1):2-14.
81. Lam K-P, Kühn R, Rajewsky K. In Vivo Ablation of Surface Immunoglobulin on Mature B Cells by Inducible Gene Targeting Results in Rapid Cell Death. *Cell*. sept 1997;90(6):1073-83.

82. Sachen KL, Strohman MJ, Singletary J, Alizadeh AA, Kattah NH, Lossos C, et al. Self-antigen recognition by follicular lymphoma B-cell receptors. *Blood*. 15 nov 2012;120(20):4182-90.
83. Cha S-C, Qin H, Kannan S, Rawal S, Watkins LS, Baio FE, et al. Nonstereotyped Lymphoma B Cell Receptors Recognize Vimentin as a Shared Autoantigen. *Jl*. 1 mai 2013;190(9):4887-98.
84. Zhu D, McCarthy H, Ottensmeier CH, Johnson P, Hamblin TJ, Stevenson FK. Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood*. 1 avr 2002;99(7):2562-8.
85. Lefranc M-P, Giudicelli V, Duroux P, Jabado-Michaloud J, Folch G, Aouinti S, et al. IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. *Nucleic Acids Research*. 28 janv 2015;43(D1):D413-22.
86. Odabashian M, Carlotti E, Araf S, Okosun J, Spada F, Gribben JG, et al. IGHV sequencing reveals acquired N-glycosylation sites as a clonal and stable event during follicular lymphoma evolution. *Blood*. 12 mars 2020;135(11):834-44.
87. Radcliffe CM, Arnold JN, Suter DM, Wormald MR, Harvey DJ, Royle L, et al. Human Follicular Lymphoma Cells Contain Oligomannose Glycans in the Antigen-binding Site of the B-cell Receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 9 mars 2007;282(10):7405-15.
88. Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. nov 2013;1833(11):2430-7.
89. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. juin 2019;15(6):346-66.
90. Coelho V, Krysov S, Ghaemmaghami AM, Emara M, Potter KN, Johnson P, et al. Glycosylation of surface Ig creates a functional bridge between human follicular lymphoma and microenvironmental lectins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 26 oct 2010;107(43):18587-92.
91. Linley A, Krysov S, Ponzoni M, Johnson PW, Packham G, Stevenson FK. Lectin binding to surface Ig variable regions provides a universal persistent activating signal for follicular lymphoma cells. *Blood*. 15 oct 2015;126(16):1902-10.
92. Amin R, Mourcin F, Uhel F, Pangault C, Ruminy P, Dupré L, et al. DC-SIGN-expressing macrophages trigger activation of mannosylated IgM B-cell receptor in follicular lymphoma. *Blood*. 15 oct 2015;126(16):1911-20.
93. Vaandrager JW, Schuurin E, Kluin-Nelemans HC, Dyer MJ, Raap AK, Kluin PM. DNA fiber fluorescence in situ hybridization analysis of immunoglobulin class switching in B-cell neoplasia: aberrant CH gene rearrangements in follicle center-cell lymphoma. *Blood*. 15 oct 1998;92(8):2871-8.
94. Ruminy P, Jardin F, Penther D, Picquenot J-M, Parmentier F, Buchonnet G, et al. Recurrent disruption of the Imu splice donor site in t(14;18) positive lymphomas: a potential molecular basis for aberrant downstream class switch recombination. *Genes Chromosomes Cancer*. août 2007;46(8):735-44.
95. Juszczynski P, Chen L, O'Donnell E, Polo JM, Ranuncolo SM, Dalla-Favera R, et al. BCL6 modulates tonic BCR signaling in diffuse large B-cell lymphomas by repressing the SYK phosphatase, PTPROT. *Blood*. 17 déc 2009;114(26):5315-21.

96. Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. DC-SIGN. C-Type Lectin with Prominent Role in Immune System. In: Taniguchi N, Endo T, Hart GW, Seeberger PH, Wong C-H, éditeurs. Glycoscience: Biology and Medicine [Internet]. Tokyo: Springer Japan; 2015 [cité 19 mai 2019]. p. 649-59. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-54841-6_133
97. Domínguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Pérez-Maceda B, Gómez-Aguado F, Corcuera MT, et al. Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin expression on M2-polarized and tumor-associated macrophages is macrophage-CSF dependent and enhanced by tumor-derived IL-6 and IL-10. *J Immunol*. 15 févr 2011;186(4):2192-200.
98. Calvo KR, Dabir B, Kovach A, Devor C, Bandle R, Bond A, et al. IL-4 protein expression and basal activation of Erk in vivo in follicular lymphoma. *Blood*. 1 nov 2008;112(9):3818-26.
99. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. mars 2011;144(5):646-74.
100. Verdière L, Mourcin F, Tarte K. Microenvironment signaling driving lymphomagenesis. *Curr Opin Hematol*. juill 2018;25(4):335-45.
101. Lamaison C, Tarte K. Impact of B cell/lymphoid stromal cell crosstalk in B-cell physiology and malignancy. *Immunology Letters*. nov 2019;215:12-8.
102. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, et al. Prediction of Survival in Follicular Lymphoma Based on Molecular Features of Tumor-Infiltrating Immune Cells. *N Engl J Med*. 18 nov 2004;351(21):2159-69.
103. Álvaro T, Lejeune M, Salvadó M-T, Lopez C, Jaén J, Bosch R, et al. Immunohistochemical Patterns of Reactive Microenvironment Are Associated With Clinicobiologic Behavior in Follicular Lymphoma Patients. *JCO*. 1 déc 2006;24(34):5350-7.
104. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 1 févr 2002;99(3):754-8.
105. Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg M-L, Nyman H, Eerola L-M, Leppä S. A High Tumor-Associated Macrophage Content Predicts Favorable Outcome in Follicular Lymphoma Patients Treated with Rituximab and Cyclophosphamide-Doxorubicin-Vincristine-Prednisone. *Clinical Cancer Research*. 1 oct 2007;13(19):5784-9.
106. Manches O, Lui G, Chaperot L, Gressin R, Molens J-P, Jacob M-C, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 1 févr 2003;101(3):949-54.
107. Amé-Thomas P, Tarte K. The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin Cancer Biol*. févr 2014;24:23-32.
108. Kline J, Godfrey J, Ansell SM. The immune landscape and response to immune checkpoint blockade therapy in lymphoma. *Blood*. 20 févr 2020;135(8):523-33.
109. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer*. août 2014;14(8):517-34.

110. Rajnai H, Bödör C, Balogh Z, Gagyí É, Csomor J, Krenács T, et al. Impact of the reactive microenvironment on the bone marrow involvement of follicular lymphoma: Role of microenvironment in BM involvement of FL. *Histopathology*. mai 2012;60(6B):E66-75.
111. Pandey S, Mourcin F, Marchand T, Nayar S, Guirriec M, Pangault C, et al. IL-4/CXCL12 loop is a key regulator of lymphoid stroma function in follicular lymphoma. *Blood*. 4 mai 2017;129(18):2507-18.
112. Astarita JL, Cremasco V, Fu J, Darnell MC, Peck JR, Nieves-Bonilla JM, et al. The CLEC-2–podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat Immunol*. janv 2015;16(1):75-84.
113. Mourcin F, Pangault C, Amin-Ali R, Amé-Thomas P, Tarte K. Stromal Cell Contribution to Human Follicular Lymphoma Pathogenesis. *Front Immun* [Internet]. 2012 [cité 29 juin 2020];3. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00280/abstract>
114. Epron G, Ame-Thomas P, Le Priol J, Pangault C, Dulong J, Lamy T, et al. Monocytes and T cells cooperate to favor normal and follicular lymphoma B-cell growth: role of IL-15 and CD40L signaling. *Leukemia*. janv 2012;26(1):139-48.
115. Travert M, Ame-Thomas P, Pangault C, Morizot A, Micheau O, Semana G, et al. CD40 Ligand Protects from TRAIL-Induced Apoptosis in Follicular Lymphomas through NF- κ B Activation and Up-Regulation of c-FLIP and Bcl-x_L. *J Immunol*. 15 juill 2008;181(2):1001-11.
116. Pangault C, Amé-Thomas P, Ruminy P, Rossille D, Caron G, Baia M, et al. Follicular lymphoma cell niche: identification of a preeminent IL-4-dependent TFH–B cell axis. *Leukemia*. déc 2010;24(12):2080-9.
117. Gallouet A-S, Travert M, Bresson-Bepoldin L, Guilloton F, Pangault C, Caulet-Maugendre S, et al. COX-2-Independent Effects of Celecoxib Sensitize Lymphoma B Cells to TRAIL-Mediated Apoptosis. *Clinical Cancer Research*. 15 mai 2014;20(10):2663-73.
118. Maby-El Hajjami H, Ame-Thomas P, Pangault C, Tribut O, DeVos J, Jean R, et al. Functional Alteration of the Lymphoma Stromal Cell Niche by the Cytokine Context: Role of Indoleamine-2,3 Dioxygenase. *Cancer Research*. 24 mars 2009;69(7):3228-37.
119. Lukacs-Kornek V, Malhotra D, Fletcher AL, Acton SE, Elpek KG, Tayalia P, et al. Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nat Immunol*. nov 2011;12(11):1096-104.
120. Singh RR, Kim JE, Davuluri Y, Drakos E, Cho-Vega JH, Amin HM, et al. Hedgehog signaling pathway is activated in diffuse large B-cell lymphoma and contributes to tumor cell survival and proliferation. *Leukemia*. mai 2010;24(5):1025-36.
121. Tian YF, Ahn H, Schneider RS, Yang SN, Roman-Gonzalez L, Melnick AM, et al. Integrin-specific hydrogels as adaptable tumor organoids for malignant B and T cells. *Biomaterials*. déc 2015;73:110-9.
122. Mraz M, Zent CS, Church AK, Jelinek DF, Wu X, Pospisilova S, et al. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin α -4- β -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance: Stromal Cells Protect Lymphoma B-cells from Rituximab. *British Journal of Haematology*. oct 2011;155(1):53-64.

123. Guilloton F, Caron G, Ménard C, Pangault C, Amé-Thomas P, Dulong J, et al. Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood*. 15 mars 2012;119(11):2556-67.
124. Amé-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, Jean R, Monnier D, Caulet-Maugendre S, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood*. 15 janv 2007;109(2):693-702.
125. Warzocha K, Ribeiro P, Renard N, Bienvenu J, Charlot C, Coiffier B, et al. Expression of genes coding for the tumor necrosis factor and lymphotoxin ligand-receptor system in non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 23 nov 2000;49(9):469-75.
126. Launay E, Pangault C, Bertrand P, Jardin F, Lamy T, Tilly H, et al. High rate of TNFRSF14 gene alterations related to 1p36 region in de novo follicular lymphoma and impact on prognosis. *Leukemia*. mars 2012;26(3):559-62.
127. Boice M, Salloum D, Mourcin F, Sanghvi V, Amin R, Oricchio E, et al. Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell*. oct 2016;167(2):405-418.e13.
128. Yang Z-Z, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 1 mai 2006;107(9):3639-46.
129. Yang Z-Z, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. Malignant B Cells Skew the Balance of Regulatory T Cells and TH17 Cells in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Res*. 1 juill 2009;69(13):5522-30.
130. Ramsay AG, Clear AJ, Kelly G, Fatah R, Matthews J, MacDougall F, et al. Follicular lymphoma cells induce T-cell immunologic synapse dysfunction that can be repaired with lenalidomide: implications for the tumor microenvironment and immunotherapy. *Blood*. 19 nov 2009;114(21):4713-20.
131. Kiaii S, Clear AJ, Ramsay AG, Davies D, Sangaralingam A, Lee A, et al. Follicular Lymphoma Cells Induce Changes in T-Cell Gene Expression and Function: Potential Impact on Survival and Risk of Transformation. *JCO*. 20 juill 2013;31(21):2654-61.
132. Yang Z-Z, Grote DM, Xiu B, Ziesmer SC, Price-Troska TL, Hodge LS, et al. TGF- β upregulates CD70 expression and induces exhaustion of effector memory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. sept 2014;28(9):1872-84.
133. Yang Z-Z, Grote DM, Ziesmer SC, Niki T, Hirashima M, Novak AJ, et al. IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest*. 2 avr 2012;122(4):1271-82.
134. Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Myklebust JH, Varghese B, Gill S, et al. Anti-CD47 Antibody Synergizes with Rituximab to Promote Phagocytosis and Eradicate Non-Hodgkin Lymphoma. *Cell*. sept 2010;142(5):699-713.
135. Tarte K. Role of the microenvironment across histological subtypes of NHL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 08 2017;2017(1):610-7.

136. Strout MP. Sugar-coated signaling in follicular lymphoma. *Blood*. 15 oct 2015;126(16):1871-2.
137. Foucher ED, Blanchard S, Preisser L, Garo E, Ifrah N, Guardiola P, et al. IL-34 Induces the Differentiation of Human Monocytes into Immunosuppressive Macrophages. Antagonistic Effects of GM-CSF and IFN γ . Nataf S, éditeur. *PLoS ONE*. 8 févr 2013;8(2):e56045.
138. Roussel M, Ferrell PB, Greenplate AR, Lhomme F, Le Gallou S, Diggins KE, et al. Mass cytometry deep phenotyping of human mononuclear phagocytes and myeloid-derived suppressor cells from human blood and bone marrow. *J Leukoc Biol*. 2017;102(2):437-47.
139. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*. 20 févr 2014;40(2):274-88.
140. Han G, Spitzer MH, Bendall SC, Fantl WJ, Nolan GP. Metal-isotope-tagged monoclonal antibodies for high-dimensional mass cytometry. *Nat Protoc*. oct 2018;13(10):2121-48.
141. Rigo A, Vinante F. Flow cytometry analysis of receptor internalization/shedding. *Cytometry*. juill 2017;92(4):291-8.
142. Engering A, Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, et al. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol*. 1 mars 2002;168(5):2118-26.
143. Amir ED, Davis KL, Tadmor MD, Simonds EF, Levine JH, Bendall SC, et al. viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol*. juin 2013;31(6):545-52.
144. Coillard A, Segura E. In vivo Differentiation of Human Monocytes. *Front Immunol*. 13 août 2019;10:1907.
145. Shabani F, Farasat A, Mahdavi M, Gheibi N. Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer. *Inflamm Res*. oct 2018;67(10):801-12.
146. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. juill 2014;41(1):14-20.
147. Amé-Thomas P, Le Priol J, Yssel H, Caron G, Pangault C, Jean R, et al. Characterization of intratumoral follicular helper T cells in follicular lymphoma: role in the survival of malignant B cells. *Leukemia*. mai 2012;26(5):1053-63.
148. Relloso M, Puig-Kröger A, Pello OM, Rodríguez-Fernández JL, de la Rosa G, Longo N, et al. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J Immunol*. 15 mars 2002;168(6):2634-43.
149. Roussel M, Lhomme F, Roe CE, Bartkowiak T, Gravelle P, Laurent C, et al. Mass cytometry defines distinct immune profile in germinal center B-cell lymphomas. *Cancer Immunol Immunother*. mars 2020;69(3):407-20.
150. Takenaka MC, Gabriely G, Rothhammer V, Mascanfroni ID, Wheeler MA, Chao C-C, et al. Control of tumor-associated macrophages and T cells in glioblastoma via AHR and CD39. *Nat Neurosci*. mai 2019;22(5):729-40.

151. Xue P, Fu J, Zhou Y. The Aryl Hydrocarbon Receptor and Tumor Immunity. *Front Immunol.* 13 févr 2018;9:286.
152. Huang X, Li Y, Fu M, Xin H-B. Polarizing Macrophages In Vitro. In: Rousselet G, éditeur. *Macrophages* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2018 [cité 22 mai 2019]. p. 119-26. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7837-3_12
153. Jeannin P, Paolini L, Adam C, Delneste Y. The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages. *The FEBS Journal.* févr 2018;285(4):680-99.
154. Schulz D, Severin Y, Zanotelli VRT, Bodenmiller B. In-Depth Characterization of Monocyte-Derived Macrophages using a Mass Cytometry-Based Phagocytosis Assay. *Scientific Reports* [Internet]. déc 2019 [cité 30 mars 2019];9(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-38127-9>
155. Berthon C, Driss V, Liu J, Kuranda K, Leleu X, Jouy N, et al. In acute myeloid leukemia, B7-H1 (PD-L1) protection of blasts from cytotoxic T cells is induced by TLR ligands and interferon-gamma and can be reversed using MEK inhibitors. *Cancer Immunology, Immunotherapy.* déc 2010;59(12):1839-49.
156. Buckley CD, Doyonnas R, Newton JP, Blystone SD, Brown EJ, Watt SM, et al. Identification of alpha v beta 3 as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1. *J Cell Sci.* févr 1996;109 (Pt 2):437-45.
157. Ha B, Lv Z, Bian Z, Zhang X, Mishra A, Liu Y. 'Clustering' SIRPα into the Plasma Membrane Lipid Microdomains Is Required for Activated Monocytes and Macrophages to Mediate Effective Cell Surface Interactions with CD47. Wang Y, éditeur. *PLoS ONE.* 15 oct 2013;8(10):e77615.
158. Kecse-Nagy C, Szittner Z, Papp K, Hegyi Z, Rovero P, Migliorini P, et al. Characterization of NF-κB Reporter U937 Cells and Their Application for the Detection of Inflammatory Immune-Complexes. Pizzo SV, éditeur. *PLOS ONE.* 27 mai 2016;11(5):e0156328.
159. Riddy DM, Goy E, Delerive P, Summers RJ, Sexton PM, Langmead CJ. Comparative genotypic and phenotypic analysis of human peripheral blood monocytes and surrogate monocyte-like cell lines commonly used in metabolic disease research. Zissel G, éditeur. *PLOS ONE.* 10 mai 2018;13(5):e0197177.
160. Thomas AK, Maus MV, Shalaby WS, June CH, Riley JL. A Cell-Based Artificial Antigen-Presenting Cell Coated with Anti-CD3 and CD28 Antibodies Enables Rapid Expansion and Long-Term Growth of CD4 T Lymphocytes. *Clinical Immunology.* déc 2002;105(3):259-72.
161. Accelerating Medicines Partnership RA/SLE Network, Donlin LT, Rao DA, Wei K, Slowikowski K, McGeachy MJ, et al. Methods for high-dimensional analysis of cells dissociated from cryopreserved synovial tissue. *Arthritis Research & Therapy.* déc 2018;20(1).
162. Bellomo A, Gentek R, Bajénoff M, Baratin M. Lymph node macrophages: Scavengers, immune sentinels and trophic effectors. *Cellular Immunology.* août 2018;330:168-74.
163. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu M-H, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *The Journal of Experimental Medicine.* 9 avr 2012;209(4):653-60.
164. Spitzer MH, Nolan GP. Mass Cytometry: Single Cells, Many Features. *Cell.* 5 mai 2016;165(4):780-91.

165. Kimball AK, Oko LM, Bullock BL, Nemenoff RA, van Dyk LF, Clambey ET. A Beginner's Guide to Analyzing and Visualizing Mass Cytometry Data. *Jl.* 1 janv 2018;200(1):3-22.
166. Tacken PJ, Ter Huurne M, Torensma R, Figdor CG. Antibodies and carbohydrate ligands binding to DC-SIGN differentially modulate receptor trafficking. *Eur J Immunol.* août 2012;42(8):1989-98.
167. Berzi A, Ordanini S, Joosten B, Trabattoni D, Cambi A, Bernardi A, et al. Pseudo-Mannosylated DC-SIGN Ligands as Immunomodulants. *Sci Rep.* 13 2016;6:35373.
168. Horrevorts SK, Duinkerken S, Bloem K, Secades P, Kalay H, Musters RJ, et al. Toll-Like Receptor 4 Triggering Promotes Cytosolic Routing of DC-SIGN-Targeted Antigens for Presentation on MHC Class I. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 14 juin 2018 [cité 18 juin 2019];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01231/full>
169. Jarvis CM, Zwick DB, Grim JC, Alam MM, Prost LR, Gardiner JC, et al. Antigen structure affects cellular routing through DC-SIGN. *Proc Natl Acad Sci USA.* 23 juill 2019;116(30):14862-7.
170. Sprokholt JK, Overmars RJ, Geijtenbeek TBH. DC-SIGN in Infection and Immunity. In: Yamasaki S, éditeur. *C-Type Lectin Receptors in Immunity* [Internet]. Tokyo: Springer Japan; 2016 [cité 1 mai 2019]. p. 129-50. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-56015-9_9
171. Yaacoub K, Pedoux R, Tarte K, Guillaudeux T. Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. *Cancer Lett.* 10 2016;378(2):150-9.
172. Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. The physiological role of DC-SIGN: a tale of mice and men. *Trends Immunol.* oct 2013;34(10):482-6.
173. Cymer F, Beck H, Rohde A, Reusch D. Therapeutic monoclonal antibody N-glycosylation – Structure, function and therapeutic potential. *Biologicals.* mars 2018;52:1-11.
174. Wang L-X, Tong X, Li C, Giddens JP, Li T. Glycoengineering of Antibodies for Modulating Functions. *Annu Rev Biochem.* 20 juin 2019;88(1):433-59.
175. Temming AR, Dekkers G, van de Bovenkamp FS, Plomp HR, Bentlage AEH, Szittner Z, et al. Human DC-SIGN and CD23 do not interact with human IgG. *Sci Rep.* déc 2019;9(1):9995.
176. van de Bovenkamp FS, Hafkenscheid L, Rispens T, Rombouts Y. The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. *Jl.* 15 févr 2016;196(4):1435-41.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné Steve-Alexandre GENE BRIER, déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Etudiant : 21509365

N° Thèse : 56

Nom et Prénom : GENE BRIER Steve-Alexandre

Sujet : **Dialogue tumeur – microenvironnement dans le lymphome folliculaire :**
Interaction BCR / DC-SIGN

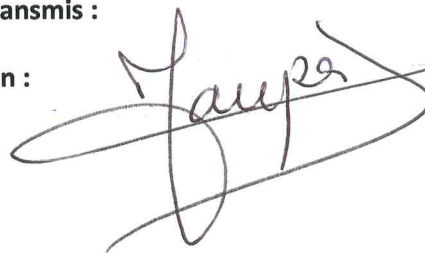
Tours, le 21/10/2020

Le Directeur de Thèse :



Vu et Transmis :

Le Doyen :



**Dialogue tumeur – microenvironnement dans le lymphome folliculaire :
interaction BCR / DC-SIGN**

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Le lymphome folliculaire (FL) est une prolifération lymphocytaire B maligne très dépendante de son microenvironnement. De nombreux mécanismes de soutien de la tumeur par son microenvironnement ont ainsi été décrits. En particulier le récepteur à l'antigène (BCR) des cellules tumorales est capable, via des modifications génétiques induisant l'introduction de résidus mannoses, d'interagir avec la lectine DC-SIGN exprimée par les macrophages associés aux tumeurs (TAM) : cette interaction délivre un signal d'activation et de survie aux cellules lymphomateuses. Nous formulons l'hypothèse que cette interaction a aussi des conséquences sur les cellules myéloïdes DC-SIGN^{POS} et qu'elle module leur phénotype pour favoriser la croissance tumorale.

Nous avons mis au point un panel de cytométrie de masse (*cytometry by time-of-flight*, CyTOF) pour caractériser l'hétérogénéité des cellules ganglionnaires exprimant DC-SIGN. De plus, pour pallier la difficulté d'isoler des TAM de FL, nous avons évalué la pertinence de différents types de cellules myéloïdes obtenues *in vitro* comme modèles de TAM. Nous avons montré, en transcriptomique et en CyTOF, la supériorité des macrophages obtenus par polarisation *in vitro* de monocytes en présence d'IL-4 (M-IL4 et M-FL), une cytokine surexprimée dans le FL, par rapport à la lignée monoblastique U937 DC-SIGN à représenter un modèle valide de TAM de FL. L'interaction BCR/DC-SIGN a été reproduite par des cocultures entre des cellules DC-SIGN^{POS} (U937 DC-SIGN ou M-IL4) et des lymphocytes B exprimant un BCR mannosylé (lignée L3055 ou lymphocytes B de FL). Cette interaction n'entraîne pas d'internalisation de DC-SIGN. Le signal délivré aux cellules myéloïdes reste donc à caractériser en évaluant d'autres aspects de l'activation de DC-SIGN.

Lymphome folliculaire, microenvironnement tumoral, DC-SIGN, N-glycosylation, cellules myéloïdes, CyTOF, internalisation

JURY

PRÉSIDENT : Professeur Gilles THIBAUT
DIRECTEUR DE THESE : Professeur Karin TARTE
MEMBRES : Professeur Hervé WATIER
Docteur Mikaël ROUSSEL

Tours, le 21/10/2020