

Nom de l'unité de recherche:

UMR978 INSERM-Université Sorbonne Paris Nord « Signalisation, Microenvironnement et Hémopathies Lymphoïdes B » (SIMHEL)

Noms de la direction de thèse :

Directrice de thèse Dr Laura Gardano, HDR (50%) laura.gardano@univ-paris13.fr

Co-directeur de thèse Dr Grégory Lazarian (50%) gregory.lazarian@aphp.fr

Directrice de l'Unité INSERM U978- SIMHEL : Nadine Varin-Blank nadine.varin@inserm.fr

TITRE : Éducation de la composante stromale du microenvironnement tumorale dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC)

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une pathologie lymphoproliférative caractérisée par l'accumulation des lymphocytes B CD5+ dans le sang et les organes lymphoïdes tels que les ganglions. Le dialogue entre la cellule tumorale et son microenvironnement est essentiel à la survie et la prolifération des cellules tumorales¹. De plus, les cellules tumorales sont capables de détourner à leur avantage le microenvironnement afin de soutenir leur survie et prolifération². La description des mécanismes moléculaires impliqués dans « l'éducation » des cellules du microenvironnement par les cellules tumorales sera l'objectif principal de ce projet. Le modèle expérimental qui sous-tendra ces études s'appuiera sur un modèle de coculture de cellules stromales médullaires (lignée HS5) représentatives du microenvironnement avec des cellules de LLC (lignée MEC-1, cellules primaires de patients). À l'aide de ce modèle expérimental, des études préliminaires de protéomique et de RNA-seq initiées en collaboration avec les plateformes de l'UFR SMBH de protéomique et de Biologie moléculaire ont montré que les cellules HS5 co-cultivées avec les cellules MEC-1 présentent une expression différentielle de protéines et de gènes impliquées dans le métabolisme et le remodelage du cytosquelette. Ainsi et sur la base de ces résultats, nous articulerons le projet selon les 3 axes suivants :

I. Reprogrammation métabolique des cellules stromales par les cellules de LLC.

Les analyses protéomiques et transcriptomique ont révélé une surexpression des protéines impliquées dans la glycolyse et les réactions d'oxydoréduction mitochondriales (par exemple la NADH-ubiquinone oxydoréductase) dans les cellules HS5 à la suite de leur coculture avec les cellules MEC-1. En parallèle, une analyse par cytométrie en flux a montré une production augmentée de ROS dans les cellules HS5 co-cultivée avec des cellules primaires de patients LLC. Nous avons aussi confirmé avec des expériences en Seahorse l'augmentation de la glycolyse dans les cellules HS-5 en co-culture ainsi que l'augmentation de la consommation d'O₂. Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent la mise en place d'une reprogrammation métabolique dans les cellules stromales induite par les cellules tumorales de LLC. De nombreux systèmes sont disponibles pour mesurer les changements d'activité métabolique tels que ceux liés à la consommation d'oxygène, le métabolisme du glucose, d'acides gras ou d'acides aminés. Les systèmes compatibles avec la cytométrie en flux nous permettrons d'analyser et de mesurer ce changement métabolique dans les cellules HS5. Les conséquences de cette reprogrammation métabolique des cellules HS5 seront ensuite évaluées sur la survie des cellules MEC-1. À l'aide d'inhibiteur des voies métaboliques spécifiques, nous vérifierons les conséquences de l'altération du métabolisme dans le dialogue entre les deux types cellulaires. Ces études seront étendues aux cellules primaires issues des patients LLC et disponibles à l'hôpital Avicenne pour établir la pertinence physiopathologique de ces changements métaboliques.

II. *Etude de la voie de signalisation Hippo.*

Lors de la coculture entre les cellules stromales et les cellules de LLC, nous avons observé qu'une fraction des cellules tumorales avaient la capacité d'adhérer aux cellules stromales. Ce phénomène d'adhésion peut entraîner l'activation de voies de signalisation dans les cellules stromales et notamment la voie de signalisation Hippo qui est activée par le contact cellule-cellule. Cette voie de signalisation est constituée d'une cascade de protéines kinases aboutissant à la phosphorylation des facteurs transcriptionnels YAP/TAZ. A la suite de sa phosphorylation, YAP est exclus du noyau, entraînant une modification de l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et l'adhérence cellulaire ³. A l'aide d'un système rapporteur spécifique de la voie Hippo, nous avons observé dans les cellules HS5 co-cultivées avec des cellules MEC-1, une diminution de l'activité transcriptionnelle de YAP associée à une augmentation de sa forme phosphorylée. Ces données préliminaires indiquent que la voie Hippo pourrait être activée dans les cellules stromales en réponse à leur coculture avec des cellules de LLC. Nous possédons un mutant de YAP (5SA) qui ne peut pas être phosphorylé et transloque dans le noyau activant son activité transcriptionnelle. L'utilisation de ce mutant récapitule l'inhibition de la voie Hippo. Nous vérifierons si la surexpression de ce mutant dans les cellules stromales affecte la viabilité des cellules LLC ou encore leurs propriétés d'adhérence au stroma. Par ailleurs, la voie Hippo est aussi impliquée dans la différenciation et le maintien des cellules folliculaires réticulaires (FRC), un sous-type de cellules stromales au sein des ganglions qui constituent les sites préférentiels d'accumulation et de prolifération des cellules de LLC ⁴. En conséquence, nous évaluerons la capacité des cellules de LLC à induire la différenciation des cellules stromales HS-5 en cellules ganglionnaire-like (FRC) et le rôle de la voie Hippo dans ce mécanisme. L'ensemble de nos résultats préliminaires suggèrent que la voie Hippo pourrait jouer un rôle important dans le dialogue entre les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement. L'expression et la localisation d'effecteurs en amont de la voie Hippo, tels que les cadhérines ou d'autres protéines exprimées à la membrane plasmique, seront également analysées en présence et en absence de coculture afin d'établir leur contribution dans l'interaction entre les deux types cellulaires.

III. *Modèle de sphéroïdes pour reproduire le dialogue 3D entre les cellules du microenvironnement et les cellules de la LLC*

Il est plausible que la voie de signalisation Hippo soit régulée par les signaux mécaniques, en particulier lorsque le microenvironnement est soumis à la force de pression due à la charge de la masse tumorale. Les cultures en 3D offrent sont un outil pertinent pour reproduire cette composante mécanique *in vitro*. Il est possible de constituer des modèles de culture cellulaire « sphéroïdes » contenant des cellules stromales HS-5 et des cellules LLC (primaires ou lignées cellulaires), où les cellules tumorales acquièrent un avantage de survie et peuvent entretenir une grande variété d'interactions avec le microenvironnement dans un contexte tridimensionnel. Nous utiliserons ces modèles en 3D pour étudier la régulation de la voie de signalisation Hippo et la reprogrammation métabolique des cellules stromales par les cellules de LLC. Nous avons généré des cellules stromales HS-5 exprimant de manière stable la GFP, ce qui permettra de visualiser la composante stromale dans les sphéroïdes contenant des cellules de LLC et les cellules stromales. Ainsi, nous serons en mesure de décrire les déterminants moléculaires de l'interaction des cellules CLL avec la composante stromale et d'analyser l'architecture de cette interaction via des techniques d'imagerie.

De plus, les sphéroïdes permettront d'étudier l'effet d'inhibiteurs thérapeutiques utilisés pour interférer avec la croissance tumorale et le dialogue entre les cellules de LLC et le

microenvironnement dans un modèle qui reproduit au mieux les caractéristiques du ganglion lymphatique.

Bibliographie

1. Kipps, T.J., Stevenson, F.K., Wu, C.J., Croce, C.M., Packham, G., Wierda, W.G., O'Brien, S., Gribben, J., and Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers* 3, 16096. 10.1038/nrdp.2016.96.
2. Mangolini, M., and Ringshausen, I. (2020). Bone Marrow Stromal Cells Drive Key Hallmarks of B Cell Malignancies. *IJMS* 21, 1466. 10.3390/ijms21041466.
3. Ma, S., Meng, Z., Chen, R., and Guan, K.-L. (2019). The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annu. Rev. Biochem.* 88, 577–604. 10.1146/annurev-biochem-013118-111829.
4. Choi, S.Y., Bae, H., Jeong, S.-H., Park, I., Cho, H., Hong, S.P., Lee, D.-H., Lee, C., Park, J.-S., Suh, S.H., et al. (2020). YAP/TAZ direct commitment and maturation of lymph node fibroblastic reticular cells. *Nat Commun* 11, 519. 10.1038/s41467-020-14293-1.
5. Apoorva, F., Loiben, A.M., Shah, S.B., Purwada, A., Fontan, L., Goldstein, R., Kirby, B.J., Melnick, A.M., Cosgrove, B.D., and Singh, A. (2018). How Biophysical Forces Regulate Human B Cell Lymphomas. *Cell Reports* 23, 499–511. 10.1016/j.celrep.2018.03.069.
6. Haselager, M.V., Van Driel, B.F., Perelaer, E., De Rooij, D., Lashgari, D., Loos, R., Kater, A.P., Moerland, P.D., and Eldering, E. (2023). In Vitro 3D Spheroid Culture System Displays Sustained T Cell-dependent CLL Proliferation and Survival. *HemaSphere* 7, e938. 10.1097/HS9.0000000000000938.