

Laboratoire : INSERM U978- Signalisation, Microenvironnement et Hémopathies Lymphoïdes B (SIMHEL)

Directrice du laboratoire : Dr Nadine Varin-Blank

Titre : Relation entre the tyrosine kinase BTK et β -caténine dans le dialogue des cellules B tumorales et le microenvironnement dans la LLC.

Directeur de thèse : Prof. Dominique Ledoux

Co-encadrante de thèse : Dr Laura Gardano

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est caractérisée par une accumulation de cellules B CD5 positives au sein des organes lymphoïdes secondaires mais aussi dans la moelle osseuse et dans le sang. Dans ces microenvironnements, les cellules B tumorales reçoivent des signaux qui sont essentiels à leur survie et expansion. En effet les cellules de LLC en absence de ces signaux, entrent rapidement en apoptose.

Afin de mieux décrire les bases moléculaires du dialogue entre les cellules B tumorales et leur microenvironnement, nous avons développé un modèle de co-culture de cellules B de LLC en présence d'une lignée de cellules stromales médullaires (HS-5). Dans ce contexte, nous nous sommes focalisés sur la protéine β -caténine qui est au centre de la voie de signalisation Wnt et qui contrôle la prolifération et la différenciation de plusieurs types cellulaires. Nous avons observé qu'en réponse à la co-culture, le niveau de β -caténine dans les cellules B tumorales est augmenté. Contrairement à son activation en réponse au ligand Wnt, la β -caténine dans les cellules B de LLC ne présente pas d'activité transcriptionnelle canonique dépendante du TCF, bien qu'elle soit présente dans le noyau. Par ailleurs, notre laboratoire a aussi montré dans les cellules B tumorales que la β -caténine est également un effecteur activé en réponse à l'antigène (voie du BCR). Dans la LLC, les voies de signalisation du BCR, tout comme le microenvironnement, sont essentiels à la survie des cellules B. De façon intéressante, les voies de signalisation du BCR et celles activées en réponse au microenvironnement partagent de nombreux effecteurs, notamment la tyrosine kinase BTK. BTK est une tyrosine kinase requise pour le développement des cellules B (Middendorp et al., 2003). La structure de BTK comprend cinq domaines dont un domaine PH, un domaine Tec (TH) et des domaines SH3 et SH2 (Joseph et al., 2017). L'inhibition de BTK par l'Ibrutinib est au cœur des stratégies thérapeutiques actuelles pour le traitement de la LLC. En effet, en bloquant BTK, l'Ibrutinib inhibe la voie du BCR et bloque l'interaction des cellules B tumorales avec les cellules du microenvironnement, interrompant ainsi la transduction des signaux de survie. Nous avons observé que le traitement par Ibrutinib des cellules de LLC en coculture empêche la stabilisation de la β -caténine indiquant un lien entre la kinase BTK et la β -caténine. De plus, nous avons montré par immunoprécipitation que BTK et β -caténine stabilisée appartiennent au même complexe moléculaire.

En plus de son rôle dans la voie du BCR, BTK participe aussi à la transduction du signal lié à l'activation des récepteurs de chimiokines, notamment le récepteur CXCR4. Nous avons observé que l'AMD3100, un antagoniste du CXCR4, empêche la stabilisation de la β -caténine des cellules B en co-culture. Ces observations suggèrent que le ligand du CXCR4 (CXCL12) sécrété par les cellules stromales, active BTK qui en retour entraîne la stabilisation de la β -caténine. Le rôle de la β -caténine dans la physiopathologie de la LLC n'est pas encore connu mais plusieurs travaux ont montré que la voie Wnt/ β -caténine est altérée dans la LLC. Dans la voie Wnt, la β -caténine stabilisée se comporte comme un co-activateur transcriptionnel de gènes impliqués dans la survie cellulaire. Un autre rôle de la β -caténine a été décrit dans les phénomènes d'adhérence cellulaire et nous émettons l'hypothèse qu'elle pourrait participer à l'adhérence des cellules B de LLC aux cellules stromales que nous avons observé ainsi que d'autres équipes (Mangolini et al., 2018). Par ailleurs CXCR4 et BTK sont connus pour réguler l'adhérence des cellules de LLC via la régulation des intégrines (Montresor et al., 2018) (Herman et al., 2015). Afin de poursuivre nos travaux concernant ce nouvel axe CXCR4-BTK- β -caténine, nous proposons le projet suivant qui apportera de nouvelles informations dans l'analyse de la communication entre la cellule B tumorale et son microenvironnement.

1. Interaction BTK et β -caténine

Afin de vérifier si l'interaction entre BTK et la β -caténine observée est dépendante de la stimulation de CXCR4, nous traiterons les cellules de LLC avec du CXCL12 et vérifierons l'interaction BTK et β -caténine par immunoprécipitation.

Pour établir si l'interaction entre ces deux protéines est directe ou indirecte, nous synthétiserons et purifierons à partir d'*E. Coli*, ces deux protéines sous forme recombinante et étiquetée (His-BTK et GST- β -caténine). Nous analyserons ensuite leur interaction par un GST-pull down *in vitro* après avoir mélangé les deux protéines purifiées. Dans le but de mieux caractériser l'interaction entre les deux protéines, nous synthétiserons les protéines correspondant aux domaines connus de BTK (PH, TH, SH2 et SH3) et, par GST-pull down, établirons les bases moléculaires et structurales de l'interaction entre BTK et β -caténine.

2. KNOCK-OUT de CXCL12 dans les cellules stromales.

Afin d'analyser la contribution de CXCL12 à la stabilisation de la β -caténine en réponse à la coculture, nous réaliserons un knock-out de CXCL12 dans les cellules stromales grâce à la technique CRISPR-Cas9. Nous analyserons l'impact de ce knock-out sur la stabilisation de la β -caténine dans les cellules de LLC en co-culture mais aussi sur l'activation de BTK et son interaction avec la β -caténine. Il a été montré que l'activité de la β -caténine dépend de sa localisation cellulaire. Par immunofluorescence et fractionnement cellulaire nous analyserons l'impact de la déplétion en CXCL12 sur la distribution de la β -caténine dans les cellules B de LLC en co-culture. Par ailleurs, il est connu que la localisation de la β -caténine ainsi que sa fonctionnalité dépend de son état de phosphorylation. Nous analyserons donc l'effet du knock-out du CXCL12 sur plusieurs sites de phosphorylation de la β -caténine qui ont été décrits comme régulant sa stabilité et sa localisation membranaire ou nucléaire.

3. CXCL12 et adhérence cellulaire

L'axe CXCR4-BTK contrôle l'expression des intégrines à la surface des cellules B ainsi que l'adhérence des cellules B avec les cellules stromales. La β -caténine favorise l'adhérence cellulaire en stabilisant les jonctions cellulaires dépendantes des cadhérines. Nous avons observé que la diminution de l'expression de la β -caténine dans les cellules B de LLC diminue leur interaction avec les cellules stromales. Dans notre modèle de co-culture avec les cellules stromales déplétées en CXCL12, nous évaluerons si l'adhérence des cellules B de LLC est diminuée et si la surexpression de la β -caténine dans les cellules de LLC permet de rétablir l'adhérence cellule tumorale-cellule stromale. Pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire de l'altération de l'adhérence cellulaire en absence de CXCL12, nous évaluerons par cytométrie en flux l'expression des molécules impliquées dans les phénomènes d'adhésion cellulaire telles que les intégrines (VLA-4) et les cadherines (N-cadhérine).

4. Rôle de CXCL12 dans le microenvironnement ganglionnaire

Le microenvironnement ganglionnaire est le site préférentiel d'accumulation et de prolifération des cellules B de LLC chez le patient. Dans un ganglion sain, les principales cellules stromales sont les FRC (*follicular reticular cells*) et FDC (*follicular dendritic cells*) qui organisent les structures (zone B et zone T) dans lesquelles les cellules immunitaires circulent et se rencontrent pour déclencher une réponse immunitaire. Ces structures sont très altérées/désorganisées dans un ganglion de LLC avec notamment une perte de visualisation des cellules FDC. Afin de s'approcher au plus près des réelles conditions physiopathologiques, il nous paraît important de transposer notre modèle de coculture (lignée médullaire HS5) par des cellules stromales ganglionnaires. Il n'existe pas à l'heure actuelle de lignées de cellules stromales ganglionnaires représentatives des FRC ou FDC mais il est possible de différencier des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse en FRC en utilisant un cocktail de cytokines dont le TNF et la lymphotoxine $\alpha 1/\beta 2$ (Pandey et al., 2017). Nous mettrons donc en place ce protocole pour différencier les cellules HS-5 en cellules FRC afin d'évaluer *in vitro* l'interaction des cellules B de LLC avec ces cellules représentatives du microenvironnement ganglionnaire. Dans le lymphome folliculaire, les cellules B tumorales modifient le comportement des cellules FRC ganglionnaires en induisant la sécrétion de CXCL12 par les cellules tumorales. Ce CXCL12 va alors en retour augmenter l'adhérence de ces cellules tumorales aux cellules FRC (Pandey et al., 2017). Sur la base de ces informations, nous analyserons pour la première fois la capacité des cellules de LLC à modifier le comportement des cellules FRC-like différenciées à partir de cellules HS5. De plus, nous pourrions utiliser notre modèle de cellules HS-5 knock-out CXCL12 et les différencier en FRC afin d'évaluer le rôle de cette chimiokine sur l'adhésion et migration des cellules LLC dans un microenvironnement ganglionnaire.

Références

Herman, S.E.M., Mustafa, R.Z., Jones, J., Wong, D.H., Farooqui, M., and Wiestner, A. (2015). Treatment with Ibrutinib Inhibits BTK- and VLA-4-Dependent Adhesion of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells In Vivo. *Clin. Cancer Res.* 21, 4642–4651.

Joseph, R.E., Wales, T.E., Fulton, D.B., Engen, J.R., and Andreotti, A.H. (2017). Achieving a Graded Immune Response: BTK Adopts a Range of Active/Inactive Conformations Dictated by Multiple Interdomain Contacts. *Structure* 25, 1481-1494.e4.

Mangolini, M., Götte, F., Moore, A., Ammon, T., Oelsner, M., Lutzny-Geier, G., Klein-Hitpass, L., Williamson, J.C., Lehner, P.J., Dürig, J., et al. (2018). Notch2 controls non-autonomous Wnt-signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Commun.* *9*.

Middendorp, S., Dingjan, G.M., Maas, A., Dahlenborg, K., and Hendriks, R.W. (2003). Function of Bruton's Tyrosine Kinase during B Cell Development Is Partially Independent of Its Catalytic Activity. *J. Immunol.* *171*, 5988–5996.

Montresor, A., Toffali, L., Rigo, A., Ferrarini, I., Vinante, F., and Laudanna, C. (2018). CXCR4- and BCR-triggered integrin activation in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells depends on JAK2-activated Bruton's tyrosine kinase. *Oncotarget* *9*.

Pandey, S., Mourcin, F., Marchand, T., Nayar, S., Guirriec, M., Pangault, C., Monvoisin, C., Amé-Thomas, P., Guilloton, F., Dulong, J., et al. (2017). IL-4/CXCL12 loop is a key regulator of lymphoid stroma function in follicular lymphoma. *Blood* *129*, 2507–2518.