

Laboratoire Signalisation, Microenvironnement et Hémopathies Lymphoïdes B (SIMHEL)

INSERM U978 – Université Sorbonne Paris Nord

UFR SMBH. 74 rue marcel Cachin. 93000 Bobigny.

Directeur de thèse : Pr Dominique Ledoux (ledoux@univ-paris13.fr)

Co-encadrante de thèse : Dr Laura Gardano (laura.gardano@univ-paris13.fr)

« Education » des cellules du microenvironnement tumoral par les cellules B de Leucémie Lymphoïde Chronique

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une lymphoprolifération caractérisée par l'accumulation de lymphocytes B CD5+ dans le sang et les organes lymphoïdes dont les ganglions. Le dialogue entre les cellules tumorales et leur microenvironnement est essentiel à la survie et la prolifération des lymphocytes tumoraux (Kipps et al., 2017). En effet, les cellules tumorales sont capables de détourner à leur avantage le microenvironnement afin de soutenir cette survie (Mangolini and Ringshausen, 2020).

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). A l'aide de ce modèle expérimental, des études préliminaires de protéomique initiées en collaboration avec la plateforme de protéomique de l'UFR SMBH (Dr Florence Poirier) ont montré que les cellules HS5 co-cultivées avec les cellules MEC-1 présentent une expression différentielle de protéines impliquées dans le métabolisme, le remodelage du cytosquelette et l'adhérence cellulaire. Ainsi et sur la base de ces résultats, nous articulons le projet selon les 3 axes suivants :

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

L'analyse protéomique a révélé une surexpression des protéines impliquées dans 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 exploré un lien entre ces phénomènes et la fonctionnalité mitochondriale et nous avons observé à l'aide d'un test MTS une augmentation de l'activité mitochondriale dans les cellules HS5 en coculture. 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 permettront 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. A 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 relevance physiopathologique de ces changements métaboliques.

II. Etude de la voie de signalisation Hippo.

Lors de la coculture entre cellules stromales et cellules de LLC, nous avons observé qu'une fraction des cellules tumorales avaient la capacité d'adhérer aux cellules stromales. Ce phénomène

d'adhérence 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 (Ma et al., 2019). 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. L'utilisation d'inhibiteurs ou de shRNA ciblant les effecteurs de la voie Hippo permettra de confirmer l'importance de cette voie de signalisation sur l'adhérence des cellules de LLC aux cellules stromales mais aussi sur l'augmentation de leur capacité de survie.

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 (Choi et al., 2020). 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. *Etude par RNA-seq du transcriptome des cellules stromales.*

L'UFR SMBH dispose d'une plateforme de séquençage à haut débit permettant d'effectuer des expériences de transcriptomique par RNA-seq. Par ailleurs, le laboratoire possède l'ensemble des expertises pour cette réalisation et l'analyse des données issues de RNA-seq. Sur cette base, nous entreprendrons une analyse transcriptomique des cellules HS-5 en coculture avec les cellules MEC-1. Les données obtenues par RNAseq seront soumises à une analyse croisée avec les données de protéomique décrites ci-dessus afin de vérifier si les changements d'expression des protéines sont le reflet d'une régulation transcriptionnelle. Les cibles sur-exprimées ou sous-exprimées seront confirmées par des techniques complémentaires tels que la RT-qPCR. Par la suite, l'invalidation des cibles d'intérêt précédemment identifiées permettra d'établir leur rôle dans la survie ou l'adhérence des cellules tumorales de LLC aux cellules stromales du microenvironnement.

En conclusion, ce projet aura pour objectif de générer de nouvelles données sur le dialogue entre les cellules de LLC et leur microenvironnement en termes de changements d'expressions transcriptionnelles et protéomiques. Ces études seront complétées par une approche mécanistique *via* l'étude des voies métaboliques et de signalisation potentiellement impliquées dans ces processus. La pertinence physiopathologique de ces modifications sera confirmée avec l'utilisation de cellules primaires de patient LLC mais aussi de cellules du microenvironnement autres que les cellules stromales médullaires, telles que les « Nurse-like cells » dérivées de monocytes. Ainsi, l'établissement d'une cartographie des modifications d'expression dans les cellules stromales induites par les cellules tumorales pourrait faire émerger de potentielles cibles thérapeutiques en vue d'interrompre le dialogue délétère entre la cellule tumorale et son microenvironnement.

References

- Choi, S.Y., Bae, H., Jeong, S.-H., et al. (2020). *Nat. Commun.* **11**, 519.
- Kipps, T.J., Stevenson, F.K., Wu, C.J., et al. (2017) *Nat. Rev. Dis.*
- Ma, S., Meng, Z., Chen, R., and Guan, K.-L. (2019) *Annu. Rev. Biochem.* **88**, 577–604.
- Mangolini, M., and Ringshausen, I. (2020). *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1466.