

Contrat doctoral – ED Galilée

Titre du sujet : *ROLE DU STRESS MECANIQUE DANS LA COMMUNICATION AVEC LE MICROENVIRONNEMENT DANS LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE*

- Unité de recherche : UNITE INSERM U1349-SIMHEL
- Discipline : Science de la vie et de la santé
- Direction de thèse : Laura Gardano, MCF HDR co-encadrant : Gregory Lazarian, MCU-PH
- Contact : laura.gardano@univ-paris13.fr
- Domaine de recherche : Oncohématologie
- Mots clés : microenvironnement, YAP, stress mécanique, leucémie lymphoïde chronique, matrice extra-cellulaire

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est un syndrome lymphoprolifératif caractérisé par l'accumulation de lymphocytes B matures dans le sang, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Malgré les avancées thérapeutiques, la LLC demeure une hémopathie incurable. Au cours de la progression clinique, le dialogue établi entre la cellule B tumorale et son microenvironnement joue un rôle essentiel. Au sein des organes lymphoïdes les cellules stromales et immunitaires du microenvironnement (ME), bien que non transformées, subissent une éducation et un contrôle par les cellules tumorales afin d'assurer le nichage, la survie et l'expansion de ces dernières. La caractérisation et la compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents à la progression de la maladie et à la résistance aux traitements au sein de ce milieu permissif est essentielle. Le remodelage de la matrice extra-cellulaire (MEC) et l'interaction directe des cellules tumorales avec celles du microenvironnement sont source de signaux mécaniques qui modifient la morphologie cellulaire mais initient aussi une reprogrammation transcriptionnelle et métabolique. En particulier, le changement de morphologie cellulaire et la rigidité de la matrice extra-cellulaire régulent l'activité des co-facteurs transcriptionnels YAP/TAZ dont l'activité est requise pour la différenciation des FRC, principales cellules stromales dans les ganglions. *In vitro*, la co-culture de cellules de LLC issues du sang périphérique avec des cellules stromales permet d'étudier le dysfonctionnement du dialogue avec le microenvironnement, mais ces systèmes de culture 2D ne permettent pas de reproduire la complexité cellulaire ni la structure tridimensionnelle du ganglion qui ont un impact mécanique et sécrétoire sur ce dialogue. Les modèles de culture de type « sphéroïdes » contenant des cellules primaires de LLC issues de sang périphérique et des éléments du microenvironnement dont les cellules stromales permettent de mimer l'organisation spatiale des ganglions. Ces sphéroïdes permettent la prolifération des cellules de LLC jusqu'à la formation de follicules germinatifs alors que celles-ci sont habituellement réfractaires à la prolifération *in vitro*. Afin d'améliorer la connaissance et les approches thérapeutiques dans la LLC, les objectifs principaux de ce projet sont :

- 1) *Étude du rôle du stress mécanique dans la désorganisation architecturale du ganglion, la reprogrammation métabolique et immunitaire.* Le dialogue entre la cellule tumorale et son

microenvironnement implique des interactions directes entre les différentes cellules présentes et la matrice extracellulaire (MEC). Parmi les principales voies de signalisation régulant la réponse cellulaire aux signaux mécaniques issus de ces interactions, la voie Hippo/YAP joue un rôle clé dans la réorganisation de MEC et la transmission des signaux de contact. Nous étudierons sa régulation et son implication dans la désorganisation ganglionnaire, ainsi que dans la reprogrammation métabolique et immunitaire du microenvironnement tumoral. Pour mieux comprendre le rôle de la voie liée au stress mécanique régulée par YAP, nous avons généré des lignées HS-5 stables exprimant le mutant YAP5SA qui permet la surexpression de YAP et sa localisation dans le noyau. En parallèle, nous possédons des cellules exprimant un shYAP qui présentent une réduction de plus de 70% de YAP. Nous établirons des co-cultures avec ces cellules transgéniques et les cellules LLC primaires (**prélèvements de patients suivis à l'hôpital Avicenne**) et évaluerons la survie des cellules tumorales et les propriétés d'adhérence à la composante stromale. Nous avons déjà montré que dans les cellules leucémiques il existe une corrélation entre l'adhérence et la survie des cellules tumorales. Nous analyserons l'expression des principales molécules d'adhésion qui ont montré leur importance dans les interactions avec les cellules stromales : ICAM/VCAM, les intégrines (notamment VLA-4), les cadhérines et caténines (alpha et beta) connues pour faire le lien entre adhérence cellulaire et réorganisation du cytosquelette. Si nous confirmons que l'altération de la quantité et de la fonction de YAP a un impact sur les capacités adhésives, le ciblage de cette voie offrira de potentielles pistes thérapeutiques. En effet, alors que les inhibiteurs de BTK (ibrutinib, acalabrutinib etc..) qui ciblent l'interaction entre les cellules LLC et le microenvironnement permettent un relargage des cellules tumorales du ganglion vers le sang, des résistances aux traitements se développent et des alternatives thérapeutiques sont nécessaires. **Les données obtenues permettront de confirmer le rôle de la voie Hippo/YAP dans la reprogrammation du microenvironnement de la LLC.**

2) *Construction de modèles 3D* (sphéroïdes) contenant les cellules de LLC et les autres cellules du microenvironnement. Le développement de ces modèles est essentiel pour reproduire l'architecture altérée du microenvironnement tumoral. Nous maîtrisons les techniques d'obtention de sphéroïdes à partir de cellules stromales (HS-5) et de PBMCs ou de cellules B LLC de patients et purifiées. Ces sphéroïdes permettent la survie et la prolifération des cellules tumorales. Nous réaliserons des sphéroïdes contenant des PBMCs de LLC et les différentes cellules stromales HS-5. Il sera alors possible d'analyser la distribution, la survie des cellules tumorales et leurs interactions avec les cellules stromales et les autres populations cellulaires immunitaires. La contribution du stress mécanique dans la formation de sphéroïdes n'a jamais été explorée dans le contexte de la LLC. Nous évaluerons la localisation cellulaire de YAP dans les cellules stromales. La constitution des sphéroïdes avec les cellules stromales HS-5(shYAP) et HS-5(YAP5SA) permettra d'établir une relation entre le niveau de YAP et la structure plus ou moins compacte et stable du sphéroïde. Nous faisons l'hypothèse que le trafic des cellules tumorales sera fortement modifié en fonction du niveau de YAP et de la structure 3D. Tous ces aspects seront évalués par immunofluorescence avec des marqueurs spécifiques pour suivre le positionnement des cellules stromales et l'infiltration des cellules leucémiques. **Cet objectif permettra la constitution de modèles d'étude du microenvironnement et reproduisant plus conformément l'organisation 3D des ganglions.**