

Contrat doctoral – ED Galilée

Titre du sujet : Implication de la niche tolérogène ganglionnaire dans la progression de la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) et dans la résistance aux thérapies

Unité de recherche : UMR1349- INSERM-Université Sorbonne Paris Nord « Signalisation, Microenvironnement et Hémopathies Lymphoïdes B » (SIMHEL)

Discipline : Science de la vie et de la santé

Direction de thèse : Antoine Martin PU-HP
Co-Directrice : Elisabetta Dondi IR1

Contact : antoine.martin@aphp.fr
elisabetta.dondi@inserm.fr

Domaine de recherche : Onco-hématologie

Mots clés : Leucémie, microenvironnement tumoral, imagerie de masse, cytométrie en images

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est un syndrome lymphoprolifératif résultant de l'accumulation de lymphocytes B matures dans le sang et les organes lymphoïdes. Dans ces organes, un dialogue bidirectionnel altéré entre les lymphocytes B tumoraux et les cellules du microenvironnement (ME) joue un rôle prépondérant dans la survie et l'expansion d'un pool prolifératif de cellules leucémiques et dans le défaut de reconnaissance anti-tumorale qui sont à l'origine des récurrences de la maladie et de la résistance aux traitements actuels. Ce microenvironnement tumoral est défini par l'ensemble des facteurs moléculaires, cellulaires et tissulaires environnant les cellules leucémiques et capables de les influencer ou d'être influencés par elles. **Le projet proposé vise à comprendre comment les cellules leucémiques éduquent à leur profit ce milieu environnant en établissant une niche tolérogène.** Cette étude pourra ainsi fournir des indications sur les mécanismes sous-jacents conduisant à la résistance aux traitements actuels.

Nos travaux antérieurs indiquent une désorganisation de l'architecture des ganglions de LLC et l'implication de macrophages M2, appelés Nurse-like cells (NLC), dans le maintien des cellules de LLC au sein des organes lymphoïdes via la production de la chimiokine CCL21.

Le projet vise à : **1)** analyser les interactions spatiales et fonctionnelles entre les composants cellulaires et moléculaires du microenvironnement tumoral sur des biopsies ganglionnaires de patients de LLC; **2)** caractériser les acteurs moléculaires membranaires et solubles du dialogue entre les cellules tumorales et les NLCs.

1. Cartographie des composants cellulaires et moléculaires des ganglions de LLC.

Une analyse approfondie du ME demande l'intégration de données sur le phénotype, les fonctions et la localisation de différents types cellulaires afin d'évaluer leurs interactions directes et fonctionnelles. **Il est donc essentiel d'analyser simultanément un nombre important de paramètres biologiques (clusters de différenciation, cytokines, facteurs de transcription).** Ainsi, en utilisant des coupes tissulaires en paraffine de patients atteints de LLC à différents stades de la maladie ou de contrôles non LLC (biopsies du Service d'Anatomopathologie de l'Hôpital Avicenne), le projet proposé consiste en une approche d'imagerie de masse avec des anticorps ou sondes conjugués à des isotopes métalliques stables détectés par spectrométrie de masse. Cette technologie permet d'analyser simultanément de nombreux paramètres cellulaires et de caractériser le réseau spatial des populations d'intérêt.

L'analyse avec le système Hyperion (Plateforme CySP, Sorbonne Université) permettra de détecter simultanément les protéines et les ARNm spécifiques des cellules. L'expression de l'ARNm de différentes interleukines et chimiokines sera analysée avec le système d'hybridation *in situ* RNAscope qui permet la visualisation directe de l'expression génique dans les tissus et ce à l'échelle de la cellule unique. Les images seront reconstituées et étudiées à l'aide de logiciels spécifiques. Des analyses non supervisées permettront à la fois la caractérisation d'éventuels nouveaux sous-types cellulaires et une corrélation entre la déstructuration des réseaux cellulaires et l'expression augmentée de certains facteurs immnunorégulateurs.

2. Caractérisation fonctionnelle des médiateurs du dialogue bidirectionnel B/NLC

Nous visons à caractériser les effecteurs à la fois membranaires et solubles impliqués dans le dialogue bidirectionnel entre les cellules B de LLC et les NLC dans un modèle *ex vivo* dans lequel les NLCs peuvent se différencier au cours d'une culture de PBMC purifiés à partir d'échantillons sanguins de patients LLC (traités ou non, provenant du service d'hématologie biologique à l'Hôpital Avicenne) ou de donneurs sains (EFS Hôpital Saint Louis).

a) L'implication des NLC dans la survie des cellules LLC est documentée mais les mécanismes responsables de la différenciation de ces cellules restent méconnus. Nous avons observé que les NLCs sont générées ou pas et de manière différentielle parmi les échantillons de patients LLC. **Nous souhaitons décrypter les mécanismes responsables de la différenciation hétérogène des NLCs.**

=> Nous comparerons l'expression de facteurs critiques de la polarisation de type M2, permissive à la tumeur, au cours de cultures de PBMC préalablement choisis pour leur capacité ou non à générer des NLCs. L'expression sera analysée au niveau de la cellule unique par une approche de cytométrie (RNA Prime Flow, Plateforme TisCell13) et par BioPlex Multiplex Immunoassay (USPN) avec les surnageants de culture.

b) Nous avons démontré le rôle du CCL21 exprimé à la membrane des NLCs dans la capture des cellules B. D'autres molécules semblent également impliquées dans cette interaction. De plus, une réduction des interactions cellules B/NLC est observée lors d'un traitement avec l'Ibrutinib, un inhibiteur thérapeutique de la kinase Btk. **Nous caractériserons les différentes paires ligand/récepteur responsables des interactions cellulaires directes et les acteurs solubles intervenant dans le dialogue bidirectionnel B/NLCs.**

=> Les interactions spécifiques B/NLC seront caractérisées après 14 jours de coculture par cytométrie en image et microscopie confocale (plateforme IMAG'IC, Institut Cochin). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques confirmera leur implication fonctionnelle.

Cette approche offre un bon modèle d'évaluation *ex vivo* de l'impact d'inhibiteurs thérapeutiques sur ce dialogue pour cibler le microenvironnement à la fois au niveau des interactions ligand/récepteur directes et des facteurs solubles.