HAL
open science

Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans le dialogue entre les cellules B tumorales de Leucémie Lymphoïde Chronique et leur microenvironnement

Imane Mihoub

To cite this version:

Imane Mihoub. Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans le dialogue entre les cellules B tumorales de Leucémie Lymphoïde Chronique et leur microenvironnement. Santé. Université Paris-Nord - Paris XIII, 2023. Français. NNT : 2023PA131008 . tel-03948773

HAL Id: tel-03948773

https://sorbonne-paris-nord.hal.science/tel-03948773v1

Submitted on 25 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS XIII –SORBONNE PARIS NORD

École doctorale Sciences, Technologies, Santé - Galilée

Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans le dialogue entre les cellules B tumorales de Leucémie Lymphoïde Chronique et leur microenvironnement

---

THÈSE DE DOCTORAT
présentée par

Imane MIHOUB

Laboratoire INSERM U978 – Université Sorbonne Paris Nord
« Signalisation, Microenvironnement et Hémopathies Lymphoïdes B »

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE- BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

soutenue le Jeudi 5 janvier 2023 devant le jury d'examen constitué de :

Pr Angela SUTTON	(Université Sorbonne Paris Nord)	Présidente du jury
Pr Virginie GANDEMER	(Université de Rennes)	Rapporteur
Pr Pierre BOBE	(Université Paris Sud)	Rapporteur
Dr Frédéric MOURCIN	(Université de Rennes)	Examinateur
Pr Dominique LEDOUX	(Université Sorbonne Paris Nord)	Directeur de thèse
Dr Laura GARDANO	(Université Sorbonne Paris Nord)	Co-encadrante de thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Pr Angela SUTTON, merci de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.

Pr Virginie GANDEMER et **Pr Pierre BOBE**, merci d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et d'avoir consacré autant de temps à mon manuscrit.

Dr Frédéric MOURCIN, merci d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse et d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit.

A mon directeur de thèse **Pr Dominique LEDOUX** et à mon encadrante **Dr Laura GARDANO**. Vous m'avez donné le privilège de superviser, de diriger et de juger ce travail. Merci de votre disponibilité, pédagogie, votre esprit critique, rien de tout cela n'aurait été possible sans vous. C'était un plaisir de travailler avec vous. Je vous suis profondément reconnaissante.

A la directrice du laboratoire **Docteur Nadine Varin-Blank,** merci de m'avoir accepté dans son laboratoire.

A **Stéphanie**, c'était un plaisir de partager le bureau avec une personne merveilleuse comme toi, calme et attentionné. Merci de m'avoir supporté tous les jours et pour tes cafés et tes précieux conseils orthographiques.

Merci à **Koceila**, **Feriel**, **Soulaymane**, **Laure**, **Antonin**, **Jordan** de m'avoir supporté tous les jours. Merci pour les débats interminables et les pauses café, j'ai appris énormément de choses à votre contact. Je vous aime, vous êtes les meilleurs.

Merci à tous les **membres du labo** et plus particulièrement à Christine, Denis et Betty pour vos conseils pendant les réunions labo.

A **ma famille**, merci pour votre soutien sans faille depuis le tout début, merci pour vos prières pour votre patience et votre écoute à mes problèmes de sciences surtout. Les études m'ont gardé loin de vous mais vous êtes toujours avec moi. Je vous aime.

Table des matières

Introduction 9
I. La leucémie lymphoïde chronique 9
1. Généralités et physiopathologie de la LLC 9
2. Rôle du microenvironnement tumoral dans la LLC 10
3. Les voies de signalisations impliquées dans la réponse au microenvironnement 10
3.1 Voie du récepteur des cellules B (BCR) 10
3.2 CD40/CD40L : 13
3.3 Toll-likereceptor TLR 14
3.4 La voie des chimiokines : la signalisation CXCR4/CXCL12 14
3.5 La voie NOTCH 15
II. β-caténine 17
1. Généralités 17
2. Structure de la β-caténine 17
3. les mécanismes de régulation des fonctions de la β-caténine 19
3.1 Régulation de l'adhérence cellulaire 19
3.2 La voie de signalisation Wnt/β-caténine 20
3.3 Translocation nucléaire de la β-caténine 22
4. La β-caténine et le cancer 22
III. La tyrosine kinase BTK 24
1. Généralités 24
2. Structure de BTK 24
3. BTK et signalisation 25
3.1 BTK dans la signalisation du BCR 25
3.2 BTK dans la voie des TLR 27
3.3 BTK et les récepteurs aux chimiokines 28
4. BTK dans la LLC 29
VI. Plasticité du microenvironnement et la leucémie lymphoïde chronique 30
1. Généralités 30
2. Composante cellulaire du microenvironnement tumoral dans la LLC 31
2.1 Les cellules stromales de la moelle osseuse : les cellules MSC 31
2.1.1 Dialogue entre les MSC et les cellules LLC 31
2.1.2 La fonction pro-tumorigène des MSC 33
2.2 Les cellules « Nurses-like » 34

2.2.1 Les macrophages de type 1 et de type 2 34
2.2.2 Les macrophages associés aux tumeurs (TAM) 35
2.2.3 Les TAM dans la leucémie lymphoïde chronique : les cellules « Nurse-like » 36
2.2.4 Recrutement des monocytes aux sites de prolifération et différenciation en NLC 36
2.2.5 Les NLC dans la pathogénèse de la LLC 36
2.3 Les cellules dendritiques folliculaires, FDC 38
2.3.1 Caractéristiques phénotypiques des FDC 39
2.3.2 L'interaction FDC et cellules LLC 40
2.4 Les cellules réticulaires fibroblastiques (FRC) 41
Résultats 44
Partie I : Identification de l'axe BTK/β-caténine dans le dialogue entre les cellules B tumorales et les cellules stromales 44
Partie II : Reprogrammation des cellules stromales du microenvironnement par les cellules B tumorales de LLC 80
Discussion 89
Bibliographie 95
Annexe 105

Liste des abréviations

α-SMA : Actine du muscle lisse alpha

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique Complémentaire

AKT : Protéine kinase B

APC : Adenomatous Polyposis Coli protein

ARN : Acide RiboNucléique

AXIN1 : L'axine1

APRIL : A proliferating-inducing ligand

BLNK : B-cell Linker

BRAF : B-Raf sérine/thréonine kinase

BAFF : B cell activating factor

Bax : Bcl-2 associated X protein

Bcl2 : B-cell lymphoma 2

Bcl-xl : B-cell lymphoma extra-large

BCMA : B cells maturation antigen

BCR : B-cell receptor

BMSC : Bone marrow stromal cell

BTK : Bruton's tyrosine kinase

Cbl :Casitas B-lineage Lymphoma

Cbl-B : Ubiquitine Ligase

CD : Cluster de Différenciation

CD40L : CD40 Ligand

CDK : Cyclin Dependent Kinase

CK1 : Caseine kinase 1

c-MET : protéine tyrosine kinase Met

c-Myc : Proto-oncogène codé par le gène Myc

CRC : le carcinome colorectal

CSL : Cellules Souches Leucémique

CTD : Domaine C-Terminal

CTNNB1 : le gène qui code la protéine β-caténine

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

CXCL12 : Chemokine (C-X-C motif) ligand 12

CXCL13 : (C-X-C motif) ligand 13

CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4

CXCR5 : C-X-C chemokine receptor type 5

CCL21 : Chemokine (C-C motif) ligand 21

CCL3 : Chemokine (C-C motif) ligand 3

CCL4 : Chemokine (C-C motif) ligand 4

CCR7 : (C-C motif) receptor 7

CD : Cluster de différenciation

DAG : Diacylglycérol

DH domaine : Dbl homology

Domaine ARM : domaine Armadillo

Domaine CH : Calponin Homology

Domaine PH : Pleckstrin homology

DVL : Protéine Dishevelled

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

ERK : Extracellular Regulated Kinase

Fc : Fragment cristallisable

Foxo : Forkhead Gox Class O

FDC : Cellules dendritiques folliculaire

FRC : Cellule réticulaire fibroblastiques

GDP : Guanosine DiPhosphate

GEF : Guanine Exchange Factor

GSK3 : Glycogen Synthase kinase 3 β

GTP : Guanosine TriPhosphate

HIF1α : Hypoxia Induced Factor 1 alpha

Ig : Immunoglobuline

IkBα e : Inhibitory kappa B

IKK : IκB kinase

IP3 : Inositol TriPhosphate

ITAMs : Immunoreceptor tyrosine-based Activation Motifs

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase

IFNδ : Interféron gamma

IL : Interleukine

JNK : c-Jun N terminal Kinase

LEF : Lymphoid Enhancer binding Factor

LF : Lymphome Folliculaire

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

LRP5/6 : Low Density Lipoprotrin receptor related protein 5/6

LT : Lymphocyte T

MCL : Lymphome du Manteau

M1 : Macrophage de type 1

M2 : Macrophage de type 2

MAdCAM1 : mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1

Mcl-1 : Myeloid cell leukemia 1

MSC : cellules stromales mésenchymateuses

MAP kinases : Mitogen-Activated Protein

MMP : Matrix MetalloProteinase

mRNA : Messenger RiboNucleic Acid

mTOR : mammalian Target of Rapamycin

NFAT : Nuclear Factor of Activated T cell

NF-κB : Nuclear Factor kappa B

NLS : Nuclear Localization Signal

Notch1 ICN1 : Intracellular active fragment of Notch1

Notch1 : Gène humain codant pour un récepteur transmembranaire

NTD : Domaine N-Terminal

p53 : Proteine impliquée dans l'apoptose

PH domaine : Pleckstrin Homology

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol BiPhosphate

PKC : Proteine Kinase C

PKD : Protéine Kinase D

PKT : protéine-tyrosine kinases

PLCγ : Phospholipase C gamma

PP2A : Protéine Phosphatase 2

PD1 : programmed cell death 1

PDL1 : programmed cell death 1 ligand

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

Rac1 : Protéine G, codé par le gène Rac1

RANKL : Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand

Rap GEF5 : gène codant pour la protéine d'échange nucléotidique 5 de la guanine rap

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

RT-PCR : Retro transcriptase polymerase chain reaction

SDF1/ CXCL12 : Stromal Cell-Derived Factor 1

SFKs : Src-family protein tyrosine kinases

SH : Scr Homology

Syk : Spleen Tyrosine Kinase

TCF : T Cell Factor

TCR : T Cell Receptor

TACI : Transmembrane activator and CAML interactor

TAM : macrophages associés aux tumeurs

TCR : T cell receptor

TGF-β : Transforming growth factor

Th : Lymphocytes T helper

TLR : Toll like receptor

TNF-α : Tumor necrosis factor alpha

TP53: Tumor protein 53

Vav1 : Proto-oncogène codé par le gène Vav

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VCAM1 : Vascular cell adhesion molecule 1

VLA-4 : Very late antigen-4

ZAP70 : Zeta-chain-associated protein of 70 kDa

β-TrCP : β-tranducin repeats-Containing Protein

Introduction

I. La leucémie lymphoïde chronique

1. Généralités et physiopathologie de la LLC

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la leucémie de l'adulte la plus courante dans le monde occidental, représentant 30 à 40 % de l'ensemble des leucémies[1]. Elle se caractérise par l'accumulation progressive de lymphocytes B matures CD19+/CD5+/CD23+ dans le sang périphérique, la moelle osseuse et les tissus lymphoïdes qui résulte d'un défaut d'apoptose[2,3] et d'un avantage prolifératif car même si la majorité des cellules sont dans un état quiescent, une fraction des cellules sont capables de proliférer dans les organes lymphoïdes[4 5]. En effet, une étude effectuée chez les patients ingérant de l'eau déterrée indiquent que les ganglions lymphatiques sont les sites préférentiels de prolifération des cellules tumorales caractérisés par un renouvellement du clone cellulaire tumoral d'environ 0,1 à 1% par jour[6].

Une autre caractéristique de la LLC est son hétérogénéité clinique. Certains patients présentent une maladie indolente et non évolutive et d'autres patients ont une maladie agressive qui nécessite un traitement précoce. Ce sous-groupe de patients présentent un risque de développer des lymphomes non hodgkinien agressifs de haut grade, généralement des lymphomes diffus à grandes cellules B, connu sous le nom de syndrome de Richter (RS) qui est le stade terminal de la progression de la LLC[1,7,8]. Cette hétérogénéité peut être prédite par un ensemble de marqueurs pronostiques qui sont utilisés dans la pratique clinique pour améliorer la prise en charge des patients, évaluer la nécessité d'une thérapie et choisir la meilleure option thérapeutique[1,9]. Parmi ces facteurs pronostiques, les altérations du gène TP53 prédisent une progression agressive de la maladie et une chimio-immunothérapie réfractaire[10,11]. Le statut mutationnel du gène IGHV (chaînes lourdes des immunoglobulines) constitue également un marqueur pronostique car les patients dont les cellules ont un gène IGHV non muté présentent une évolution de la maladie plus agressive que ceux présentant un gène IGHV muté. D'autres paramètres pronostiques pertinents incluent l'expression de certaines molécules, en particulier la protéine kinase ZAP-70, la protéine de surface CD49d et la surexpression de CD38 et de la β2-microglobuline[10].

Il existe d'autres aberrations chromosomiques qui ont été associées à une survie diminuée des patients, telles que la trisomie 12, les délétions 11q et 17p et des mutations ou des délétions dans des gènes tels que le gène codant pour le ligand NOTCH1 et la protéine adaptatrice MYD88 (protéine adaptatrice impliquée dans la signalisation des toll-like recepteurs)[11,12,13].

2. Rôle du microenvironnement tumoral dans la LLC

L'importance du microenvironnement la moelle osseuse et des organes lymphoïdes secondaires sur la survie des cellules LLC est soutenue par l'observation que les cellules LLC ont une survie prolongée *in vivo* mais subissent rapidement une apoptose spontanée lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*[14]. En revanche, la co-culture des cellules leucémiques avec des cellules stromales de la moelle osseuse prolonge leur durée de vie. Cela suggère que les interactions entre les cellules LLC et leur microenvironnement présent dans la moelle et les tissus lymphatiques, où les cellules LLC sont en contact étroit avec des populations cellulaires variées (cellules stromales mésenchymateuses, cellules "nurse-like", cellules dendritiques folliculaires, lymphocytes T, cellules endothéliales,.....) sont essentielles à la survie et la prolifération cellulaire du clone tumoral associées à la progression de la maladie[15].

Diverses études ont mis en évidence l'activation de plusieurs voies de signalisation en réponse à l'interaction des cellules LLC avec leur microenvironnement tumoral. Les plus importantes d'entre elles sont : la voie du récepteur des cellules B (BCR), la voie induite par le récepteur CD40 et son ligand (CD40/CD40L), la voie du récepteur transmembranaire NOTCH, la voie induite par les récepteurs Toll-like et enfin les voies induites par les récepteurs aux chimiokines[16,17,18].

3. Les voies de signalisations impliquées dans la réponse au microenvironnement

3.1 Voie du récepteur des cellules B (BCR)

De nombreuses études ont impliqué le BCR et ses effecteurs de signalisation dans la survie et la prolifération des cellules LLC et dans la pathogenèse de la maladie[19,18] comme le montre par exemple la forte association entre le mauvais pronostic et le statut mutationnel IGHV[20] ou l'expression de la protéine ZAP-70[21].

L'activation du BCR peut être dépendante de l'antigène, indépendante de l'antigène ou autonome (tonique). Dans cellules LLC, la liaison de l'antigène au BCR déclenche une cascade de signalisation en aval, dont les intermédiaires de signalisation sont similaires à ceux des lymphocytes B normaux. Brièvement, le BCR est un complexe transmembranaire composé de deux éléments : une immunoglobuline de surface de type IgM ou IgD associée à la membrane qui lie l'antigène et un second élément transmembranaire de transduction du signal constituée des protéines Igα (CD79a) et Igβ (CD79b)[22]. La partie intracellulaire des hétérodimères CD79 contiennent des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs). La

signalisation du BCR nécessite le pontage d'au moins 2 récepteurs BCR (clustering). Ceci induit la phosphorylation des motifs ITAM des sous-unités Igα et Igβ par la kinase Lyn qui permet le recrutement de la kinase Syk sur les motifs ITAM phosphorylé suivi de sa phosphorylation. A son tour SYK recrute et phosphoryle l'adaptateur BLNK (B-cell linker protein) qui permet l'assemblage d'un complexe de signalisation appelé "signalosome", comprenant la kinase BTK (Bruton's tyrosine kinase) et la phospholipase Cγ2 (PLCγ2)[23].

Les protéines BTK, PLCγ2 ainsi que la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) sont des composants essentiels de la voie de signalisation du BCR. Après leur activation, Syk et Lyn peuvent phosphoryler le corécepteur CD19 et l'adaptateur BCAP (Phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1). Le CD19 et BCAP phosphorylés recrutent alors la PI3K à la membrane plasmique entraînant son activation. De son côté, BLNK phosphorylé par Syk recrute BTK et PLCγ2 et cette dernière est phosphorylée/activée par BTK. Plusieurs voies/acteurs de signalisation peuvent ensuite être activés en aval telles que la voie Ras/Raf/MEK/ERK, la production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate (IP3) permettant l'activation des PKC et des effecteurs dépendants du calcium, l'activation des protéines kinases AKT/mTOR. L'ensemble de ces voies aboutissent à l'activation de divers facteurs de transcription tels que NF-kB et NFAT[24].

Par ailleurs, ces voies de signalisation sont sous le contrôle de régulateurs négatifs tels que le CD22 et le récepteur FcγIIB des immunoglobulines. Ces protéines membranaires activées par phosphorylation peuvent recruter, via leurs motifs inhibiteurs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs), la phosphatase SHP-1 (Src homology tyrosine phosphatase-1) qui à son tour va déphosphoryler Lyn, Syk, BTK et BLNK pour inhiber leur activité[25]. La phosphatase SHIP (SH2-domain containing inositol 5-phosphatases 1/2) peut également se fixer sur des motifs ITIM du récepteur FcγIIB et hydrolyser le PIP3, inhibant ainsi le recrutement et l'activation de PLC-γ2, BTK et AKT à la membrane[26].

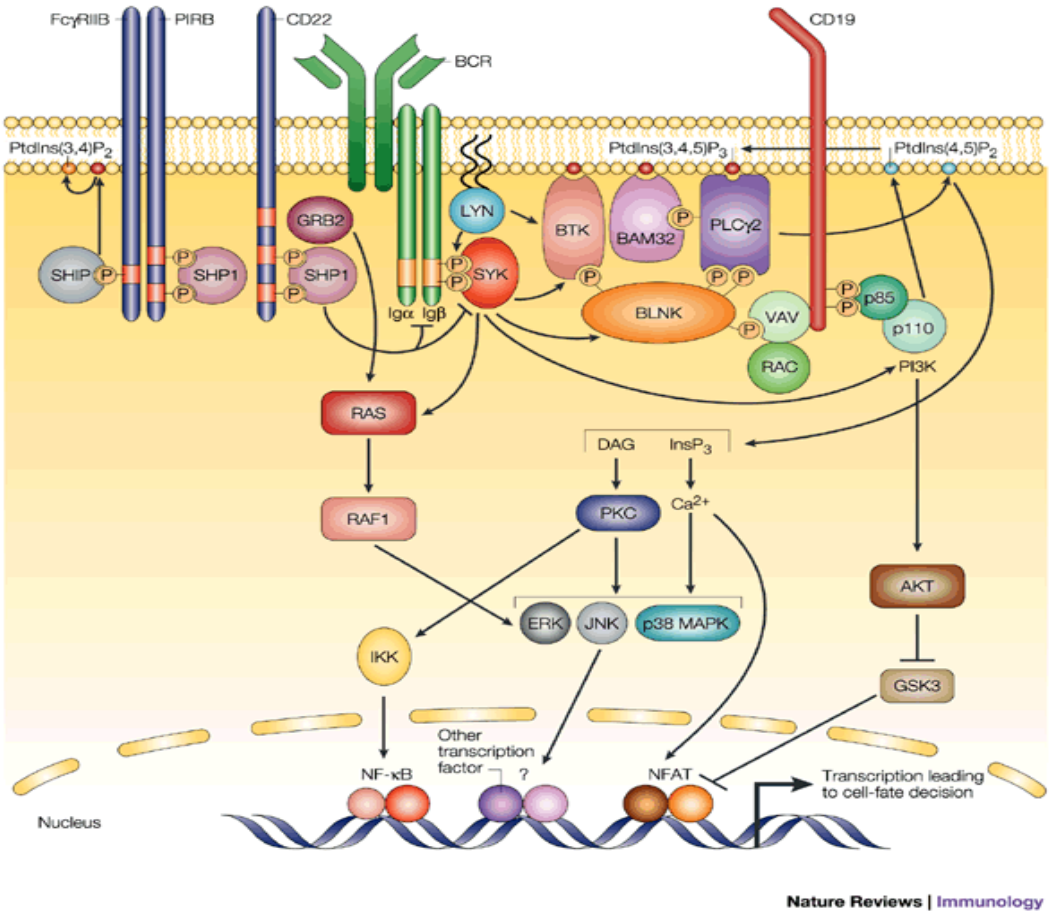


Figure 1 : La voie de signalisation du BCR, *Le déclenchement du BCR par un antigène induit l'activation de différentes kinases, dont LYN et SYK, qui transmettent le signal à d'autres effecteurs précoces de la signalisation, dont la kinase BTK. Par l'intermédiaire de l'adaptateur BLNK, la BTK active la PLCγ2, la signalisation calcique (Ca2+), les PKC, la kinase ERK et les facteurs de transcription nucléaire (TF). Le corécepteur positif CD19 contribue à l'activation de la voie PI3K-AKT et à l'induction de la survie. La réponse de signalisation est régulée par des corécepteurs négatifs (par exemple CD22, CD5) et des phosphatases, notamment SHP1 et SHIP1/2.*[27]

La signalisation du BCR décrite ci-dessus est activée de manière constitutive ou aberrante dans les cellules LLC. Il a été montré que LYN et SYK, qui sont activées immédiatement en aval du BCR, présentent le plus souvent une activité constitutive dans les cellules LLC non stimulées. Cette activation est également observée au cours d'une culture cellulaire prolongée, ce qui suggère une signalisation tonique du BCR indépendante des antigènes externes. De plus, une activité basale élevée a été observée pour d'autres molécules de signalisation situées plus en aval de la voie BCR, telles que les protéines ZAP70, PI3K, BTK, PKCβ et ERK ainsi que les facteurs de transcription NF-κB et NF-AT. Il est important de noter que l'inhibition ou le « knock-down » de plusieurs de ces molécules de signalisation induit l'apoptose des cellules LLC non stimulées.

La signalisation du BCR joue un rôle important dans l'interaction des cellules LLC avec leur microenvironnement en induisant la sécrétion des chimiokines CCL3 et CCL4 (C-C motif ligand 3 et 4) par les cellules tumorales à la suite de leur stimulation. En effet, CCL3 et CCL4 permettent le recrutement des lymphocytes T et les monocytes/macrophages vers la niche tumorale pour interagir avec les cellules LLC et soutenir leur survie/prolifération[28]. Des taux plasmatiques élevés de CCL3 et CCL4 ont par ailleurs été observés chez les patients atteints de LLC et sont associés à un pronostique défavorable[29]. La signalisation BCR est également impliquée dans la migration et l'orientation des cellules LLC vers les tissus lymphoïdes en activant la voie CXCR4-CXCL12 (voir paragraphe 3.4).

3.2 CD40/CD40L :

L'interaction de la molécule CD40 exprimée à la surface des cellules LLC avec son ligand CD40L (CD154), principalement exprimée sur les cellules T, joue un rôle important dans la biologie des cellules LLC. Des études indiquent que l'interaction entre les cellules B et T *via* le couple CD40/CD40L contribuent aux processus par lesquels les cellules LLC échappent à l'apoptose *in vivo*[30].

Le CD40 est un récepteur transmembranaire membre de la superfamille des récepteurs au TNF. L'activation du CD40 entraîne une signalisation en aval qui est à la fois dépendante et indépendante de la protéine adaptatrice TRAF (TNF-receptor associated factor)[31] qui joue un rôle dans de nombreuses voies clés, notamment les voies de signalisation PI3K/Akt, ERK1/2-MAPK et JAK/STAT et la régulation des voies NF-κB canonique et non canonique[32]. La signalisation induite par le CD40 régule l'apoptose en modulant l'expression des protéines de pro-survie telles que BCL-xl, Mcl1 et survivin[33,34].

Dans les cellules LLC, la stimulation du CD40 *in vitro* induit l'activation de voies de pro-survie dépendantes notamment de NF-κB et une augmentation de l'expression de BCL-xl. Par ailleurs, une autre étude a montré que l'activation CD40/CD40L dans les cellules LLC est suffisante pour stimuler la prolifération, prévenir l'apoptose et réduire la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques[35]

3.3 Toll-likereceptor TLR

Les récepteurs Toll-like (TLR) constitue une famille de récepteurs qui partagent des similitudes avec la protéine Toll de la drosophile et sont structurellement similaires au récepteur de l'interleukine-1 (IL-1R)[36]. Les TLR font partie du système immunitaire inné chez l'homme et répondent à des molécules spécifiques présentes dans divers micro-organismes, y compris les bactéries[37,38].

Le schéma d'expression des TLR est assez spécifique et unique pour chaque type cellulaire[39]. Dans les cellules B humaines normales, les TLR1, TLR2, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 et TLR10 sont exprimés de manière prédominante. Cette expression est régulée positivement lorsque la voie du BCR des cellules B naïves est activée, ce qui suggère une synergie entre le BCR et le TLR conduisant à la prolifération et à la différenciation des cellules B[40].

L'activation des TLR se traduit par le recrutement de deux adaptateurs principaux : MyD88, qui est recruté avec Mal (MyD88 adaptor-like) également appelé TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein), et TRIF (Toll-receptor-associated activator of interferon). Les voies de signalisation en aval des complexes TLR-adaptateurs entraînent l'activation des facteurs de transcription NF-κB, AP-1 ou IRF15 et IRF7 qui vont induire la transcription de cytokines inflammatoires, d'interférons de type I ou II et de chimiokines[41,42].

Le TLR-7 et le TLR-9 ont tous deux été impliqués dans la pathogenèse de la LLC[43] et il a été montré que la stimulation du TLR9 dans les cellules LLC diminue la sensibilité à la fludarabine *in vitro* (un analogue de base créant des dommages de l'ADN et utilisé comme traitement chez les patients LLC en stade avancé)[44]. De plus, la stimulation des cellules LLC par des oligonucléotides CpG spécifiques déclenchent les voies de signalisation en aval du TLR-9, ce qui entraîne la prolifération des cellules LLC *in vitro*[45]. L'activation des voies TLR peut également augmenter la sensibilité des cellules LLC à leur destruction par les cellules T cytotoxiques. De ce fait, des agonistes des TLR ont été proposés comme agents thérapeutiques potentiels dans la LLC[46].

3.4 La voie des chimiokines : la signalisation CXCR4/CXCL12

La protéine CXCR4 (chemokine C-X-C motif receptor 4, CD184) est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G (RCPG). Il est exprimé par différents types cellulaires dont les cellules B normales. Le CXCR4 est surexprimé dans divers cancers, notamment la LLC, la leucémie myéloïde aiguë (AML), le myélome multiple, les lymphomes et les tumeurs solides. Le CXCL12 (chemokine C-X-C motif ligand 12), anciennement dénommé

SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), est le seul ligand connu du CXCR4 et il fortement exprimé dans les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, le foie et les poumons. L'axe CXCR4-CXCL12 est connu pour jouer un rôle majeur dans l'adhésion, la migration et la rétention des cellules B dans la moelle osseuse[47]. Ce même rôle est retrouvé dans le cas de la LLC. En effet, l'attraction des cellules LLC vers les microenvironnements tissulaires implique l'activation de récepteurs de chimiokines tels que CXCR4 qui jouent un rôle important dans la migration des cellules B malignes vers les ganglions lymphatiques où le CXCL12 est fortement exprimé. Ceci conduit à la rétention des cellules dans un microenvironnement favorable qui fournit des signaux de prolifération et contribue à la résistance aux médicaments[48].

Dans la LLC, la surexpression du CXCR4 est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients. En tant que RCPG, l'engagement du CXCR4 active la signalisation dépendante des grandes protéines G qui déclenchent un flux intracytoplasmique de Ca2+ et une activation d'effecteurs en aval tels que Ras et PI3Kδ, aboutissant à la survie et à la migration des cellules leucémiques. Il a été montré que la signalisation CXCR4-CXCL12 permet l'activation des voies impliquant BTK et PLCγ2. En effet, il a été constaté que le CXCL12 était capable d'activer BTK dans lymphocytes B normaux comme dans les cellules LLC. Cette activation implique la kinase JAK2 qui phosphoryle la BTK. L'interaction JAK2-BTK favorise l'adhérence cellulaire des cellules LLC en permettant l'activation des intégrines et plus particulièrement VLA-4 qui est considérée comme un marqueur de mauvais pronostic dans la LLC[49].

3.5 La voie NOTCH

Les récepteurs NOTCH forment une famille de protéines transmembranaires exprimées par les cellules de différents tissus qui fonctionnent à la fois comme récepteurs de surface cellulaire et comme régulateurs de transcription. Ils jouent un rôle essentiel dans les processus de différenciation et de prolifération. De ce fait, des altérations de la signalisation NOTCH sont observées dans différentes maladies, y compris les hémopathies et les tumeurs solides.

Chez l'homme, il existe quatre récepteurs NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 et NOTCH4[50]. Ces récepteurs transmembranaires, présents à la surface des cellules dites « receveuses du signal », se lient à des ligands qui sont des protéines transmembranaires exprimées à la surface de cellules voisines dites cellules « donneuses du signal ». L'activation de la voie NOTCH dans les cellules se fait donc à la suite d'un contact cellule-cellule. La liaison récepteur-ligand entraîne en aval de NOTCH, l'activation de protéases (ADAM17, γ-secrétase) qui libèrent par protéolyse la partie intracellulaire du récepteur puis sa translocation nucléaire. Ce dernier fonctionne comme un cofacteur de transcription stimulant l'expression de plusieurs gènes[51].

Dans la LLC, NOTCH1 est le gène retrouvé le plus fréquemment muté au moment du diagnostic et sa fréquence augmente avec la progression de la maladie. La majorité des mutations de NOTCH1 augmentent la stabilité de sa partie intracellulaire [52]. En revanche, la signalisation NOTCH1 est active dans les cellules leucémiques chez 50% de patients LLC malgré l'absence de mutation. Cela serait dû à l'expression des ligands de NOTCH par les cellules stromales présentent dans le microenvironnement[53,54]. Par ailleurs il a été montré que les cellules LLC induisent spécifiquement l'activation de NOTCH2 dans les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) qui, en retour, active la signalisation Wnt canonique dans les cellules LLC (voir partie I.3) et favorise la survie des cellules tumorales. De plus, l'inhibition de la signalisation de NOTCH2 diminue la survie des cellules LLC induite par les cellules stromales.[55]

II. β-caténine

1. Généralités

La β-caténine, l'homologue de la protéine Armadillo chez la drosophile, est une protéine multifonctionnelle codée par le gène CTNNB1 chez l'homme et qui est exprimée dans la plupart des cellules, tant chez l'embryon que chez l'adulte[56]. En tant que membre de la famille des protéines caténines, la β-caténine joue un rôle important dans la régulation et la coordination de l'adhérence intercellulaire, en facilitant la liaison des cadhérines au cytosquelette d'actine. D'autre part, la β-caténine est aussi impliquée dans plusieurs voies de transduction du signal, telles que la voie Wnt, TGFβ, AKT dans lesquelles elle se comporte comme un cofacteur transcriptionnel pour la régulation positive et négative de nombreux gènes[57]. Toutes les fonctions de la β-caténine sont essentielles à la régulation de nombreux processus, tel que le développement embryonnaire, la prolifération ou la différenciation des cellules souches[58]

La distribution cellulaire de la β-caténine est liée à ses multiples fonctions et elle peut être membranaire, cytoplasmique et nucléaire[59]. Une fraction de la β-caténine nouvellement synthétisée interagit avec les protéines cadhérines, en particulier la E-cadhérine, participant ainsi aux jonctions intercellulaires au niveau de la membrane cellulaire (pool membranaire). En revanche, en absence de signaux extracellulaires, la β-caténine cytoplasmique (pool cytoplasmique) est séquestrée dans un complexe de destruction qui la dirige vers le protéasome. L'activation de certaines voies de signalisation, dont la voie Wnt, résultent en l'inhibition du complexe de dégradation conduisant à la stabilisation de la β-caténine et à sa translocation dans le noyau (pool nucléaire)[58].

L'équilibre entre les activités de la β-caténine, notamment l'adhésion et la transcription, est régulé par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation et l'ubiquitination. Ces modifications ont également un impact sur la localisation subcellulaire de la β-caténine, sa stabilité et son activité transcriptionnelle en tant qu'activateur ou inhibiteur[60].

2. Structure de la β-caténine

La β-caténine appartient à la famille des protéines Armadillo qui sont caractérisées par un domaine central constitué d'un motif répétitif de 42 acides aminés appelé "Armadillo repeat motif" (ARM). Ces répétitions ont été initialement identifiées dans l'homologue de la β-caténine chez la drosophile[61]

Dans la β-caténine humaine, le domaine central est composé de 12 répétitions du motif ARM (résidus 141-664), situées entre un domaine N-terminal non structuré (NTD, résidus 1-140) et un domaine C-terminal (CTD, résidus 665-781). Ce domaine CTD se structure sous la forme d'un long sillon chargé positivement qui s'étend sur l'ensemble des 12 répétitions ARM super-hélicoïdales[62]. Il est intéressant de noter que ces charges positives sont essentielles pour la liaison de la β-caténine à un grand nombre de ses partenaires chargés négativement, telles que les cadhérines, les composants de la machinerie de dégradation Axin et APC, ou les facteurs de liaison à l'ADN TCF (facteur de transcription des cellules T). Le domaine NTD contient des sites consensus de phosphorylation par la caséine kinase 1 (CK-1) et la glycogène synthase kinase-3β (GSK-3β) qui sont essentielles pour réguler la stabilisation de la β-caténine, tandis que le domaine CTD sert de région d'interaction avec les coactivateurs ou corépresseurs transcriptionnels[62] (figure 2).

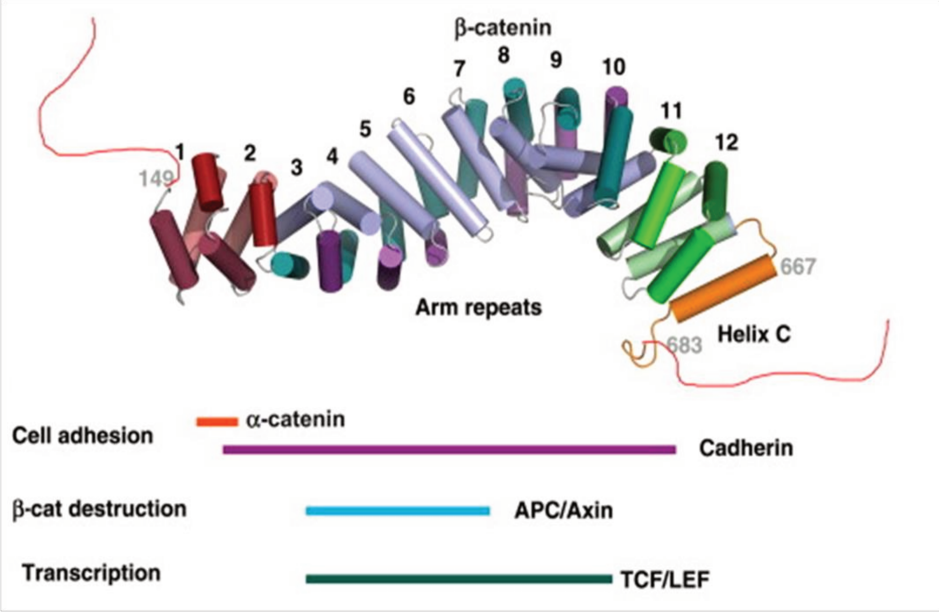


Figure 2 : Structure et partenaires de liaison de la β-caténine*. La β-caténine possède un domaine central composé de 12 répétitions armadillo, bordées par un domaine amino terminal (NTD) et un domaine carboxyl terminal comprenant une hélice C (CTD). E-cadhérine et la α-caténine lient la β-caténine au niveau des jonctions d'adhérences. L'APC et l'AXIN lient de la β-caténine au complexe de destruction. Le facteur de transcription TCF/LEF et lie la β-caténine au niveau du complexe de transcription.* [63]

3. les mécanismes de régulation des fonctions de la β-caténine

3.1 Régulation de l'adhérence cellulaire

La β-caténine participe à la régulation de l'adhérence cellulaire en reliant le domaine cytoplasmique des cadhérines aux filaments d'actine par l'intermédiaire d'une autre protéine de la famille des caténines, l'α-caténine. Il a été démontré que la β-caténine se lie à aux cadhérines dès son apparition à la membrane du réticulum endoplasmique (RE), empêchant sa dégradation par le protéasome[64]

Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires qui assurent l'adhérence intercellulaire selon un mécanisme dépendant du calcium. Selon le type cellulaire dans lequel elles sont exprimées, il est possible de distinguer 6 catégories de cadhérines : la E-cadhérine (épithéliale), N-cadhérine (neutre), VE-cadhérine (vasculaire-endothéliale), P-cadhérine (placentaire), R-cadhérine (rétinienne) et K-cadhérine (rénale)[65]. La E-cadhérine est le principal médiateur de l'adhésion intercellulaire dans les épithéliums. La région extracellulaire de la E-cadhérine se lie aux autres cadhérines présentes sur les cellules adjacentes tandis que sa région intracellulaire interagit avec la β caténine et d'autres protéines régulatrices[66]. La α-caténine se lie directement à la région N-terminale de la β-caténine et relie ainsi le complexe E-cadhérine/β-caténine aux filaments d'actine, favorisant ainsi l'assemblage et la stabilisation des protéines au niveau des jonctions d'adhérence[67].

La formation du complexe E-cadhérine/β-caténine/α-caténine est régulée par les phosphorylations de la β-caténine sur la tyrosine 142 (Y142), située dans le premier motif ARM, et sur la tyrosine 654 (Y654) située dans le dernier motif ARM. La phosphorylation de la β-caténine sur le résidu Y142 par les tyrosines kinases Fer, Fen et c-Met entraîne une perte de sa liaison à l'α-caténine et favorise la liaison de la β-caténine au transporteur nucléaire Bcl9 (B-cell CLL/lymphoma 9)[68]. D'autre part, la phosphorylation de la β-caténine sur le résidu Y654 par le récepteur de l'EGF ou la kinase Src inhibe son interaction avec la E-cadhérine. Cette phosphorylation favorise la translocation nucléaire de la β-caténine et augmente son affinité pour de multiples protéines impliquées dans la transcription, comme par exemple la sous-unité TBP (TATA binding protein) du facteur de transcription TFIID, le co-activateur CBP (CREB binding protein) ou les facteurs de transcription TCF/LEF (T-cell factor/Lymphoid enhancer factor)[69].

Certaines données indiquent que la surexpression des cadhérines peut inhiber la transcription de gènes cibles de la voie de signalisation Wnt dépendante de la β-caténine[70]. Suggérant ainsi une interdépendance entre le pool transcriptionnel et le pool membranaire de la

β-caténine. D'autres données semblent cependant indiquer le contraire puisqu'un knockout de la E-cadhérine n'a aucun effet sur l'activité transcriptionnelle dépendante de la β-caténine[71].

3.2 La voie de signalisation Wnt/β-caténine

La β-caténine est l'effecteur principal de la signalisation Wnt. Les ligands Wnt sont des glycoprotéines secrétées qui agissent de manière autocrine ou paracrine en se fixant sur les récepteurs couplés aux G protéines Frizzled. La voie de signalisation Wnt peut être canonique ou non canonique selon la dépendance de la β-caténine.

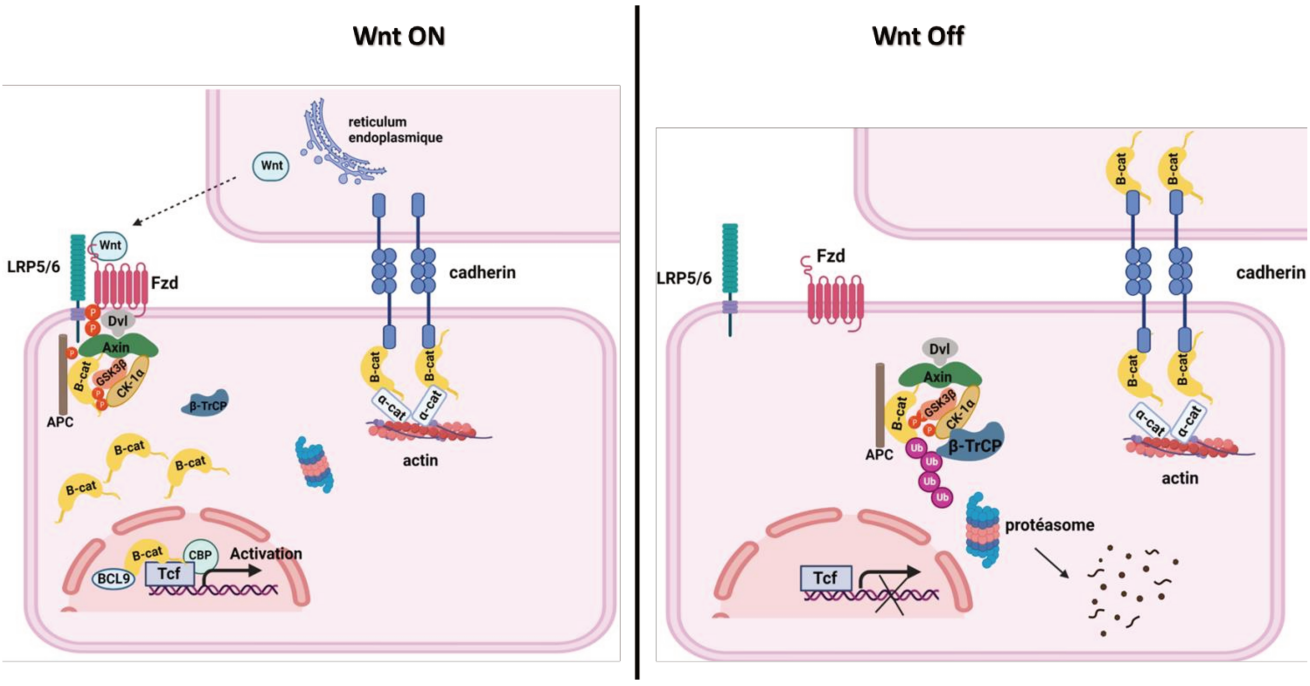


Figure 3 : Vue d'ensemble de la voie de signalisation Wnt/β-caténine dans son état activé et désactivé. *En absence du ligand Wnt, le complexe de dégradation est assemblé et la β-caténine est dégradée. En présence de ligand Wnt, le complexe de dégradation est dissocié, la β-caténine transloque dans le noyau et favorise la formation du complexe de transcription pour permettre la transcription des gènes cibles de Wnt. APC, adenomatous polyposiscoli; CBP, CREB-binding protein; DVL, dishevelled; Fzd, frizzled; GSK3β, glycogen synthase kinase 3β; LRP 5/6, lipoprotein receptor-related proteins5 and 6; TCF, T-cell factor ; β-cat, β-caténine ; β-TrCP (β-transducin repeat-containing protein) (adapté d'après, Wang et al, 2020, Nature)*[72].

En absence de Wnt (Wnt Off, figure 3), la β-caténine est adressée au protéasome pour être dégradée par un complexe protéique dénommé « complexe de dégradation ». Ce complexe cytoplasmique est composé des protéines adaptatrices APC (Adenomatouspolyposis coli), Disheveled (Dvl) et Axin ainsi que des deux kinases GSK3β et caséine kinase 1α (CK1α). Les protéines APC et Axin ont pour rôle de recruter la β-caténine au sein du complexe de

dégradation[73]. Une fois liée à APC/axine, la β-caténine est phosphorylée sur sa sérine 45 par la CK1α. Cette première phosphorylation entraîne une 2ème phosphorylation de la β-caténine sur ses résidus thréonine 41 et sérines 33 et 37 par la GSK3β[74,75]. La triple phosphorylation (T41, S33/37) de la β-caténine crée un site de liaison pour le complexe E3-ligase/βTrCP (β-transducin repeat-containing protein), conduisant à l'ubiquitinylation et à la dégradation rapide de la β-caténine par le protéasome 26S[76].

En présence de Wnt (Wnt On, figure 3), la dégradation de la β-caténine est réprimée, induisant ainsi son accumulation cytoplasmique et sa translocation nucléaire. Ce mécanisme de répression est la conséquence de l'inhibition du complexe de dégradation en réponse à la liaison du ligand Wnt sur son récepteur composé de la protéine transmembranaire Frizzled et du corécepteur LRP 5/6 (low-density receptor-related protein)[77,78]. La fixation de Wnt sur son récepteur entraîne le recrutement du complexe de dégradation au récepteur par l'intermédiaire de la protéine Dvl. Le co-récepteur LRP5/6 activé se lie à l'Axine[79,80] puis CK1 phosphoryle les adaptateurs Dvl, APC et Axin ce qui déstabilise le complexe de dégradation[81]. Par ailleurs Dvl inhibe indirectement l'activité de GSK3β[82] ce qui empêche la phosphorylation de la β-caténine[83]. L'ensemble de ces processus aboutit à la stabilisation de la β-caténine qui transloque ensuite dans le noyau où elle interagit avec le facteur de transcription TCF/LEF. Cette interaction permet le recrutement de coactivateurs comme Bcl9, Pygopus et les Histones Acetyl Transférases (HATs)[84]. L'ensemble de ces protéines contribue alors à la transcription et l'expression des gènes cibles de la voie Wnt/β-caténine.

Il a été montré que la dégradation de la β-caténine pouvait se faire indépendamment de CK1α. Ce mécanisme met en jeu la protéine kinase Cζ (PKCζ) qui phosphoryle la β-caténine sur le résidu Serine 45 et déclenche ainsi sa dégradation par le complexe de dégradation. Par ailleurs, la phosphatase PP2A participe au processus de stabilisation de la β-caténine en déphosphorylant les résidus T41 et S33/37 de la β-caténine lorsque celle-ci n'est plus associée à APC. Cette déphosphorylation inhibe le recrutement de la β-caténine au complexeE3-ligase/βTrCP, conduisant ainsi à sa stabilisation[85].L'ubiquitinylation de la β-caténine phosphorylée par des ubiquitines ligases constitue [86] l'étape finale avant sa dégradation par le protéasome. En absence de stimulation/signalisation Wnt, cette modification post-traductionnelle est réalisée par les ligases β-TrCP et Jade1 et se déroule majoritairement dans le cytoplasme. De manière intéressante, il a été également montré une ubiquitinylation de la β-caténine dans le noyau. Cette ubiquitinylation de la β-caténine nucléaire met en jeu différentes ubiquitines ligases en fonction de la signalisation Wnt-on ou Wnt-off. En absence de signalisation Wnt (Wnt-off), l'ubiquitinylation de la β-caténine nucléaire est effectuée par la E3-ubiquitine ligase TRIM33

alors qu'elle est réalisée par c-Cbl (casitas B-lineage lymphoma) lorsque les cellules sont stimulées par Wnt (Wnt-on)[87]

3.3 Translocation nucléaire de la β-caténine

La translocation de la β-caténine dans le noyau représente l'une des étapes finales de la signalisation Wnt. Le transport cytoplasme-noyau des protéines de plus de 50 kDa à travers les pores nucléaires nécessitent l'intervention de protéines cargo telles que les importines et les exportines. Dans le modèle classique de translocation nucléaire, les protéines possédant une séquence de localisation nucléaire (NLS) se lient à l'importine-α. Le complexe est alors recruté au niveau du complexe du pore nucléaire (NPC) puis transporté à travers le pore nucléaire via son interaction avec l'importine-β. Une fois à l'intérieur du noyau, la protéine cargo est libérée *via* l'action des Ran-GTPase[86]

Fagotto *et al.* ont montré que la β-caténine ne possède pas de séquence NLS mais qu'elle est importée dans le noyau en liant directement la machinerie du pore nucléaire. La β-caténine présente les mêmes caractéristiques que celles de l'importine-β et son transport cytoplasme-noyau ne nécessite pas de composants supplémentaires de la machinerie de transport tels que les importines, les exportines ou la Ras-GTPase[86].

En plus des complexes du pore nucléaire, d'autres partenaires interviennent dans la translocation et la rétention nucléaire de la β-caténine[88]. Tout d'abord l'adaptateur APC, partenaire de la β-caténine au sein du complexe de dégradation, participe également à sa translocation dans le noyau. De façon analogue, B-Cell CLL/Lymphoma 9 (BCL9) a été proposé comme transporteur nucléaire de la β-caténine[89]

Enfin, la phosphorylation des motifs ARM dans les domaines centraux et C-terminaux (CTD) de la β-caténine participe également à sa translocation et à son accumulation nucléaire. Par exemple, les kinases JNK2(c-Jun amino-terminal kinase 2) et AKT phosphorylent la β-caténine respectivement sur les sérines 191 et 605 et sur la sérine 552 en réponse à la signalisation Wnt et induit sa translocation et son accumulation nucléaire[90,91]

4. La β-caténine et le cancer

Diverses études ont mis en évidence un ensemble de mutations géniques qui affectent la signalisation Wnt/β-caténine dans différents types de cancer solide. Ainsi, 48 % des cancers colorectaux sont caractérisés par des mutations du gène *CTNNB1* codant pour la β-caténine et jusqu'à 81,9% de ces cancers présentent des mutations au sein du gène *APC*[92]. Des mutations du

gène CTNNB1 ont également été retrouvées dans le carcinome endométrial, le carcinome hépatocellulaire, l'adénocarcinome gastrique, l'hépatoblastome, le médulloblastome, le craniopharyngiome adamantinomateux,[93] le rhabdomyosarcome embryonnaire[94] et les tumeurs desmoïdes[95]. Par ailleurs, le récepteur Frizzled 6 de Wnt est fréquemment amplifié (19,11 %) et surexprimé (18,71 %) dans le cancer du sein triple négatif [96]. La plupart des mutations citées provoquent un dysfonctionnement du complexe de dégradation et de phosphorylation de la β-caténine entraînant son accumulation anormale dans le noyau et la surexpression de gènes cibles pro-prolifératifs de TCF/LEF tels que Myc, cycline-D1, c-JUN. Il a été également constaté que la β-caténine soutient la croissance tumorale en favorisant l'angiogenèse via l'expression du facteur de croissance VEGF[91].

La voie Wnt/β-caténine joue un rôle essentiel dans l'auto-renouvellement et la maintenance des cellules souches hématopoïétiques. De ce fait, sa dérégulation a été rapportée dans différentes hémopathies malignes comme la leucémie myéloïde aiguë (AML), la leucémie myéloïde chronique (CML), la leucémie aigüe lymphoblastique (ALL), le myélome multiple (MM), le lymphome à cellules du manteau (MCL) et la LLC[97,98].

Dans la LLC, la survie des cellules leucémiques dépend de la signalisation BCR, mais également de la voie Wnt. En effet, il a été montré que l'inhibition de GSK-3β entraîne une accumulation de β-caténine et favorise son activité transcriptionnelle permettant ainsi la survie des lymphocytes B LLC. La stabilisation de la β-caténine est aussi observée dans les cellules LLC en co-culture avec des cellules stromales et met en jeu des mécanismes dépendants de Notch2 et de la signalisation Wnt. Ce dialogue entre cellules LLC et cellules stromales représente un des mécanismes par lequel le microenvironnement tumoral soutient la survie des cellules LLC[55] (voir chapitre II sur la LLC).

III. La tyrosine kinase BTK

1. Généralités

La tyrosine kinase BTK (Bruton's Tyrosine Kinase) a été identifiée pour la première fois en 1993 lors de l'étude des gènes potentiellement impliqués dans l'agammaglobulinémie liée au chromosome X (ou agammaglobulinémie de Bruton, XLA). XLA se caractérise par un arrêt du développement des cellules B au stade des cellules pré-B et par un défaut de différenciation des cellules B mature. Les patients atteints de cette pathologie génétique présentent non seulement une hypogammaglobulinémie sévère mais aussi un déficit quasi-complet en lymphocytes B. Peu après sa découverte, il a été démontré que BTK est impliquée de manière cruciale dans la signalisation du BCR dans les cellules B mature. Mais également dans de nombreuses autres voies de signalisation dans les cellules B telles que la signalisation des récepteurs TLR (toll-like receptor), des chimiokines et des récepteurs Fc[99].

Chez l'homme, BTK est exprimée dans la plupart des cellules hématopoïétiques, en particulier dans les cellules B, les cellules myéloïdes et les plaquettes, tandis que les lymphocytes T et les cellules NK présentent des niveaux faibles ou indétectables de BTK. En 2007, la découverte d'inhibiteur irréversible de BTK, l'ibrutinib, a représenté une avancée majeure dans le traitement des tumeurs malignes à cellules B[100].

L'ibrutinib en monothérapie a montré des taux de réponse impressionnants chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique et de lymphome à cellules du manteau, et une activité clinique encourageante a été observée chez des patients atteints de diverses autres affections malignes à cellules B[101].

2. Structure de BTK

BTK est une protéine de 659 acides aminés appartenant à la famille des protéines kinases TEC. Elle est constituée de cinq domaines : un domaine amino-terminal d'homologie de pleckstrine (PH), un domaine d'homologie de TEC (TH) riche en proline, un domaine SH2, un domaine SH3 ainsi qu'un domaine à activité kinase (figure 4). Dans la cellule, BTK est essentiellement cytoplasmique et n'est que transitoirement recrutée à la membrane par l'interaction de son domaine PH avec le phosphatidyl inositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) qui est généré par la phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3K)[102].

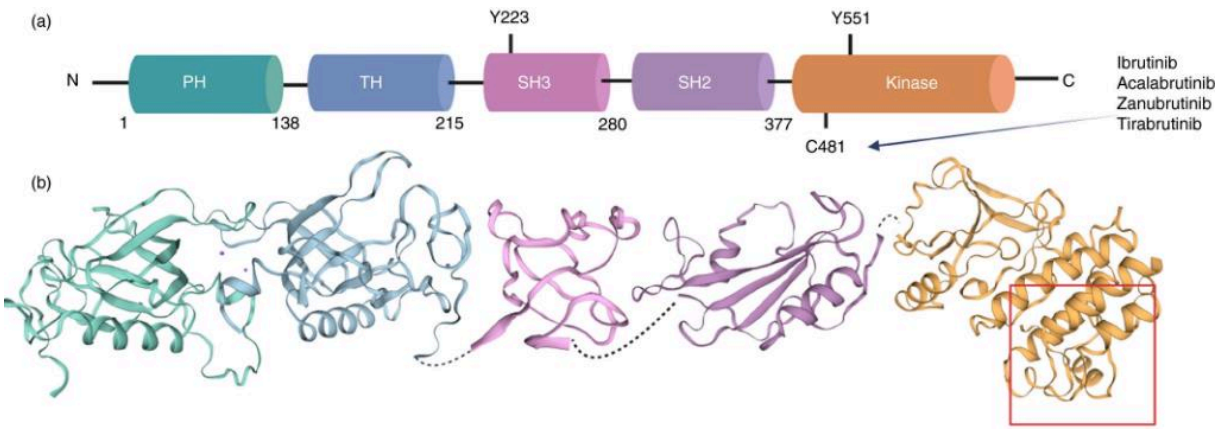


Figure 4 : Vue d'ensemble de la structure de la protéine BTK et des inhibiteurs. *La protéine BTK de 77 kDa est composée de cinq domaines d'interaction des protéines. Les 2 sites critiques au sein de la protéine sont Y223 (domaine SH3) et Y551 (domaine kinase : domaine orange/jaune). (b) Les inhibiteurs de BTK agissent en se liant à l'un des domaines d'interaction des protéines et en bloquant l'action catalytique de BTK. Le principal site de liaison des inhibiteurs covalents actuels est le résidu C481 du domaine kinase. Cela inclut l'ibrutinib et les inhibiteurs de deuxième génération acalabrutinib, zanubrutinib et tirabrutinib*[102].

Les domaines PH et TH se lient au domaine SH2 par une région riche en proline (PRR) et le domaine SH2 interagit avec le domaine kinase par le segment SH2-kinase linker. BTK est phosphorylée par les kinases de la famille Src et/ou de Syk sur un résidu tyrosine en position 551 situé dans son domaine catalytique. Cette phosphorylation entraîne une augmentation de son activité kinase qui se traduit par son autophosphorylation sur son résidu tyrosine en position 223 situé dans le domaine SH3. Si la phosphorylation Y223 est considérée comme reflétant l'activation de BTK, son rôle n'est pas clairement déterminé. En effet, elle ne semble pas affecter l'activité catalytique de BTK et agirait plutôt en tant que régulateur.

3. BTK et signalisation

BTK est activée en aval des récepteurs antigéniques, en particulier le BCR, des récepteurs des facteurs de croissance, des récepteurs de cytokines, des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), tels que les récepteurs des chimiokines, et des intégrines.

3.1 BTK dans la signalisation du BCR

L'activation de BTK est induite en réponse à la liaison de l'antigène sur le BCR, déclenchant ainsi une cascade de signalisation en aval qui entraîne la survie, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (figure 5). Brièvement, l'activation du BCR induit le recrutement de BTK à la membrane via l'adaptateur BLNK et son activation complète se fait en

deux étapes. Tout d'abord, BTK est phosphorylé par les kinases SYK et Lyn sur le résidu Y551 ce qui entraîne l'autophosphorylation de BTK sur son résidu Y223[103].

Cette deuxième phosphorylation a pour conséquence un changement de conformation de la protéine et son activation complète. BTK activée peut ensuite phosphoryler/activer la phospholipase C gamma-2 (PLCγ2) et déclencher en aval plusieurs cascades de signalisation aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que NFkB et NFAT[104].

En l'absence de BTK, la signalisation du BCR est insuffisante pour induire la différenciation des cellules B en cellules B périphériques matures. Cela entraîne une altération du développement des cellules B et des défauts dans les réponses fonctionnelles, notamment la prolifération cellulaire, l'expression des marqueurs d'activation, la production de cytokines et d'anticorps. Par ailleurs, il a été montré que la surexpression de BTK dans les cellules B entraîne la formation spontanée de centres germinatifs, la production d'auto-anticorps antinucléaires et l'apparition d'une maladie auto-immune semblable au lupus érythémateux systémique (LES) causée par une signalisation BCR hyper-réactive et une activation accrue de NFκB.

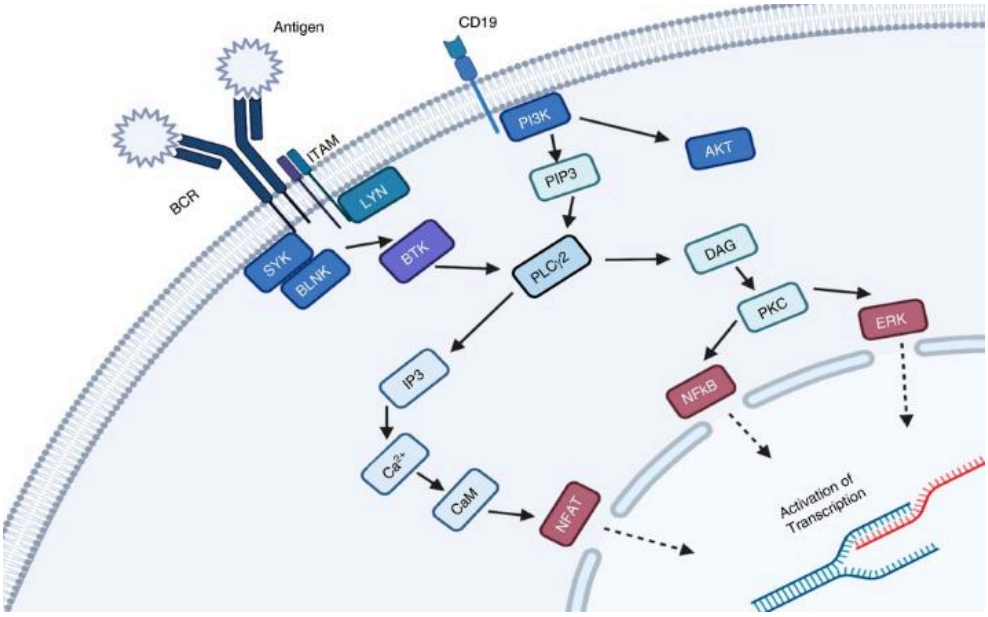


Figure 5 : Une vision simplifiée de la voie de signalisation du BCR et de la position de BTK dans celle-ci. *BTK complètement activée par SYK et Lyn, phosphoryle PLCγ2 sur les résidusY753 et Y759. La PLCγ2 activée hydrolyse le PIP2 en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). IP3 régule les niveaux de calcium intracellulaire et active ainsi la transcription du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT), via la calcineurine et la calmoduline. Le DAG sert de médiateur à l'activation des protéines kinases C (PKC), qui induit l'activation de plusieurs membres de la famille MAPK, notamment les kinases ERK1/2 et NF-κB.* [102]

3.2 BTK dans la voie des TLR

Les récepteurs de type Toll (TLR) sont essentiels à la reconnaissance des agents pathogènes par la détection des PAMP (motifs moléculaires associés aux agents pathogènes), exprimés principalement par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et permettant ainsi l'induction de réponse immunitaire adaptative [38].

Lors de leur activation, la plupart des TLR recrutent l'adaptateur MYD88 (myeloid differentiation primary response 88). MYD88 active IRAK1 (la kinase1 associée au récepteur de l'interleukine-1), soit seule soit en association avec la molécule adaptatrice TIRAP/MAL par l'intermédiaire de son domaine TIR. Il a été montré que BTK pouvait interagir avec ces trois protéines de la signalisation TLR ainsi qu'avec le récepteur lui-même[105] (figure 6).

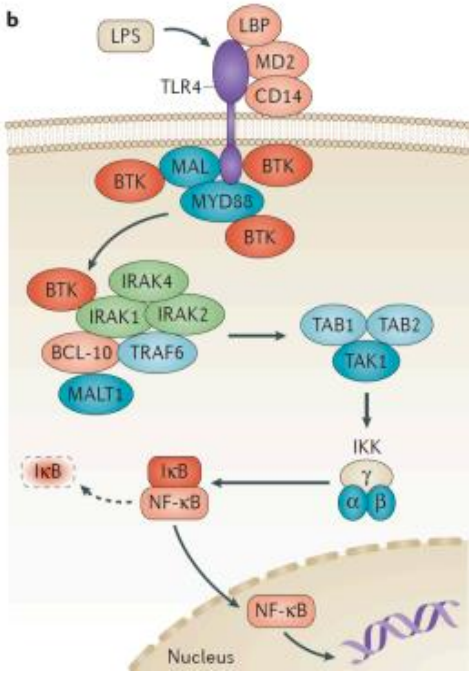


Figure 6 : Rôle de BTK dans la signalisation des TLR*. Modèles de la signalisation en aval du TLR4 (adapté de Hendriks, 2014)*[106] .

La signalisation TLR aboutit à l'activation de facteurs de transcription, notamment NF-κB, la protéine activatrice-1 (AP-1) et le facteur 3 de régulation de l'interféron (IRF3), ce qui entraîne la prolifération des cellules B, la sécrétion d'anticorps et la production de cytokines pro-inflammatoires. La signalisation via les TLR constitue une autre voie potentielle par laquelle les cellules B malignes peuvent assurer leur survie lors d'un traitement inhibiteur de BTK. Il a été en effet signalé que les cellules de LLC présentes dans les ganglions lymphatiques présentent une activation TLR accrue par rapport aux cellules circulantes, ainsi que des niveaux accrus de

phosphorylation de NF-κB. En raison du rôle des TLR dans la pathogenèse de la LLC, le ciblage combiné de BTK et des TLR est considéré comme une approche thérapeutique potentiellement bénéfique[107].

3.3 BTK et les récepteurs aux chimiokines

CXCR4 et CXCR5 sont des récepteurs couplés aux protéines G constitués de sept domaines transmembranaires et associés à des protéines G hétérotrimériques intracellulaires composées des trois sous-unités α, β et γ (Gα, Gβ et Gγ)[108]. Dans les cellules B, CXCR4 et CXCR5 sont exprimés à différents stades de leur développement et jouent des rôles importants dans le trafic, le homing et l'homéostasie tissulaire[109]. L'activation de ces récepteurs se traduit par un changement de conformation des grandes protéines G entraînant la dissociation des sous-unités Gα et Gβγ, leur association à BTK via ses domaines PH et TH[110,111], et l'activation en aval des voies de signalisation dépendantes de BTK, AKT et MAPK[112] (figure 7).

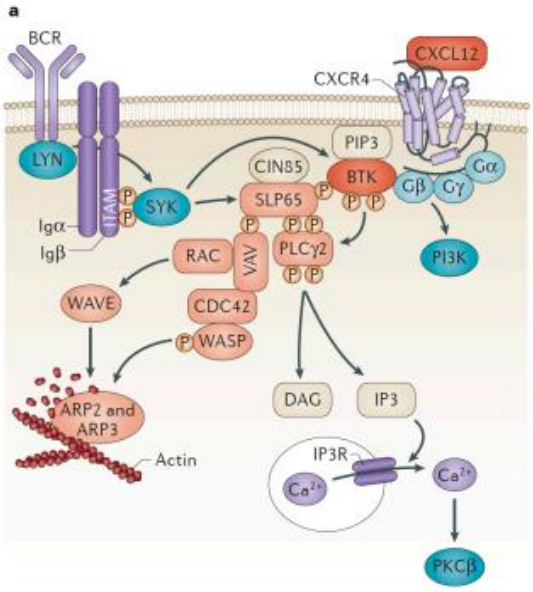


Figure 7 : Rôle de BTK dans la signalisation de CXCR4*. Modèles de la signalisation en aval de CXCR4 (adapté de Hendriks, 2014[106]).*

En raison de sa fonction en aval des récepteurs de chimiokines, notamment CXCR4 et CXCR5, BTK joue un rôle important dans la localisation des cellules B dans divers compartiments du tissu lymphoïde. Cela a été démontré pour la première fois chez la souris par des expériences de migration de cellules B déficientes en BTK qui présentaient une migration et une orientation vers les ganglions lymphatiques altérées[113].

4. BTK dans la LLC

L'activité de BTK est cruciale pour la survie et la prolifération des cellules B leucémiques et pour leurs interactions avec les cellules du microenvironnement tumoral. En effet, BTK est essentiel à la rétention et/ou à l'orientation des cellules LLC dans leur microenvironnement par l'intermédiaire des intégrines contrôlées par le BCR et de chimiokines[114]. Du fait de la signalisation chronique de la voie du BCR, les cellules LLC présentent une activation constitutive de diverses kinases associées à cette voie dont BTK.

En raison de l'implication de BTK dans la pathogénèse de la LLC, l'administration d'inhibiteurs de BTK (BTKis) constitue aujourd'hui un traitement efficace de la LLC. Les inhibiteurs de BTK sont classés en deux catégories : les inhibiteurs irréversibles (covalents) et les inhibiteurs réversibles (non covalents) comme par exemple : Pirtobrutinib, Vecabrutinib, Fenebrutinib, Nemtabrutinib[115].

L'ibrutinib, l'acalabrutinib et le zanubrutinib sont des inhibiteurs irréversibles de BTK qui se lie de manière covalente au résidu Cys481 situé dans la poche ATP de BTK[116]. Chez les patients LLC, l'administration d'ibrutinib provoque une « chasse » des cellules tumorales résidant dans les ganglions et leur redistribution vers le sang périphérique[117]. Dans des échantillons de patients LLC, il a été montré que l'ibrutinib bloquait la signalisation BCR et régulait négativement la sécrétion des chimiokines CCL3 et CCL4 dépendantes du BCR. De plus, l'ibrutinib bloque les effets pro-survie induits par le CD40 ligand, BAFF et l'interleukine 6 dans les cellules LLC[118]. En plus de la signalisation du BCR, il a été montré que l'ibrutinib interfère avec l'adhésion des cellules LLC médiée par les intégrines mais aussi avec la migration des cellules LLC en réponse aux chimiokines CXCL12 et CXCL13[114].

Malgré leur efficacité thérapeutique, certains patients développent une résistance au traitement par les inhibiteurs de BTK actuellement approuvés. La rechute de la LLC sous ibrutinib est principalement due à l'acquisition de mutations dans BTK ou dans la PLCγ2, sa cible directe[119]. Ces mutations sont retrouvées chez 85 à 90% des patients en rechute et peuvent être présentes longtemps avant l'observation de la rechute clinique[120]. La mutation la plus fréquente dans BTK est la substitution C481S. Cette mutation réduit l'affinité de l'ibrutinib pour BTK, entraînant une inhibition réversible de la kinase par l'inhibiteur[121]. À l'inverse, les mutations de la PLCγ2 sont associées à un gain de fonction, permettant une signalisation soutenue même lorsque BTK est inhibée[122].

VI. Plasticité du microenvironnement et la leucémie lymphoïde chronique

1. Généralités

En 2000, Hanahan et Weinberg ont défini le cancer comme une maladie résultant de l'acquisition d'un ensemble de mutations au fur et à mesure que les cellules se divisent, aboutissant ainsi à des altérations génétiques et à l'apparition de cellules cancéreuses. La cellule cancéreuse se distingue ainsi par six capacités importantes : une croissance cellulaire illimitée, l'échappement à l'apoptose, une autosuffisance vis-à-vis des facteurs de croissance, une résistance aux signaux inhibiteurs de croissance, la capacité de détourner l'angiogenèse à son profit et la capacité d'acquérir un phénotype invasif et métastatique. De nombreuses données se sont accumulées selon lesquelles le cancer n'était pas uniquement le résultat de modifications génétiques mais également l'influence de l'ensemble du microenvironnement qui entoure les cellules cancéreuses. De ce fait, d'autres marqueurs s'ajoutent aux six marqueurs précédents dont notamment le rôle du microenvironnement tumoral. Ce microenvironnement comprend spécifiquement les cellules stromales, toutes les cellules immunitaires qui entourent et infiltrent la tumeur, les fibroblastes, la matrice extracellulaire et les vaisseaux sanguins qui fournissent les nutriments et l'oxygène. Tous ces facteurs forment un complexe de cellules favorisant la survie et la prolifération tumorale.

Le microenvironnement tumoral est particulièrement important dans la LLC étant donné la forte dépendance des cellules leucémiques aux facteurs externes pour leur prolifération et leur survie. En effet, les cellules LLC subissent rapidement une apoptose *in vitro* alors que leur survie est prolongée en présence des cellules stromales. De plus, la fraction des cellules leucémiques CD5+ circulant dans le sang périphérique est arrêtée dans la phase G0 du cycle cellulaire alors que celles qui se trouvent dans la moelle osseuse ou qui résident dans les tissus lymphoïdes prolifèrent à un taux de 0,1-1% du clone leucémique total par jour [6].

Le microenvironnement tumoral dans la LLC est retrouvé au sein des organes lymphoïdes secondaires et de la moelle osseuse. Il se compose notamment de cellules stromales mésenchymateuse de la moelle osseuse (MSC), de cellules T, de cellules NK, de cellules folliculaires dendritiques (FDC), de cellules endothéliales, de neutrophiles et de cellules « Nurse like » (NLC) qui entourent, protègent et favorisent la prolifération des cellules leucémiques résidentes. D'autre part, les cellules LLC exercent un rôle dans le remodelage du microenvironnement par des signaux immuno-modulateurs qui favorisent l'échappement à l'immuno-surveillance et modulent le compartiment stromal. Ce réseau d'interactions

bidirectionnelles constitue un environnement complexe qui soutient la prolifération et la survie des cellules leucémiques[123].

2. Composante cellulaire du microenvironnement tumoral dans la LLC

2.1 Les cellules stromales de la moelle osseuse : les cellules MSC

Les MSC sont parmi les premiers acteurs du microenvironnement de la LLC qui ont été étudiés[124]. Ces cellules ont été découvertes en 1968 par Friedenstein *et al.* qui les ont décrites comme une population cellulaire adhérente et fibroblastique capable de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes ou adipocytes[125]. En 1991, ces cellules ont été nommées "cellules souches mésenchymateuses" par Caplan et al.[126].

En culture, les MSC adhérent au plastique et forment une population cellulaire hétérogène avec des potentiels « souche » différents. Afin d'éviter toute controverse, le terme « souche » dans « cellule souche mésenchymateuse » a été remplacé par « stromale », faisant référence à une population cellulaire ayant un potentiel sécrétoire, immunomodulateur, une capacité à se différencier et des propriétés de « homing » [127] .

En 2006, l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) a proposé un ensemble de critères minimaux pour définir les MSC. Ce sont des cellules hétérogènes, multipotentes, non hématopoïétiques et doivent : [1] être capable d'adhérer au plastique lorsqu'elles sont maintenues en culture ; [2] les MSC doivent exprimer le CD105, CD73 et CD90, mais ne doivent pas exprimer les marqueurs hématopoïétiques (CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19, et HLA classe II) ; et [3] enfin, les MSC doivent être capables de se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes. Entre outre, les MSC peuvent se trouver dans divers tissus, tels que l'ovaire, le cerveau, la rate, le foie, les reins, les poumons, les muscles, le thymus, le pancréas, les tissus adipeux et la moelle osseuse.[128]

2.1.1 Dialogue entre les MSC et les cellules LLC

a. Dialogue *via* des contacts cellule-cellule

Des études ont montré que les MSC obtenues à partir de patients atteints de LLC présentent des propriétés différentes par rapport aux MSC dérivées d'individus sains. En effet, en 1995, il a été constaté que les MSC dérivées de patients LLC présentent une production accrue du facteur de croissance TGFβ1 et de CXCL12 par rapport à celle du stroma sain, ces deux molécules jouant un rôle important dans la survie des cellules leucémiques[129,130,131]

La co-culture de cellules CLL avec des MSC offre aux cellules B une protection contre l'apoptose spontanée mais également une résistance contre les traitements chimio-thérapeutiques [124 132]. Cependant, cette protection n'est efficace que lorsque les cellules sont en contact direct car les signaux de survie sont délivrés par des molécules d'adhésion et des intégrines telles que VLA-4 et LFA-1[133]. En co-culture, les cellules LLC ont la capacité de migrer spontanément sous la monocouche de MSC. Cette migration, dénommée « pseudoempéripolèse », est induite par le CXCL12 sécrété par les MSC. La fixation de CXCL12 sur son récepteur CXCR4 présent sur les cellules B leucémiques déclenche l'activation de la protéine VLA-4 (dimère CD49d/CD29). VLA-4 est une intégrine importante pour la rétention et la localisation des cellules LLC dans la niche de la moelle osseuse en interagissant avec la molécule d'adhésion VCAM-1 (CD106) exprimée à la surface des cellules stromales[134]. Cette rétention peut aussi être effectuée via l'intégrine LFA-1(dimère CD11a/CD18) exprimée par les cellules LLC et activé soit par la signalisation CXCL12-CXCR4 soit par la signalisation du BCR [49]. L'ensemble de ces interactions renforce ainsi les capacités d'adhérence et de survie des cellules LLC au contact des MSC [135]. Il est intéressant de noter que la majorité des cellules CLL présentent un défaut d'activation de LFA-1 mais ce dysfonctionnement peut être contourné par l'engagement des récepteurs au VEGF [136].

b. Dialogue *via* des facteurs solubles

Plusieurs études ont montré que les cellules leucémiques co-cultivées avec des MSC présentent des expressions dérégulées de plusieurs cytokines par rapport à celles de donneurs sains[137]. Ainsi, Trimarco *et al.* ont montré que la co-culture induisait une augmentation de la production d'IL-8, d'IL6 ainsi que des chemiokines CCL4, CCL11 et CXCL10 dans le surnageant[138]. D'autres auteurs ont suggéré que le compartiment leucémique représentait la principale source d'IL-6 dans un système de coculture[139]. De plus, les MSC en co-culture secrètent de l'IL1β alors que les cellules LLC produisent du TNFα, ce qui suggère la création d'une niche inflammatoire au sein des sites de prolifération *in vivo* [140] .

Une représentation schématique des différentes interactions du contact B LLC-MSC est présentée dans la figure 8.

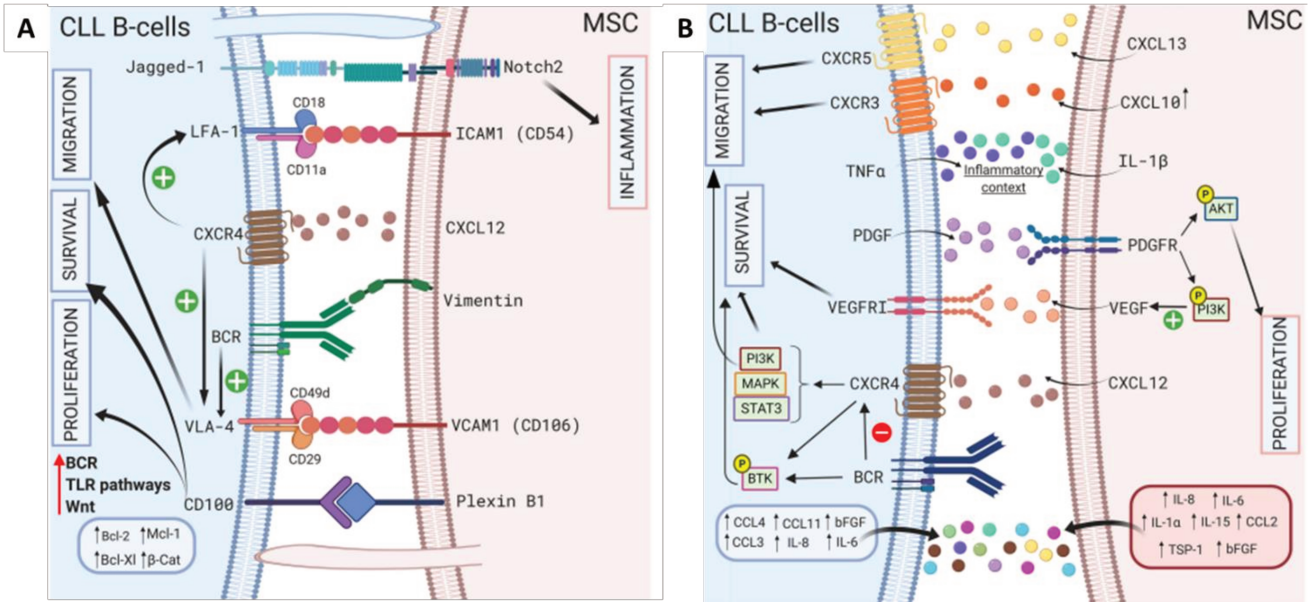


Figure 8 : *Interaction entre les cellules B de la LLC et NLC par contact direct (A) ou par des facteurs solubles (B) (N.Dubois et al, 2020).*

2.1.2 La fonction pro-tumorigène des MSC

Dans le microenvironnement tumoral (MET), les cellules tumorales induisent un phénotype pro-tumorigène des MSC par le biais de la sécrétion de cytokines et d'interactions directes avec d'autres cellules, créant ainsi une population cellulaire de cellules stromales mésenchymateuses particulières associées aux carcinomes (CA-MSC). [141,142]

Ces cellules conservent leur capacité de différenciation et leurs marqueurs de surface stromaux mais elles contribuent à la progression tumorale selon plusieurs mécanismes : (i) en se différenciant en d'autres types cellulaires présentant un phénotype pro-tumorigène tels que les fibroblastes associés aux carcinomes (CAF), (ii) en atténuant la réponse immunitaire, (iii) en promouvant l'angiogenèse tumorale, (iv) en renforçant le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), (v) en augmentant la survie des cellules tumorales, et (vi) en induisant la formation de métastases. [143,144]

Une des caractéristiques déterminantes des MSC est leur capacité à se différencier en de multiples lignées cellulaires, comme les fibroblastes, les adipocytes, les ostéocytes et les chondrocytes. Ces propriétés multipotentes suggèrent que les MSC peuvent jouer un rôle clé dans la génération de la composante stromale du MET. De nombreuses études ont montré que les MSC se différencient en fibroblastes associés aux carcinomes (CAF) soutenant la tumeur en présence de cellules tumorales. Dans le MET, les CAF constituent la majorité du stroma local et contribuent de manière significative à la tumorigenèse [145]. Alors que les CAF peuvent être dérivés de

fibroblastes stromaux locaux, il a été montré que les MSC résidents et ceux recrutées dans la niche tumorale acquièrent un phénotype de type CAF. Il est intéressant de noter que les CA-MSC ont une capacité encore plus grande à se différencier en CAF que les MSC [146]. Bien que le mécanisme de différenciation des CA-MSC en CAF n'ait pas encore été complètement élucidé, de plus en plus de données indiquent que des facteurs sécrétés par les cellules tumorales induisent la voie de signalisation TGF-β/Smad dans les MSC pour les différencier en un phénotype CAF [147,148,149] (figure 9).

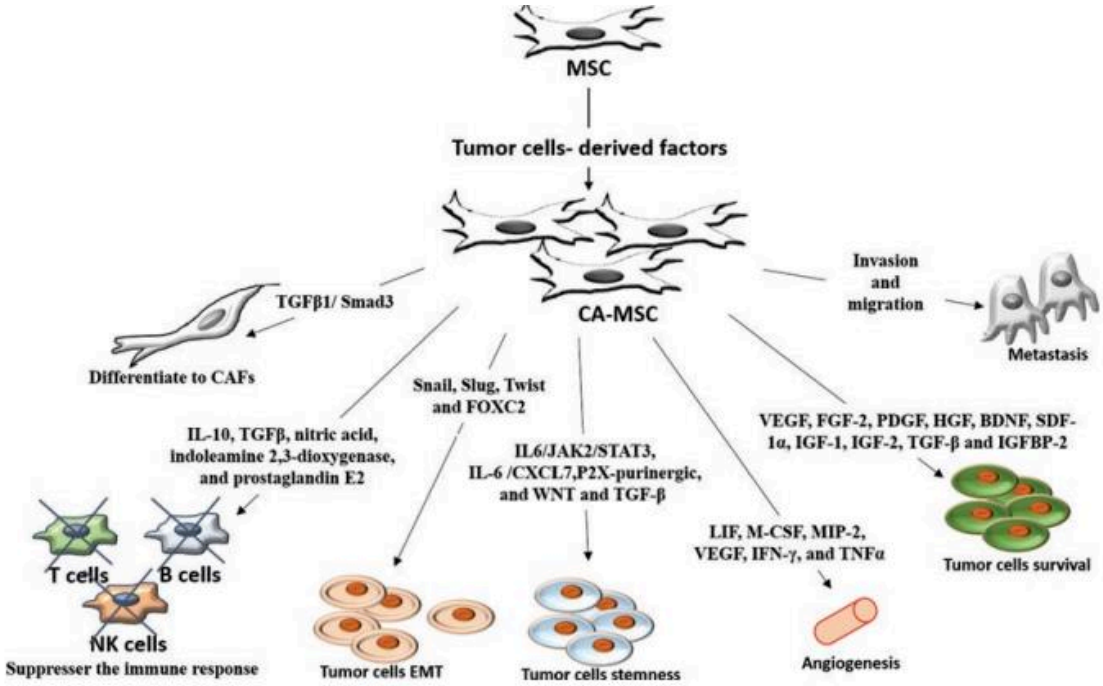


Figure 9 : Le rôle des MSC dans la progression des tumeurs*. Les MSC (1) se différencient pour former des fibroblastes associés au cancer (CAF), (2) atténuent la réponse immunitaire anti-tumorale et (3) induisent la transition épithélio-mésenchymateuse TEM, l'angiogenèse et la survie des cellules cancéreuses et les métastases.*[150]

2.2 Les cellules « Nurses-like »

Dans la LLC, les cellules « Nurses-like » (Nurses-like cells, NLC) peuvent être considérées comme l'équivalent des macrophages associés aux tumeurs (Tumor-associated macrophages, TAM) retrouvés dans les tumeurs solides. Aussi et avant de s'intéresser aux propriétés des NLC, il est nécessaire de décrire les principales caractéristiques des TAM.

2.2.1 Les macrophages de type 1 et de type 2

Les macrophages sont des cellules myéloïdes qui proviennent de la différenciation des monocytes circulants [151]. Ces cellules sont des acteurs de l'immunité innée et se divisent en deux

grandes catégories en fonction de leurs effets pro ou anti-inflammatoires : les macrophages de type 1 (M1) et les macrophages de type 2 (M2). Cette différenciation n'est cependant pas définitive puisqu'un M1 peut se différencier en M2 et inversement suivant les stimuli qu'il reçoit.

La différenciation des monocytes en M1 est induite par l'INF-γ, les LPS (lipopolysaccharides) ou les agonistes des TLR [152]. Les M1 sont pro-inflammatoires et se caractérisent par la production élevée de TNF-α et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-12 et l'IL-23 [153]. Ces cellules peuvent également jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigène (CPA) du fait qu'elles expriment de forts niveaux de molécules du CMH de classe I ou de classe II. A l'opposé, les M2 ont une action anti-inflammatoire et se caractérisent par la production de quantités élevées de prostaglandines, de TGF-β et de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10. [154,155]

2.2.2 Les macrophages associés aux tumeurs (TAM)

Les TAM proviennent de la différenciation de précurseurs monocytaires circulants et non d'une prolifération de macrophages déjà différenciés. En effet, les monocytes sont recrutés au sein des tumeurs principalement sous l'action de cytokines telles que CCL2 puis, une fois sur site, ces monocytes se différencient en TAM sous l'influence de cytokines inflammatoires telles que l'IL6 et l'IL10.

Les TAM sont classiquement associés à la sous-classe M2d des M2 [156]. Bien qu'il n'existe pas une liste exhaustive de marqueurs permettant leur caractérisation, ces cellules expriment le CD14, le CD11b et, comme les M2, de faibles taux de CD64, de molécules du CMH de classe I et II et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Le deux récepteurs scavengersCD163 et le CD204 ainsi que le récepteur au mannose (CD206) sont également utilisés pour la caractérisation des TAM[157]. Ils peuvent également être caractérisés par leur production de cytokines telles que le TGF-β, l'IL-10 ou le VEGF.[158]

Les TAM sont caractérisés aussi par leur rôle essentiel dans l'immunosuppression *via* l'inhibition des lymphocytes T. En effet, il a été montré que les TAM synthétisent et sécrètent de l'IL10 et du TGF-β qui vont favoriser la différenciation des cellules T cytotoxiques en cellules T régulateurs et leur recrutement au site tumoral[159,160]. D'autre part, les TAM expriment le ligand PDL-1en réponse à la stimulation parle CSF-1, l'IL-4, l'INF-γ ou encore à l'hypoxie. La fixation de PDL-1sur son récepteur PD-1 présent à la surface des lymphocytes T induit une inhibition directe de la signalisation TCR et altère la réponse anti-tumorale dépendante des cellules T effectrices. [161,162]

2.2.3 Les TAM dans la leucémie lymphoïde chronique : les cellules « Nurse-like »

En 2000, l'équipe de JA Burger décrit et caractérise un nouveau type cellulaire obtenu en culture par différenciation de PBMCs isolés de patients atteints de LLC. Ces cellules qui sont dénommées « Nurse-like cells » (NLC) se présentent comme des cellules larges, adhérentes et ressemblant à des fibroblastes. D'un point de vue phénotypique, les NLC expriment le marqueur des monocytes CD14 et des marqueurs des macrophages de type M2 comme le CD68, le CD163 et le CD206. Ces cellules présentent également des marqueurs de cellules stromales tel que la vimentine et STRO-1.[163]

Tout comme les TAM, les NLC expriment la protéine IDO, une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane est connue pour moduler négativement l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Un autre point en commun que partage les NLC avec les TAM est leur capacité à synthétiser une quantité élevée de TGF-β, d'IL-10, de CCL17, de CCL22 et de VEGF[164] Enfin il est à noter que bien qu'elles aient été initialement décrites à partir de culture cellulaire, les NLC ont également été retrouvées dans les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse de patients atteints de LLC[165,163]

2.2.4 Recrutement des monocytes aux sites de prolifération et différenciation en NLC

La stimulation des cellules LLC par le CD40L, exprimé par les lymphocytes T, induit la sécrétion de CCL2 permettant le recrutement des monocytes CD14+ dans les sites de prolifération ganglionnaires. Les cellules LLC peuvent également recruter les monocytes *via* la sécrétion de CCL3 et CCL4 induite en réponse à l'activation du BCR et du CD38[166].Après leur différenciation en NLC, ces dernières contribuent à la rétention des cellules B leucémiques dans le ganglion, favorisant ainsi leur survie (cf paragraphe suivant).

En culture, il a été montré qu'une mise en co-culture de monocytes CD14+ sains avec des cellules LLC induisait la différenciation de ces monocytes en NLC[167]. Ce processus de différenciation met notamment en jeu la protéine HMGB1 (soluble high mobility group box 1) sécrétée par les cellules LLC qui, après sa liaison aux récepteurs RAGE (receptor for advanced glycation end products) et TLR9 exprimés à la surface des monocytes, induit leur différenciation via l'activation de STAT-3 et de NFk-B [168].

2.2.5 Les NLC dans la pathogénèse de la LLC

Les cellules NLC ont été identifiées et caractérisées par leur capacité à attirer les cellules LLC au sein de la niche tumorale afin de les protéger de l'apoptose et des chimiothérapies. Dans

les ganglions et la moelle de patients LLC, les NLC sécrètent le CXCL12 qui va permettre l'attraction des cellules LLC via le récepteur CXCR4 qu'elles expriment. Une fois en contact avec les NLC, les cellules tumorales diminuent l'expression de leur CXCR4 afin de rester à leur voisinage. De la même façon, les chimiokines CXCL13, CCL19 et CCL21, sécrétées par les NLC, attirent les cellules LLC qui expriment leurs récepteurs spécifiques CXCR5 et CCR7[169] (figure 10).

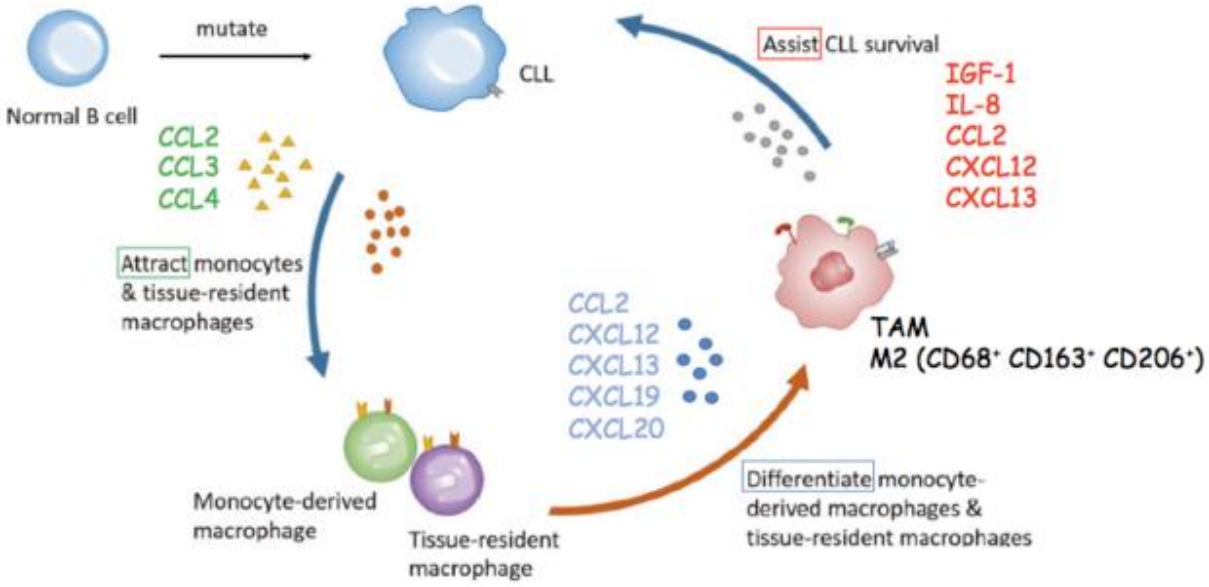


Figure 10 : *Les NLC représentent les TAM dans la LLC. (Adapté d'après Panse et al. 2008)*

Après la mise en place de contacts cellule-cellule, les NLC soutiennent la survie des cellules leucémiques notamment par l'intermédiaire des ligands BAFF (B-cell activating factor) et APRIL (A proliferation inducing ligand) exprimées à la surface des NLC et qui se lient respectivement aux récepteurs BAFF-R et TACI présents à la surface des cellules LLC. Ces interactions se traduisent au final par l'induction de l'expression de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Survivin et XIAP qui favorisent la survie des cellules leucémiques et leur évasion de l'apoptose spontanée. De plus, les NLC expriment à leur surface le CD31 qui en se liant à son récepteur CD38 présent sur les cellules leucémiques, délivre un signal de survie aux cellules leucémiques.[170,171] (figure 11).

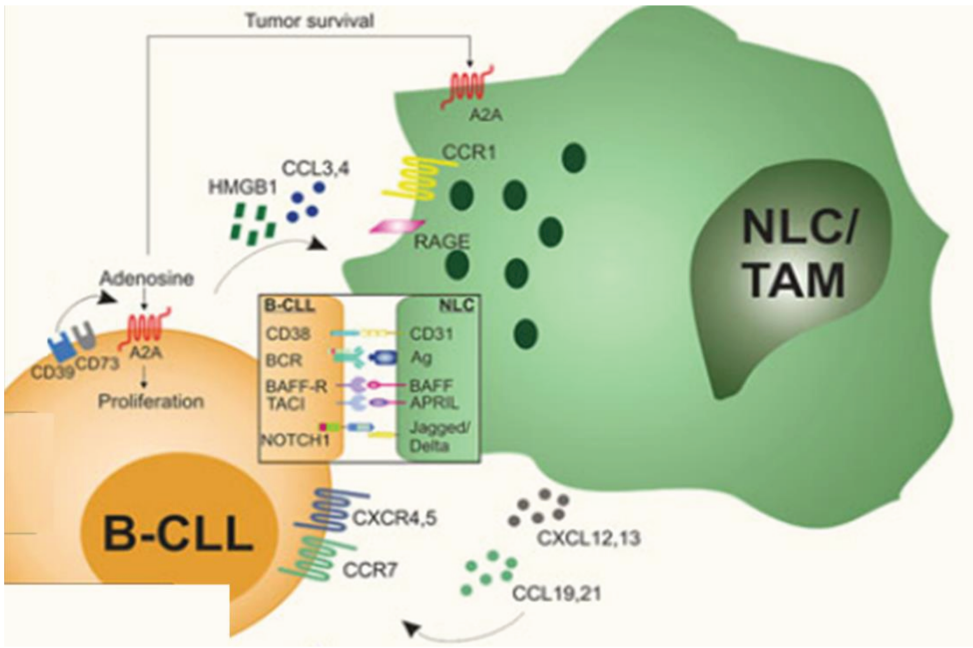


Figure 11 : *Interaction des cellules B LLC avec les NLC dans le ganglion lymphatique (adapté d'après, F. Arruga and S. Deaglio, 2017)*

2.3 Les cellules dendritiques folliculaires, FDC

Le ganglion lymphatique sain s'organise en trois zones dénommées, de la périphérie vers l'intérieur, le cortex, le paracortex et la zone médullaire. Le cortex est constitué par des follicules où sont localisées les cellules dendritiques folliculaires (FDC) qui forment un réseau dense au sein duquel les cellules B rencontrent l'antigène, s'activent et se différencient. Dans le paracortex se trouvent les cellules réticulaires fibroblastiques (FRC) qui entourent les vénules endothéliales et qui forment un réseau dense où sont également présents de nombreux lymphocytes T[172] (figure 12).

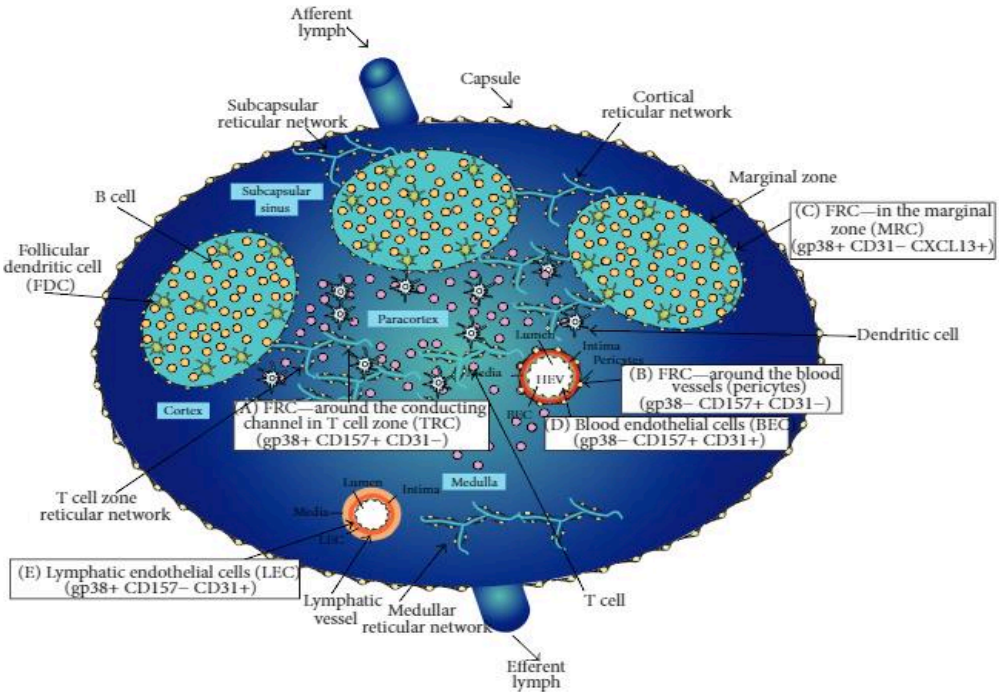


Figure 12 : *Schéma représentatif d'un ganglion lymphatique et la répartition des différentes cellules présentes.*[173]

Dans la LLC, une étude menée par le laboratoire a montré une désorganisation de l'architecture des ganglions lymphatiques chez les patients LLC. En effet, il a été observé une perte de la structuration des zones corticales folliculaires et paracorticales due à la disparition des FDC et une désorganisation du réseau des FRC associé à une infiltration diffuse des lymphocytes B tumoraux exprimant le récepteur CCR7 de façon constitutive. De plus et alors que les FDC sont normalement localisées dans les organes lymphoïdes secondaires[173], des cellules FDC ont également été détectées dans des infiltrats nodulaires de la moelle osseuse de patients LLC[151].

2.3.1 Caractéristiques phénotypiques des FDC

Les FDC sont des cellules non hématopoïétiques d'origine stromale, situées dans la région centrale des follicules primaires et dans la zone claire des centres germinatifs normaux[10]. Elles se caractérisent par l'expression des récepteurs pour les fragments Fc des immunoglobulines (CD16, CD23 et CD32) et les récepteurs du complément (CD21 et CD35). Les FDC expriment également des molécules d'adhérences telles que VCAM1 et MAdCAM1, ainsi que des molécules communes à toutes les sous populations de cellules stromales dans les tissus lymphoïdes, telles que la desmine et la laminine. Enfin, ces cellules sécrètent la chimiokine CXCL13 afin de diriger et d'attirer les cellules B exprimant le récepteur CXCR5 vers les follicules[174].

2.3.2 L'interaction FDC et cellules LLC

Les FDC représentent un autre acteur important du microenvironnement stromal dans la LLC, en particulier dans les organes lymphoïdes secondaires, du fait de leur capacité à sécréter des cytokines, à exprimer des molécules d'adhésion et à stimuler par l'intermédiaire du BCR la survie des cellules B. Une représentation schématique des différentes interactions entre les cellules LLC et les FDC est présentée dans la figure 13 et discutée ci-dessous.

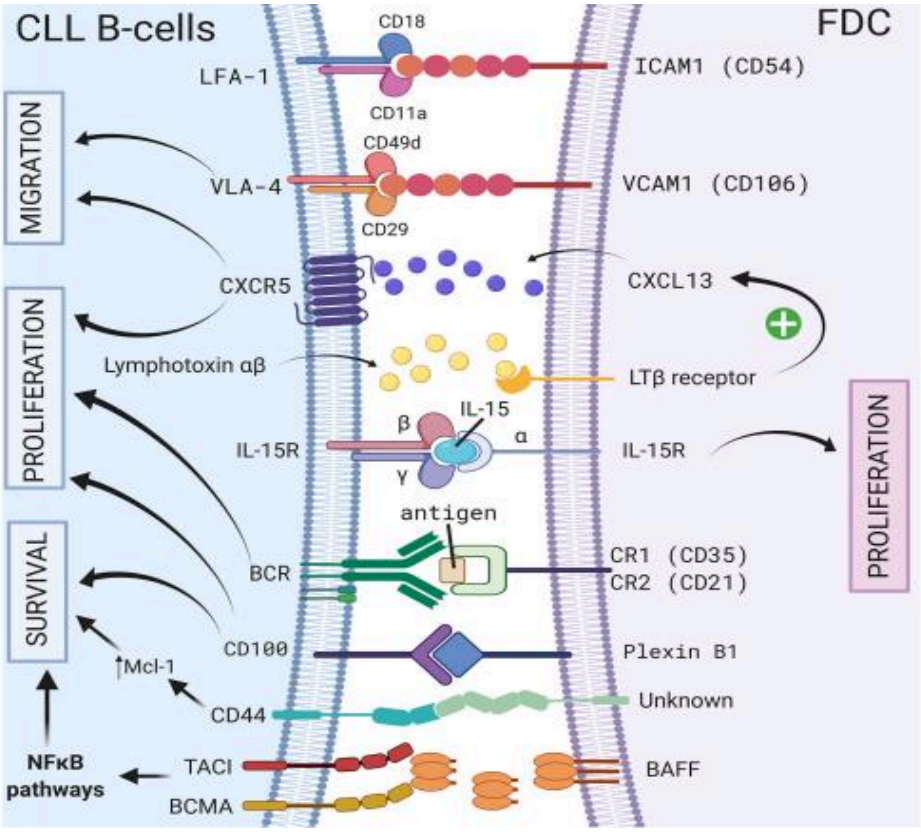


Figure 13 : *Interaction entre les cellules B de la LLC et les FDC par contact direct ou par des facteurs solubles dans les organes lymphoïdes secondaires.*[10]

Il existe un dialogue réciproque entre les cellules leucémiques et les FDC qui permet la rétention et redirection du clone leucémique dans les centres prolifératifs ganglionnaires[175]. A l'échelle moléculaire, ce dialogue implique l'axe CXCR5/CXCL13 qui joue un rôle dans l'orientation et le trafic ganglionnaires des cellules LLC qui expriment le CXCR5. De manière intéressante, les FDC sécrètent le CXCL13 en réponse aux lymphotoxines α et β produites par les cellules LLC elles-mêmes. Par ailleurs, les FDC expriment à leur surface ICAM1 et VCAM1 ce qui favorise leur adhérence aux cellules LLC via leur interaction avec respectivement LFA-1 et VLA4[176].

Une fois en contact, les FDC synthétisent la protéine transmembranaire BAFF qui, par l'intermédiaire des récepteurs BCMA ou TACI, active la voie canonique NF-κB dans les cellules LLC favorisant leur survie[177]. De la même façon, les FDC prolongent la viabilité des cellules LLC et augmentent leur prolifération *via* l'interaction entre CD100 (présent à la surface des cellules LLC) et Plexin-B1 (présent à la surface des FDC)[178].

2.4 Les cellules réticulaires fibroblastiques (FRC)

Les FRC sont des myofibroblastes d'origine mésenchymateuse. Ces cellules peuvent être différenciées des autres cellules résidantes dans les ganglions lymphatiques par l'expression de la Podoplanine (PDPN), du récepteur au PDGFα et l'absence d'expression de CD45 et CD31. Ces cellules expriment également des molécules communes à de nombreux myofibroblastes telles que la desmine, la vimentine, le CD90, le CD73, le CD103, l'α-smooth muscle actin (αSMA) et l'antigène ERTR712. Les FRC expriment également les molécules d'adhésion ICAM1 et VCAM1[173].

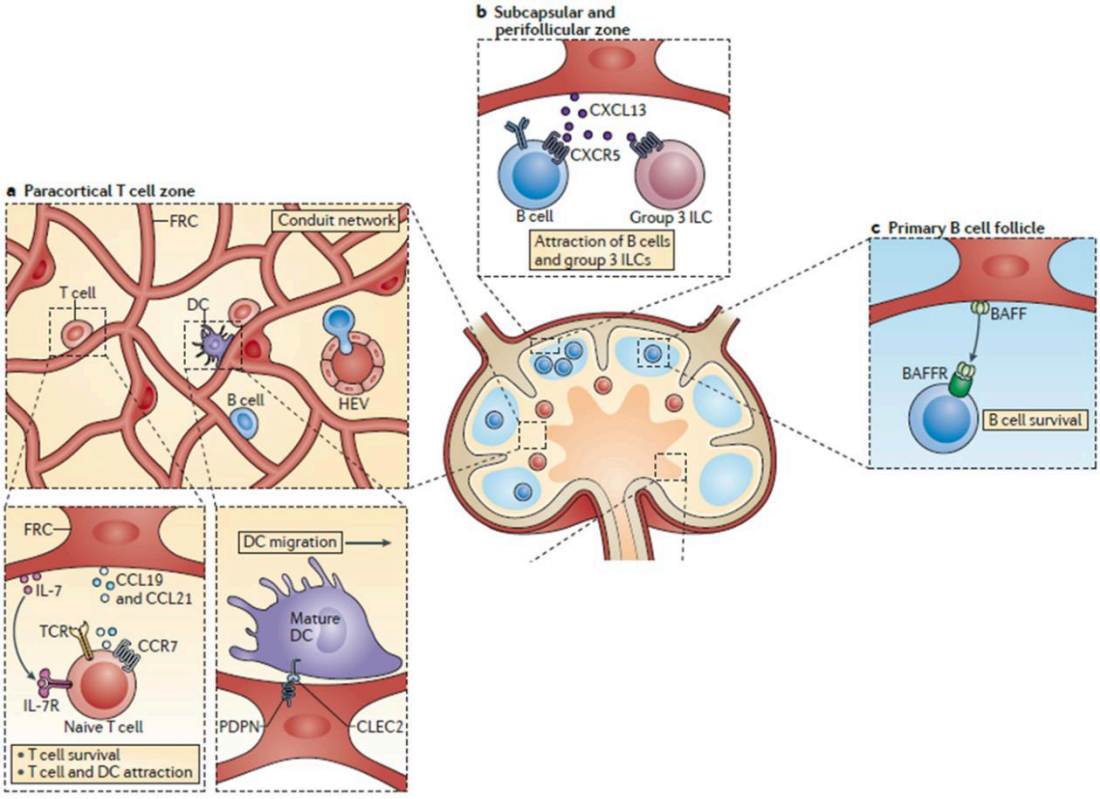


Figure 14 : Rôle des cellules réticulaires fibroblastiques dans les ganglions lymphatiques.[179] ***a)*** *Dans la zone des cellules T du paracortex des ganglions lymphatiques, les FRC attirent les cellules T naïves et les cellules dendritiques (CD) via la sécrétion des ligands CCL19 et CCL21.* ***b)*** *Dans la zone périfolliculaire, les FRC sécrétent le CXCL13 pour attirer les cellules B.* ***c)*** *Les FRC qui résident dans la zone folliculaire, expriment le facteur d'activation des cellules B (BAFF) pour favoriser la survie des cellules B naïves.*

Dans les ganglions lymphatiques, les FRC représentent 20 à 50 % du compartiment non hématopoïétique des ganglions lymphatiques[180]. Ces cellules sont également présentes dans la rate, le thymus et d'autres tissus lymphoïdes. Les FRC jouent un rôle structurel et apportent une flexibilité au ganglion, facilitant ainsi le transport de l'antigène ou des anticorps lors des réponses immunitaires. Entre outre, les FRC jouent un rôle essentiel la compartimentation des cellules B et T au sein du ganglion en orientant leur trafic sous l'influence d'un gradient de chimiokines. En effet, les FRC présents dans la zone T du paracortex sécrètent le CCL19 et le CCL21 pour attirer le cellules T naïves vers cette zone tandis que les FRC de la zone marginale sécrètent le CXCL13 pour attirer les cellules B[181] (figure 14).

En plus de l'implication des FRC dans la tolérance périphérique par l'expression d'auto-antigènes, les FRC sont très réactifs à l'IFN-γ. En réponse à l'IFN-γ, les FRC augmentent la transcription du gène NOS2 codant pour l'enzyme inductible nitricoxyde synthase (iNOS)[184]. Cette enzyme va permettre la production de nitrites qui vont bloquer la progression du cycle cellulaire des cellules T. Ces observations placent les FRC comme des régulateurs de l'activation des cellules T par contact direct avec les cellules T productrices d'IFN-γ [185].

Dans un milieu pro-inflammatoire, les cellules FRC jouent un rôle immunosuppresseur. En effet, en réponse à l'IFN-γ, les FRC synthétisent des molécules immunosuppressives telles que iNOS, IDO-1 et PD-L1. D'autres cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α et l'IL-1β produites par les cellules dentritiques activées conduisent également à l'induction de l'iNOS dans les FRC[184]. De plus, PD-L1 et IDO jouent des rôles importants dans le développement des cellules T régulatrices et des cellules suppressives myéloïdes[181].

Objectifs

Le dialogue entre le microenvironnement tumoral et les cellules LLC est impliqué dans la physiopathologie de la LLC en favorisant la survie, la prolifération et l'accumulation des cellules tumorales dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires.

Dans ce travail nous avons exploré le dialogue bidirectionnel entre la cellule tumorale et son microenvironnement selon deux axes. Le premier axe a consisté à examiner l'impact des cellules stromales sur les cellules B tumorales et à identifier des acteurs de signalisation impliqués dans ce dialogue. Le deuxième axe avait pour objectif d'explorer la capacité des cellules B tumorales à modifier le phénotype et la fonction des cellules stromales.

Dans le cadre du premier axe, notre attention s'est portée sur la β-caténine, une protéine capable de réguler à la fois l'adhérence des cellules et la transcription des gènes de pro-survie. Des travaux réalisés dans notre équipe ont permis de montrer l'implication de cette protéine dans la transcription de cytokines impliquées dans la survie des cellules B du lymphome à cellules du manteau, un lymphome partageant des caractéristiques communes avec la LLC, notamment une forte dépendance du microenvironnement. Sur la base de ces informations, nous avons évalué à l'aide d'un modèle de coculture, l'impact des cellules stromales sur la β-caténine et ses partenaires de signalisation exprimés par les cellules LLC ainsi que son rôle dans l'adhérence des cellules tumorales aux cellules stromales.

Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés à la capacité des cellules LLC à modifier le microenvironnement à leur avantage en induisant une reprogrammation du phénotype des cellules stromales. Sachant que les ganglions représentent les sites préférentiels de prolifération, nous nous sommes demandé si les cellules LLC étaient capables d'orienter les cellules HS-5 vers un profil phénotypique et fonctionnel de type FRC dans le but de soutenir leur prolifération et de créer un environnement propice à un échappement de la tumeur aux mécanismes d'immuno-surveillance.

Résultats

Partie I : Identification de l'axe BTK/β-caténine dans le dialogue entre les cellules B tumorales et les cellules stromales

Alors que les cellules LLC présentent une survie prolongée *in vivo*, elles entrent en apoptose très rapidement *in vitro*. En revanche, leur co-culture en présence de cellules stromales améliore leur survie, mettant en évidence l'influence du microenvironnement sur la survie et la prolifération des cellules LLC. Diverses études ont tenté de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions entre les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement, en particulier les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse (BMSC pour Bone marrow Mesenchymal Stromal Cells), et ceci du fait de leur implication dans différents processus tumoraux tels que la transformation maligne, l'angiogenèse, la formation de métastases, la survie des cellules cancéreuses et la chimiorésistance[186]

Dans ce projet nous nous sommes intéressés à l'étude d'effecteurs participant au dialogue entre les cellules B leucémiques et les cellules stromales. Dans ce but nous avons développé un système de co-culture mimant le microenvironnement et qui consiste à mettre des cellules B tumorales en contact avec des cellules stromales de la moelle osseuse (figure 15).

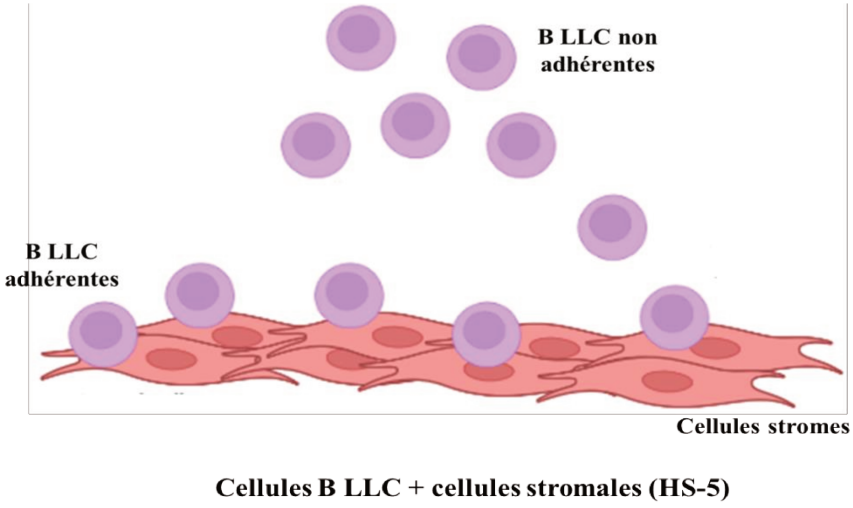


Figure 15 *: Modèle de coculture entre les cellules B de LLC et les cellules stromales HS5. En co-culture, une fraction des cellules LLC adhère aux cellules stromales (B LLC adhérentes) et une autre fraction n'adhère pas et reste en suspension (B LLC non adhérentes).*

Compte tenu de l'hétérogénéité des populations BMSC primaires et de la difficulté de s'en procurer, nous avons fait le choix d'utiliser la lignée cellulaire HS-5 dérivée de la moelle osseuse et qui est disponible dans le commerce. Ces cellules sont en effet connues pour être capable de soutenir la survie de progéniteurs hématopoïétiques[187]. De plus, la comparaison des cellules HS-5 avec des BMSC primaires montre une grande similitude en termes de sécrétion de cytokines impliquées dans le développement tumoral et l'immuno-modulation.[186]

Dans ce contexte nous avons porté notre attention sur la protéine β-caténine comme acteur du dialogue entre les cellules HS-5 et les cellules B tumorales. La β-caténine est une protéine multifonctionnelle dont le taux intracellulaire est finement régulé. En absence de stimulus, la β-caténine cytoplasmique est rapidement dégradée ou bien séquestrée au niveau de la membrane plasmique où elle régule l'adhésion cellulaire. En revanche, en réponse à un stimulus, le processus de dégradation est inhibé, la β-caténine est stabilisée et se transloque dans le noyau pour réguler la transcription des gènes cibles.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à un modèle de syndrome lymphoprolifératif proche de la LLC, le lymphome à cellules du manteau (MCL). En effet, comme pour la LLC, le développement du MCL dépend fortement de l'interaction avec le microenvironnement et de la signalisation du BCR. Nous avons précédemment observé que la co-culture avec les cellules primaires BMSC soutient la survie des cellules MCL et cette survie est accrue lorsque les cellules MCL adhèrent aux cellules stromales. De plus, la pré-stimulation du BCR des cellules MCL favorise leur adhérence aux cellules stromales[188]. Pour mieux comprendre le lien entre la stimulation du BCR et les capacités d'adhérence des cellules tumorales, nous avons porté notre attention sur la β-caténine, une protéine capable à la fois de favoriser l'interaction cellule-cellule mais aussi de réguler la transcription de gènes pro-survie. Nous avons montré que la stimulation du BCR stabilise la β-caténine dans les cellules MCL et que ce processus dépend de la kinase BTK car son inhibition par l'Ibrutinib supprime la stabilisation de la β-caténine. De plus, nous avons observé que la β-caténine est partenaire du facteur de transcription NF-KB pour la régulation de gènes pro-survie tels que l'IL-6 (voir article en annexe)[189].

Dans les cellules LLC, la β-caténine est fortement stabilisée à la suite de leur co-culture avec les cellules HS-5. La stabilisation de la β-caténine en réponse à la co-culture nous a amené à étudier son rôle dans deux processus cellulaires que sont la migration et l'adhérence et qui sont susceptibles de résulter de l'augmentation du taux de β-caténine. De façon intéressante lorsque la β-caténine est surexprimée, les cellules LLC adhèrent de manière plus importante aux cellules stromales. En parallèle, nous nous sommes intéressés à la tyrosine kinase BTK, connue pour son rôle clé dans la voie du BCR et qui constitue une cible majeure dans les stratégies thérapeutiques

visant plusieurs lymphomes dont la LLC. Dans cette étude, nous avons mis en évidence un lien fonctionnel entre BTK et la β-caténine dans le dialogue entre les cellules LLC et les cellules stromales. Comme pour les cellules MCL, le traitement des cellules LLC par l'ibrutinib empêche la stabilisation de la β-caténine observée en co-culture. De plus, des expériences d'immunoprécipitation réalisées après co-culture indiquent que la β-caténine et BTK appartiennent au même complexe moléculaire. Nos résultats ainsi que ceux montrant que le traitement par l'ibrutinib inhibe l'adhérence des cellules LLC aux cellules stromales, suggèrent que BTK et la β-caténine coopèrent pour favoriser l'adhérence des cellules LLC aux cellules stromales du microenvironnement tumoral (article soumis : *Identification of the axis BTK-β-catenin in the cross-talk of tumor cells with the microenvironment in Chronic lymphocytic leukemia*).

Identification of the axis BTK-β-catenin in the cross-talk of tumor cells with the microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia

Imane Mihoub[1,2$] Tareck Rharass[1,2$], Souhaïl Ouriemmi[1,2], Christine Le Roy[1,2], Antonin Oudar[1,2], Valérie Gratio[3], Gregory Lazarian[1,2,4], Elisabetta Dondi[1,2], Florence Cymbalista [1,2,4] , Vincent Levy[5], Fanny Baran-Marszak[1,2,4], Nadine Varin-Blank[1,2,*], Dominique Ledoux[1,2,#] and Laura Gardano[1,2#*]

[#] These authors share the senior authorship of this paper.
[$] These authors contributed equally to this paper.
[*]Corresponding authors: Dr Laura Gardano, laura.gardano@univ-paris13.fr ; Dr Nadine Varin-Blank, nadine.varin@inserm.fr

Affiliations
[1]INSERM, U978, Bobigny, France
[2] Université Paris 13 - « Sorbonne Paris Nord », UFR SMBH, Labex INFLAMEX, Bobigny, France
[3]INSERM U1149-Université Paris Cité, Hôpital Bichat, Paris, France;
[4] AP-HP Hôpital Avicenne, Bobigny, France
[5] URC, APHP, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

Abstract

In Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), the development and maintenance of the tumor bulk depends on the interaction between malignant B cells and their microenvironment. Regulated by the cross-talk of the tumor cells with the microenvironment, the β-catenin is stabilized and translocates into the nucleus to regulate gene transcription. In absence of stimuli, β-catenin is constantly degraded unless sequestered at the plasma membrane where it regulates cell adhesion. We found that in co-cultures of CLL cells with HS-5 stromal cells, used to mimic the tumoral microenvironment, both of these β-catenin activities are employed by CLL cells. In adherent cells to stromal cells, β-catenin level is low and mainly excluded from the nucleus. In CLL cells that do not adhere to stromal cells, β-catenin is stabilized to translocate into the nucleus and regulate gene transcription. BTK, a kinase effector downstream of B Cell Receptor and chemokines activation, is responsible for β-catenin stabilization and the two proteins belong to the same molecular complex. In addition, overexpression of β-catenin in CLL cells induces cell adhesion without affecting migration, making this protein a regulator of the equilibrium between cell adhesion *versus* non-adhesion to the stromal component.

Introduction

In Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), the accumulation and proliferation of CD19/CD5 positive B cells largely depend on the interaction with the stromal microenvironment. The latter is composed of cells and their secreted factors that allows the proliferation and

development of tumor cells [1]. In CLL, several signaling pathways are involved in transducing the survival signals from the microenvironment, such as Wnt, Notch and TLR [2].

Because the Wnt signaling pathway transduces signals for cell survival, migration and adhesion, it has received much attention in CLL in recent years [3]. Wnt signaling elements are often mutated in CLL cells, albeit none of the mutations are drivers of the disease [4,5]. However, mutations that invalidate genes that codify for Wnt signaling transducers, including β-catenin, aggravate the CLL phenotypes indicating that this pathway has an important role in the features of this disease [4]. Wnt refers to a family of 19 glycoproteins that interact with cellular receptors to initiate signaling cascades to control cell proliferation, migration and differentiation [6]. The Wnt signaling pathway can be distinguished into canonical and non-canonical based on the dependence on the protein β-catenin as signaling effector [6]. The non-canonical signaling pathway involves membrane proteins that mainly control planar cell polarity (PCP) [7]. In CLL, the ligands Wnt5A and Wnt5B, which regulate the non-canonical Wnt/PCP pathway, and their effectors are overexpressed and they regulate the communication of CLL cells with the microenvironment [8]. In addition, Wnt5a enhances CLL chemotaxis towards CXCL12 [9,10,11]. On the other hand, the canonical signaling pathway depends on β-catenin that is stabilized in response to Wnt ligands and translocates into the nucleus where it participates to the transcription of genes involved in cell cycle regulation, proliferation and migration [12]. In absence of Wnt ligands, β-catenin is degraded by the proteasome upon the phosphorylation by Casein Kinase I on serine residue (S45) followed by GSK3β on S33, S37 and T41 [13]. According to the model, Wnt ligands inhibit GSK3β activity decreasing the phosphorylation and degradation of β-catenin [13]. Upon translocation into the nucleus, β-catenin interacts with the TCF/LEF family of transcription factors and activates the transcription of Wnt-dependent target genes. However, the interaction of β-catenin with nuclear partner is not limited to the TCF/LEF family as other transcription factors, *e.g*. Sox, FOXO and NF-κB are known to interact with β-catenin in a Wnt dependent and independent fashion [14]. Previously, we showed that, in Mantle Cell lymphoma cells (MCL), β-catenin is a BCR effector as it is stabilized in a BTK-dependent manner upon antigenic stimulation [15]. Its translocation into the nucleus contributes to the transcription of NF-κB target genes such as IL-6 increasing the survival of MCL cells. In parallel to the implication in the Wnt signaling pathway, β-catenin covers other functions, such as the stabilization of cellular junctions by

the interaction with the intracellular domain of cadherins [16]. The interaction between β-catenin and cadherins has been described having both a positive and a negative role on its transcriptional behavior depending on the cell type [17,12,18]. Cadherins mediate homo and heterotypic inter-cellular interactions although they can also affect signaling pathways where ligands and receptors are exposed at the cell surface of interacting cells, *e.g.* Notch/Delta [19]. In a model of co-culture of CLL cells with bone marrow stromal cells, stromal Notch2 was shown to contribute to β-catenin stabilization in CLL cells through the upregulation of N-cadherin to reinforce the interaction of tumor cells and the microenvironment for the transduction of survival signals [20]. In CLL cells, the kinase BTK integrates signals from the microenvironment as downstream effectors of several chemokines, such as CXCL12[21]. Stimulation of CXCR4 by its ligand CXCL12 leads to a very rapid phosphorylation of BTK followed by integrin activation that increases migration and adhesion of CLL cells to VCAM-1 expressed at the surface of the cells of the microenvironment [22] . The activity of BTK is controlled by its phosphorylation status, whereby the Lyn-dependent phosphorylation of the tyrosine residue located at the position 551 in the C-terminus (Y551) primes for its autophosphorylation on the Y223 in the SH3 domain, which fully activates BTK catalytic activity [23]. However, BTK kinase activity is not required for all of its roles, thus indicating that BTK behaves also as an adapter molecule [24].

As two elements that can transduce signals from the microenvironment, we explored the role of β-catenin and BTK in CLL cells in a model of co-culture with human stromal cells (HS-5). Stromal cells are known to support the survival of CLL cells contributing to the tumor maintenance [25,26,27]. When co-cultured with stromal cells, a fraction of CLL cells firmly adhere to stromal cells whereas another fraction does not. In the cells of the latter fraction, β-catenin is upregulated and accumulate into the nucleus. Conversely, in adherent CLL cells, β-catenin is not increased and only the membrane fraction is detectable in these cells, suggesting a role on cell adhesion. This model is supported by the observation that overexpression of β-catenin in CLL B cells, increase their adhesion to the stromal component. Thus, β-catenin represent an important element that regulates the balance of adhesion of CLL cells to the microenvironment.

Results

1. BTK and β-catenin impact cell morphology in CLL cells co-cultured with stromal cells

CLL cells rely on the interaction with the microenvironment for their survival and tumor maintenance. To dissect the molecular basis of the communication of tumor cells with the microenvironment, we used a validated co-culture system to reproduce *in vitro* the microenvironment where CLL cells can survive [25]. When co-cultured with a bone marrow cell line (HS-5), a fraction of primary B CLL cells adhere to the stromal component (referred as adherent cells) whereas other cells remain in suspension over the feeder layer (referred as non-adherent cells). The protein kinase BTK, which is a downstream effector of BCR activation and of several chemokines, affects cell adhesion, migration and membrane dynamics inducing the formation of membrane ruffles in different cell types through the activation of Rac and Cdc42 [28]. β-Catenin is known to regulate cell adhesion bridging cadherins to the actin cytoskeleton but also localizing in the ruffles to regulate cell migration [18]. When we labelled BTK and β-catenin in Mec-1 cells upon two hours co-culture. We observed that adherent cells form protrusions containing BTK and β-catenin whereas the cells that do not adhere maintain a rather round shape (**Figure 1A**, left side). This morphology phenotype is recapitulated by the shape factor, which defines cell circularity, and that is significantly lower in adherent cells versus non-adherent cells (**Figure 1A**, right side). The change of cell morphology was also observed by labelling actin with fluorescent phalloidin. CLL B cells that adhere to stromal cells adopt a morphology with protrusions or ruffles, as visualized by actin labeling with fluorescent phalloidin (**Figure 1B**).

To explore a potential link between BTK and β-catenin in cell morphology regulation, we transfected a plasmid carrying the sequence of human BTK gene and checked for its expression in cell lysates. We used HEK293T cells that do not express BTK at a detectable level but express endogenous β-catenin as observed by western blot (**Figure 1C**). BTK was activated in these cells as verified by the signal of the phosphorylated form on Y223 (**Supplementary fig S1**). In basal condition, BTK may not affect β-catenin stability as its amount did not change upon BTK transfection (**Figure 1C**). Transfected BTK had a diffuse cytoplasmic localization and no particular membrane enrichment was observed in HEK293T cells (**Supplementary figure**

S1). The plasmid containing human BTK possesses an IRES GFP cassette to select for transfected GFP positive cells. By confocal microscopy, BTK transfected-GFP-positive cells appeared with long extensions that may contain β-catenin as compared to non-transfected cells (**Figure 1D**). GFP distribution was used to trace the cell contour and calculate the shape factor that was significantly lower in BTK transfected cells *versus* cells transfected with a GFP-control plasmid (**Figure 1E and Supplementary figure S1**). Interestingly, the phenotype associated to BTK transfection was rescued upon depletion of β-catenin using a mix of five siRNAs targeting sequences on the mRNA of β-catenin (**Figure 1E** and **Supplementary figure S1**). The sole depletion of β-catenin by siRNA did not have any consequence on cell morphology, as shown by the unchanged shape factor as compared to the mock GFP condition (**Figure 1E and Supplementary figure S1**). These data indicate that a cooperation between BTK and β-catenin affect cell morphology.

2. β-catenin level and its cellular localization differ in adherent *versus* non-adherent CLL cells to stromal cells

As β-catenin has a different role according to its cellular localization, *i.e.* favoring adhesion when it is at the plasma membrane or regulating transcription when in the nucleus, we sought to determine whether β-catenin could play a role in regulating the balance between adherent and non-adherent cell behavior. As non-adherent cells, CLL cells have a low amount of β-catenin, so we verified that the commercial antibody against β-catenin was able to detect this protein in our model. We treated a CLL cell line, Mec-1, with LiCl, known to increase β-catenin level by inhibiting GSK-3β. Indeed, the percentage of β-catenin positive cells among Mec-1 increased upon LiCl treatment (**Supplementary figure S2**). By flow cytometry, β-catenin was detected in a lower percentage of Mec-1 cells that adhered as compared to Mec-1 that did not adhere to stromal cells (**Figure 2A**). These results were reproduced in another CLL cell line, Hg-3, shown in **Supplementary figure S2**. After, we sought to determine whether the localization of β-catenin in the fraction of CLL cells adhering to stromal cells was different to that of cells that do not interact with the stromal component. By image and flow cytometry technology that allows colocalization studies between two fluorescent markers (ImageStream

MK2, Luminex), we found that in the adherent fraction, a lower percentage of cells had β-catenin in the nucleus as compared to the cells in the non-adherent fraction (**Figure 2B**).

The different amount of β-catenin in the two cell pools suggests two different signaling situations: in adherent cells, as in absence of Wnt or other stimulations, cytosolic β-catenin is constantly degraded, leaving intact only the membrane localized β-catenin; in non-adherent cells β-catenin is stabilized likely in response to a soluble ligand and it translocates into the nucleus.

3. β-catenin stabilization is BTK-dependent

To achieve a better insight into the dynamics of β-catenin in primary CLL cells non-adhering to stromal cells, we established a kinetic of co-culture and analyzed by western blot the levelof β-catenin at different time points. β-catenin increased already after 15 min of co-culture, reached maximum stability at 30 minutes and persisted up to 2 h (**Figure 3A**). In addition to primary cells, we observed β-catenin stabilization in Mec-1 and Hg-3 (**Supplementary figure S3**). To ascertain that the increase of β-catenin concerned only B cells and it was not the resultof a contamination of stromal cells β-catenin, we performed the kinetics with conditioned medium (CM) issued from a 24 h culture of HS-5 and observed a similar stabilization of β- catenin as in presence of stromal cells (**Figure 3B**). These results indicate that soluble factors in the HS-5 supernatant triggered β-catenin stabilization in CLL cells. We previously observedthat in MCL, another lymphoproliferative disorder characterized by a strong dependence on the microenvironment, the stabilization of β-catenin upon BCR stimulation was linked to BTK activity [15] (Lazarian et al, 2019). Mirroring this mechanism, when primary CLL cells were pre-treated for one hour with 100 nM of Ibrutinib, a potent BTK inhibitor, before the co-culture, the increase of β-catenin triggered by the co-cultured was blocked, indicating that, in presenceof stromal cells, BTK participates to β-catenin stabilization (**Figure 3C**). The results obtained in presence of Ibrutinib suggest that BTK kinase activity was involved in β-catenin stabilization. However, when we checked the phosphorylation status of BTK in CLL cells at different incubation time points with conditioned medium, we did not observe a significant increase of the pBTK (Y223) positive cells likely because in the majority of samples tested, the percentageof pBTK positive cells was already quite high and a further increase was not attainable (**Figure**

3D and **Supplementary Figures S3**). Nevertheless, the interconnection of BTK and β-catenin was offered by the results of the treatments with recombinant CXCL12, a known cytokine which signals through BTK and secreted by stromal cells [22],[29]. By western blot, we observedthat recombinant CXCL12 increased β-catenin level (**Figure 3E**). Thus, CXCL12 is likely to be one of the soluble factors that lead to β-catenin stabilization, *via* BTK. In addition, immunoprecipitation of β-catenin from CLL cell extract upon 1 h of co-culture with stromal cells, showed that β-catenin and BTK belonged to the same molecular complex. Interestingly, no signal for BTK was detected in the immunoprecipitate from CLL cells in absence of stromalcells (**Figure 3F**).

Altogether, these results indicate the collaboration of β-catenin and BTK in the transduction of signals from the microenvironment in CLL cells.

4. β-catenin stabilization induces tumor cell adhesion to stromal cells

In the canonical Wnt signaling pathway, β-catenin stabilization associates with a decrease of the GSK-3β– dependent triple phosphorylation on the residues S33, S37 and T41. Accordingly,in our model of co-culture, the increased stability of β-catenin observed in primary CLL cells in presence of stromal cells corresponded to a decrease of the signal for its triple phosphorylation (**Figure 4A**). When we overexpressed wild type β-catenin in our experiments,we were not able to observe any increase of the signal for β-catenin likely because the recombinant protein was submitted to the same post-translational regulation as the endogenous one and constantly degraded (**Figure 4B**). To circumvent this natural regulation, we constructed a mutant β-catenin (S45A) that could not be phosphorylated by CKI nor by GSK-3β, and that, eluding its proteasomal degradation, accumulated in the cells as shown in Hg-3 or Mec-1 transfected with this mutant (**Figure 4B, C** and **Supplementary figure S4)**. As β-catenin stability and cellular distribution is regulated by other phosphorylation sites, we observed that the mutant S45A β-catenin was phosphorylated on the Y654, known to weakenthe interaction with cadherins (**Supplementary figure S4**). Interestingly, Ibrutinib treatment decreased the signal for phospho-Y654, indicating that BTK is responsible for this phosphorylation as previously suggested in other models [30]. To analyze β-catenin subcellulaur localization we used a cell fractionation protocol on S45A- β-catenin transfected Hg-3 (**Figure 4D**) and Mec-1 (not shown). β-catenin accumulated into the nucleus, albeit the majority of the protein remained in the cytosol. We observed that S45A-β-catenin transfectedHg-3 cells interacted more strongly with stromal cells as shown by the higher percentage of β-catenin transfected cells collected with stromal cells after 4 h

of co-culture (**Figure 4E**). However, no modification of the migration properties was observed in presence of the stable form of β-catenin when transfected Hg-3 were seeded in the upper compartment and let migrate towards the lower chamber in presence of CXCL12 or stromal cells (**Figure 4F**). In these migration experiments, HS-5 cells were unable to induce cell migration in the conditionstested, in agreement with hMSCs having an inhibitory effect on the migration of B cells [31]. Interestingly, upon migration, a higher proportion of CXCR4-positive cells was found in migrated S45A-β-catenin transfected cells as compared to the control condition but only whenstromal cells were present (**Supplementary figure S4**). These results suggest that β-catenin does not intervene in cell migration but it affects the strength of adhesion of CLL B-cells to stromal cells.

As S45A-β-catenin localizes also in the nucleus we inquired a β-catenin dependent transcriptional activity. The transcription of Axin-2, the Wnt/ β-catenin-regulated gene in themajority of cell types, remained unchanged irrespective of the presence of S45A- β-catenin transfected cells or the co-culture with stromal cells (**Figure 4G**). The non-induction of Axin-2was recapitulated in primary cells whereby, the co-culture with stromal cells had rather the tendency to decrease the transcription of this gene, albeit in a non-significant manner(**Supplementary figure S4**). We tested the transcriptional induction of other genes, Cyclin D1and c-Myc, Dll 1 and Hes 1, known to be regulated by transcription factors that are partners of β-catenin such as TCF, Notch and NF-κB. Among all the genes tested, only Cyclin-D1 showedto be induced by the co-culture and by S45A-β-catenin but only when stromal cells were present (**Figure 4H and supplementary figure S4**). This result implies that β-catenin has a transcriptional activity to induce cell cycle regulator genes in CLL cells and that this activity is regulated by the microenvironment.

Discussion

β-catenin is at the core of the canonical Wnt signaling pathway whereby it translocates into the nucleus to take part to the transcription of survival genes, including Axin2 and Cyclin D1 [6]. However, β-catenin has also an important structural role at the cell membrane to stabilizethe cell to cell contacts in collaboration with cadherins. There is no consensus on the interplaybetween the two pools of cellular β-catenin and the regulation of the two roles [17]. In some cases, the membrane β-catenin seems to decrease the available β-catenin to translocate intothe nucleus and in others the two pools do not seem to compete [18,32]. In CLL cells, Wnt signaling pathway received

much attention as Wnt ligands are present in the microenvironment and they are also secreted by CLL cells [33]. Furthermore, mutations in Wnt signaling effectors enhance the cell survival and resistance to apoptosis of CLL cells [4].

In this study, we focused on the role of β-catenin in CLL cells when they are co-cultured with bone marrow stromal cells (HS-5) to mimic the microenvironment. CLL cells divide into two fractions upon co-culture: a pool of cells adheres to the stromal component while a pool remains in suspension. In non-adherent cells, β-catenin is rapidly stabilized and it translocatesinto the nucleus without inducing the transcription of Axin2 nor c-Myc, two Wnt regulated genes. As β-catenin can associate to several transcription factors, we checked for the transcription of genes controlled by Notch (Dll) or NF-κB (Hes) but no significant transcriptional induction was observed. Among the tested genes, the only one that is inducedby the co-culture and by the overexpression of β-catenin is Cyclin-D1, which is also a known Wnt/β-catenin-target gene, although it can be regulated by other transcription factors, such as NF-κB or STAT3 among others [34]. This increase of Cyclin-D1 by the co-culture and by β- catenin stabilization could explain the enhanced survival of CLL cells in presence of stromal cells; it certainly indicates that β-catenin possesses a transcriptional activity in suspension cellsover stromal cells. Further studies are required to gain a deeper insight into β-catenin contribution to transcription in CLL cells. We cannot rule out that, even in adherent CLL cells to stromal cells, there is a transcriptional activity of β-catenin. However, from the ImageStream results, in the adherent fraction the percentage of cells where β-catenin was detected into the nucleus is quite low. More generally, the amount of total β-catenin in these adherent cells is dim, suggesting that in adherent CLL cells, β-catenin is degraded in the destruction complex as it occurs in absence of Wnt or other stabilizing stimuli. Nevertheless, β-catenin stabilization favors the adhesion to stromal cells because the overexpression of β-catenin increases the portion of CLL cells that are recovered with the stromal component. CLLcells that adhere to stromal cells show ruffles as a sign of the reorganization of adhesion structures. Different observations seem to involve different B cell signaling pathways in the behavior of β-catenin. First, β-catenin interacts with BTK in CLL cells in presence of stromal cells. Second, Ibrutinib, an irreversible BTK inhibitor, opposes to β-catenin stabilization. Third, our group previously published the interaction between Vav1, a GTPase exchange factor (GEF)for Rho family of GTPases, expressed in hematopoietic cells, and β-catenin to affect its phosphorylation status, cellular distribution and cell morphology in a manner that is similar to what we reported for BTK in

this work [35]. Fourth, β-catenin interacts with Syk which is responsible for its phosphorylation on the Y142 and Y654 as we also observed for BTK in our model [36]. All these elements can be grouped into a model whereby the B cell signaling complexes, regulated either by chemokines or the BCR activation, affects β-catenin dynamics that ultimately tunes the balance between adhesion/transcription activities in these cells. A soluble factor, such as CXCL12, binding to its cognate receptor and activating BTK, leads to an increase of β-catenin and induces its transcriptional activity but also its accumulation at the cell membrane. The membrane β-catenin favors the interaction of CLL cells with stromal cells, most likely through its interaction with cadherins, reported to be augmented by the co-culturewith stromal cells [20]. In fact, whereas it is known that the CXCL12/CXCR4/BTK axis upregulatesthe integrin expression at the cell surface, we did not find a higher integrin expression when we overexpressed β-catenin in CLL cells (data not shown). It is challenging to establish whetherthe interaction of CLL and stromal cells is stable or transitory. Previous work in Jeko-1 cells, anMCL cell line that interacts with stromal cells in a similar fashion as CLL cells, suggested the existence of two distinct cell pools for their ability to interact with the stromal component [27].By flow cytometry, we were unable to distinguish two distinct cell populations based on β- catenin content to predict whether a cell would adhere to the stromal component or not. Rather, the distribution of β-catenin labeling seems to suggest a variable amount in CLL cells.Thus, it is tempting to suggest that the adhesion/detachment of CLL cells to the stroma is a transitory behavior linked to the fluctuation of β-catenin level dictated by the stimuli that cellsreceive from the microenvironment. The increase of β-catenin is important for cell adhesion to the stromal component, as Ibrutinib treatment that interferes with β-catenin stabilization also opposes to cell adhesion to the stromal component of the microenvironment. We were unable to knock down β-catenin in CLL cells because their survival was impacted underlining that β-catenin has a role in maintain the survival of CLL cells. Likely, β-catenin-dependent stabilization of the contacts between the tumor and the stromal cells initiate signalingcascades that are controlled by cell-cell contacts and mechanical cues, *e.g.* Notch or Hippo signaling pathways and that are regulators of cell proliferation and survival. However, once CLL cells adhere to the stromal component, the destruction complex could be reactivated by a negative feedback or mechanotransduction, leading to the decrease of cytosolic β-catenin. Other changes must occur to impact the association between β-catenin and cadherin favoringthe release of the CLL cells from the stromal cells. β-catenin phosphorylation on Tyrosine Y654decreases its affinity for cadherins

helping on one hand its transcriptional activity but, potentially a decrease of adhesion capacity by removing β-catenin from the membrane. BTK is responsible for Y654 phosphorylation in our model, thus making this kinase an element of the fine tuning of β-catenin amount, localization and activity.

This work defines a new axis BTK-β-catenin that regulates the cross-talk between tumor cellsand the microenvironment and that can be targeted by Ibrutinib. Furthermore, β-catenin is an important effector that, having functions in cell adhesion and signal transduction, intervenes in the balance between adhesion and signal transduction in response to soluble factors but also mechanical cues. It is important to enrich the model of communication of CLLcells with their microenvironment because, although therapeutic strategies to target this communication are successful, resistance towards treatment can develop. Thus, finding target to elude this resistance will allow an efficient control of a disease that still remains incurable to this day.

Materials and methods

Primary cells and cell lines culture, co-cultures and conditioned medium

Primary cells were obtained from the Hospital Avicenne (Bobigny, France). All patients provided written informed consent, validated by the Ethics Committee from the Avicenne

Hospital in accordance with the Declaration of Helsinki. The information about the patients samples used in this manuscript are collected in Supplementary table 1. Primary B-cells were isolated from fresh blood samples with the Pan B cells isolation kit (Miltenyi Biotech) accordingto manufacturer's instructions. The isolated B cells were maintained in RPMI medium supplemented with 10% of Fetal Calf serum (FCS), Penicillin/Streptomycin and Glutamine, andcultured at 37°C with 5% CO_2 or stored frozen in liquid nitrogen in a medium constituted of 10% DMSO in FCS.

Mec-1 and Hg-3 were purchased from DSMZ (Germany) and these cell lines were cultured as described for primary tumor B cells. HEK293T cells were cultured in DMEM supplemented with 10% of FCS, Penicillin/Streptomycin and Glutamine and maintained at 37°C with 5% CO_2.For co-cultures the ratio between HS-5 and B-cells was 1:5. Stromal cells were plated 24 hoursbefore the co-culture. Ibrutinib (Selleck) was used at 100 nM. Primary CLL cells were pre- treated with Ibrutinib for one hour prior to co-culture or resuspension in conditioned medium.Conditioned medium was

obtained from a confluent plate of HS-5 that were plated 24 hours before the experiment.

Western blot, cell fractionation and immunoprecipitation

Cells were lysed in a lysis buffer containing 50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP-40, 5mM EDTA, 10% glycerol supplied with protease and phosphatase inhibitors (Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin, PMSF, NaF, Sodium Orthovanadate). Cell lysate were sonicated with 5 cycles of 30 sec ON and OFF pulses at high amplitude. After clearing by centrifugation, the protein extracts were assayed by the Bicinchoninic Acid assay (BCA, Pierce, France) according to the manufacturer's instructions. Thirty μg of total proteins were added of Laemmli buffer and boiled before loading on SDS-PAGE gels. After the proteins transfer, membranes were blocked with 5% skimmed milk in TBS 0.1% Tween-20 prior to incubation overnight with primary antibodies in 2.5% skimmed milk in TBST at 4°C. The following antibodies were used for all the experiments: monoclonal mouse anti β-catenin (BD Biosciences), monoclonal mouse anti-β-tubulin (Sigma Aldrich), rabbit anti-pS33, S37, T41 β-catenin and anti-BTK (Cell Signaling Technology). The incubation with the secondary antibody, HRP conjugated goat anti- mouse or anti-rabbit immunoglobulins (Bio-Rad) was performed at room temperature for 45min in 2,5% skimmed milk in TBST. The signal of the chemiluminescence was revealed by
Clarity ECL western blot substrate (Bio-Rad) and the images of the membrane acquired by a Gel-Doc EZ Imaging system (Bio-Rad).

Cell fractionation was performed with the Subcellular Cell fractionation kit (Pierce, Thermofisher) according to the manufacturer's instructions starting from 10×10^6 of primary purified CLL B cells or 2.5×10^6 Mec-1 cells. Total proteins of each fraction (membrane, cytoplasmic and nuclear) were extracted and protein concentration was determined using theBCA protein assay kit (Pierce).

Twenty million cells were used for each immunoprecipitation (IP) experiment. For each IP, 1 mg of total proteins was used. Two μg of antibody were pre-incubated with magnetic beads, Dyna beads protein A (Life technologies) for 4 h in a washing buffer containing 50mM Tris-HClpH 7.4, 150mM NaCl, 0.1% NP-40, 5mM EDTA, 10% glycerol and 5% BSA. The lysates were incubated with the beads and antibody overnight at 4°C on a rotating wheel. After five washes,the beads were resuspended

in Laemmli buffer prior to migration on 8% acrylamide gel for SDS-PAGE. The antibody against BTK used in the immunoprecipitation was the same as for the western blot, rabbit anti-BTK (Cell Signaling Technologies) and the negative control was performed with 2 μg of Isotype rabbit IgG (Diagenode, Belgium).

Confocal and Fluorescence Microscopy

Cells grown on glass coverslips pre-coated with poly-D-lysine (Sigma) were fixed 20 min with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) and 4% sucrose (Sigma) followed by 10min of quenching with 50 mM NH_4Cl (Sigma) and 5 min of permeabilization with 0.2% Triton X-100 (Sigma) at RT. Non-specific binding sites were blocked 1 h with 1% gelatin (Sigma). Cellswere incubated 1h with primary antibodies diluted in the permeabilization buffer in a humidified chamber as follows: mouse anti-β-catenin (BD Transduction Laboratories; dilution1:50); rabbit anti-BTK (Cell Signaling Technology; dilution 1:100). After rinsing steps with gelatin, the following secondary antibodies were loaded during 45 min: anti-rabbit or anti- mouse Alexa Fluor 488; anti-rabbit or anti-mouse Alexa Fluor 647 (all Invitrogen; dilution 1:300). Nuclei and actin filaments were respectively stained with Dapi and Alexa Fluor 546 phalloidin (Invitrogen; 0.3 μM, 45 min). To prevent any antibody leakage, an additional post-

fixation step was performed with 2% paraformaldehyde and 2% sucrose for 10 min followed by a quenching step with 50 mM NH_4Cl for 5 min. Coverslips were mounted using Prolong™ glass antifade mountant (Molecular probes-Thermofisher scientific).

3D imaging was performed using a Zeiss LSM 780 confocal microscope system equipped witha Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 objective. Fluorescent images were also acquired with a Zeiss Axio Observer D1 inverted phase contrast fluorescence microscope using an EC Plan-Neofluar 100x/1.3 oil DIC objective (all Zeiss).

Flow cytometry and ImageStream

CLL-B cells were labelled by anti-CD19-PE-Cy7 (BD Biosciences) and HS-5 by anti-CD90-PE-Cy5(BD Biosciences). For intracellular labelling of β-catenin the BD Cytofix/Cytoperm kit was usedaccording to the manufacturer's instructions. After fixation for 20 min, cells were washed with the permeabilization solution and incubated with anti-β-catenin conjugated to Alexa488 or anti-β-

catenin APC conjugated (BD Biosciences) for 1 h before acquisition on a Canto II cytometer (BD Biosciences). A control with extracellular labelling alone was used as FMO (Fluorescence Minus One) to establish the positivity of the intracellular staining. For the labelling of pBTK, Alexa488 anti-pBTK (Y223) (BD Biosciences) was used after a fixation for 20min in paraformaldehyde 2% in PBS at RT followed by permeabilization with a buffer containing 0,5% saponin (Sigma Aldrich), 1% bovine serum albumin in PBS 1X for 30 min at RT.Cells were incubated with pBTK for 1 h at 4°C.

For the analysis on the ImageStream (Luminex) the protocol was the same as for the intracellular staining but Dapi (dilution 1/10 000) was added 5 min before acquisition. Statistical analysis was done using the nuclear translocation predefined template of the Ideas software after the establishment of a compensation matrix.

Transfection and Cell Adhesion Assay

HEK293T cells were plated the day before transfection to reach 70% confluence on the day of transfection. Trans-IT (Mirus) was used to transfect HEK293T cells with 2.5 μg of DNA with the plasmid SFVL containing the coding region of human BTK was a gift from Pr. S. Stilgenbauer (University of Ulm, Germany). For the knock-down of β-catenin in HEK-293T cells, a mix of 5

siRNAs against β-catenin (Santa Cruz sc-29209) (50 nM) were transfected using Trans-IT as described. A control siRNA (Santa Cruz sc-37007) was transfected with the same procedure asfor β-catenin siRNA.

The plasmid pcDNA3.1 containing the coding region wild type β-catenin was a gift from Dr. E. Fearon (Addgene #16828). The S45A mutant was generated by site directed mutagenesis. A total of 7.5×10^6 Hg-3 cells were co-transfected with either 10 μg of pcDNA-S45Aβ-catenin, or the control plasmid, and 1 μg of pmax GFP provided with the Amaxa Kit using the Amaxa B cell line Nucleofector Kit V following the manufacturer's instructions with the U-14 program (Amaxa Lonza, Cologne, Germany). Twenty four hours after nucleofection, 5×10^6 Hg-3 cells were co-cultured for 2 h with 1×10^6 of HS-5 cells pre-seeded in 6-well plates 24 h before the co-culture. Non-adherent Hg-3 cells were removed and the adherent Hg-3 and HS-5 were carefully rinsed four times with DPBS (TermoFisher). HS5 and the adherent Hg-3 cells were detached with trypsin and analyzed by flow cytometry. Anti-CD90-PE antibodies were used tolabel HS-5 cells whereas Hg-3 cells were labelled using anti-CD19-PE-CY7 antibodies. The proportion of transfected and adherent Hg-3 to

HS-5 cells was determined by selecting $CD19^{+}GFP^{+}$ cells.

Cell migration assay

Cell migration experiments were performed using 12 well plated supplied with 8 µm inserts (Corning). Hg-3 cells were transfected with an empty plasmid or S45A-β–catenin containing plasmid as previously described, 24 h before the experiment and then seeded in the upper compartment. Cells were let migrate for 4 h towards the bottom compartment according to the following conditions: RPMI supplied 10% FCS, CXCL12 100ng/µL in complete medium or HS-5 cells seeded 24 hours before the experiment. The ratio between Hg-3 and HS-5 was 5:1 respectively. The same number of transfected Hg-3 cells were seeded in a well without a transwell and used to count the total number of cells to be used as denominator in the ratio to calculate the % of migrated cells.

RT-qPCR

Total RNA was purified with RNeasy Mini kit (Qiagen) France) and at least 500 ng of total RNAwere retro-transcribed with iSCRIPT (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Sybr green technology was used to amplify and quantify the amplicons using the following primer sets: β-catenin forward 5'-CGTGCACATCAGGATACCCA-3' and reverse 5'- ATTTCTTCCATGCGGACCCC-3'- c-myc forwards 5'-CTCCGTCCTCGGATTCTCTG-3' and reverse 5'-CTTGTTCCTCCTCAGAGTCGC-3' Dll1 forward 5'-AGAAGGATGAGTGCGTCAT-3' and reverse 5'-TTTAAGAGAAACGGGAGTCTTG-3' -Hes1 forwards 5'-GAAGAAAGATAGCTCGCGG-3' and reverse 5'-TTCCGGAGGTGCTTCAC-3' cyclin D1 forward 5'-ACCTGGATGCTGGAGGTCT-3' and reverse 5'-GCTCTTTTTCACGGGCTCCA-3' β-2microglubulin used as housekeeping gene forward 5'-CTCCGTGGCCTTAGCTGTG-3' and reverse 5'-TTTGGAGTACGCTGGATAGCCT-3'.

The qPCR was performed on a StepOnePlus™ (ThermoFisher Scientific) and the data analyzedusing StepOne software and GraphPad for statistics.

References:

1. ten Hacken, E. & Burger, J. A. Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. *Pharmacol. Ther.* **144**, 338–348 (2014).
2. Kipps, T. J. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Dis. Primer* **3**, (2017).
3. Janovská, P. & Bryja, V. Wnt signalling pathways in chronic lymphocytic leukaemia and B-cell lymphomas. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 4701–4715 (2017).
4. Wang, L. *et al.* Somatic mutation as a mechanism of Wnt/β-catenin pathway activation inCLL. *Blood* **124**, 1089–1098 (2014).
5. Wang, L. *et al. SF3B1* and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2497–2506 (2011).
6. Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/β-Catenin Signaling and Disease. *Cell* **149**, 1192–1205 (2012).
7. Amin, N. The Wnt signaling pathways and cell adhesion. *Front. Biosci.* **17**, 784 (2012).
8. Kaucka, M. *et al.* The Planar Cell Polarity Pathway Drives Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia by the Regulation of B-Lymphocyte Migration. *Cancer Res.* **73**, 1491–1501 (2013).
9. Yu, J. *et al.* Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *J. Clin. Invest.* **126**, 585–598 (2015).
10. Hasan, M. K. *et al.* Wnt5a induces ROR1 to complex with HS1 to enhance migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **31**, 2615–2622 (2017).
11. Hasan, M. K., Rassenti, L., Widhopf, G. F., Yu, J. & Kipps, T. J. Wnt5a causes ROR1 to complex and activate cortactin to enhance migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **33**, 653–661 (2019).
12. Nusse, R. & Clevers, H. Wnt/β-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic

Modalities. *Cell* **169**, 985–999 (2017).

13. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. β-catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. *EMBO J.* **16**, 3797–3804 (1997).
14. Fagotto, F. Looking beyond the Wnt pathway for the deep nature of β-catenin. *EMBORep.* **14**, 422–433 (2013).
15. Lazarian, G. *et al.* Stabilization of β-catenin upon B-cell receptor signaling promotes NF- kB target genes transcription in mantle cell lymphoma. *Oncogene* **39**, 2934–2947 (2020).
16. Peifer, M. The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin andthe Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J. Cell Biol.* **118**, 681–691 (1992).
17. McCrea, P. D., Maher, M. T. & Gottardi, C. J. Nuclear Signaling from Cadherin Adhesion Complexes. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 112 129–196 (Elsevier, 2015).
18. Daugherty, R. L. & Gottardi, C. J. Phospho-regulation of β-Catenin Adhesion and Signaling Functions. *Physiology* **22**, 303–309 (2007).
19. Ferreira, A. C. *et al.* E-cadherin impairment increases cell survival through Notch-dependent upregulation of Bcl-2. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 334–343 (2012).
20. Mangolini, M. *et al.* Notch2 controls non-autonomous Wnt-signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
21. Dadashian, E. L. *et al.* TLR Signaling Is Activated in Lymph Node–Resident CLL Cells and IsOnly Partially Inhibited by Ibrutinib. *Cancer Res.* **79**, 360–371 (2019).
22. Montresor, A. *et al.* CXCR4- and BCR-triggered integrin activation in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells depends on JAK2-activated Bruton's tyrosine kinase. *Oncotarget* **9**, (2018).
23. Wahl, M. I. *et al.* Phosphorylation of two regulatory tyrosine residues in the activation of

Bruton's tyrosine kinase via alternative receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 11526–11533 (1997).

24. Middendorp, S., Dingjan, G. M., Maas, A., Dahlenborg, K. & Hendriks, R. W. Function of Bruton's Tyrosine Kinase during B Cell Development Is Partially Independent of Its Catalytic Activity. *J. Immunol.* **171**, 5988–5996 (2003).
25. Adamo, A. *et al.* HS-5 and HS-27A Stromal Cell Lines to Study Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Support to Cancer Development. *Front. Cell Dev.Biol.* **8**, 584232 (2020).
26. Böttcher, M. *et al.* Control of PD-L1 expression in CLL-cells by stromal triggering of the Notch-c-Myc-EZH2 oncogenic signaling axis. *J. Immunother. Cancer* **9**, e001889 (2021).
27. Arvidsson, G., Henriksson, J., Sander, B. & Wright, A. P. Mixed-species RNAseq analysis of human lymphoma cells adhering to mouse stromal cells identifies a core gene set that is also differentially expressed in the lymph node microenvironment of mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia patients. *Haematologica* **103**, 666–678 (2018).
28. Nore, B. F. *et al.* Redistribution of Bruton's tyrosine kinase by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho-family GTPases. *Eur. J. Immunol.* **30**, 145–154 (2000).
29. de Gorter, D. J. J. *et al.* Bruton's Tyrosine Kinase and Phospholipase Cγ2 Mediate Chemokine-Controlled B Cell Migration and Homing. *Immunity* **26**, 93–104 (2007).
30. Hamada-Kawaguchi, N., Nore, B. F., Kuwada, Y., Smith, C. I. E. & Yamamoto, D. Btk29A Promotes Wnt4 Signaling in the Niche to Terminate Germ Cell Proliferation in *Drosophila*. *Science* **343**, 294–297 (2014).
31. Corcione, A. *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **107**, 367–372 (2006).

32. van de Wetering, M. *et al.* Mutant E-cadherin breast cancer cells do not display constitutive Wnt signaling. *Cancer Res.* **61**, 278–284 (2001).

33. Lu, D. *et al.* Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 3118–3123 (2004).

34. Klein, E. A. & Assoian, R. K. Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J.Cell Sci.* **121**, 3853–3857 (2008).

35. Razanadrakoto, L. *et al.* Mutation of Vav1 adaptor region reveals a new oncogenic activation. *Oncotarget* **6**, 2524–2538 (2015).

36. Boudria, R. *et al.* Regulatory interplay between Vav1, Syk and β-catenin occurs in lung cancer cells. *Cell. Signal.* **86**, 110079 (2021).

Acknowledgement

This project was supported by Labex Inflamex, ANR11 IDEX 00502 and Transcan H2020 FireCLL. IM and SO received MRT fellowships.

Authors contribution

LG and DL designed the experiments, supervised the project and wrote the manuscript. IM, TR and SO performed the experiments. AO generated the RT-QPCR data, the mutated plasmidcontaining β-catenin. BD assisted with the immunofluorescence experiments. VG performed and assisted with the Amnis Imagestream experiments and analysis. NVB and CLR contrinutedto project design and edited the manuscript. FBM, GL, FC, VL supplied the patients' samples and information.

Competing Interests Statement

All the authors declare no competing interests.

Data Availability Statement

All the data generated and analyzed in this work are available from the corresponding authorsupon request.

Figure legends

Figure 1. β-catenin and BTK collaborate to affect cell morphology in co-culture of CLL and stromal cells. A) Immunofluorescence images showing BTK and β-catenin in Mec-1 cells adhering (upper images) and not (lower images) to stromal HS-5 cells. BTK and β-catenin are

labelled by antibodies and are shown in red and green respectively. On the right side of the panel B, a graph showing the shape factor is presented. An average of 200 cells was used to calculate and compare the shape factors among primary CLL cells cultured alone (Ctrl) and inthe non-adherent *versus* adherent fraction. **B**) Immunofluorescence of co-culture of primary CLL B cells with stromal cells (HS-5), labelled with an anti-CD20 antibody (green) and phalloidinto label the actin cytoskeleton (red). The white arrow in the merge image points at the protrusions formed by CLL cells in contact with stromal cells. The images are all issued from the same sample (UPN 439) but represent two different fields from the same coverslip. CLL cells from three different patients were analyzed in this experiment. **C**) Protein extracts fromcells transfected with a plasmid carrying human BTK gene or with an empty plasmid were analyzed by immunoblot using anti-BTK (Cell signaling) and anti- β-catenin (BD biosciences) antibodies. β-tubulin was used as a loading control. **D**) Confocal microscopy was used to acquire the immunostaining of HEK293T cells transfected with a plasmid carrying human BTKgene followed by an IRES-GFP cassette. β-catenin localization was analyzed upon labeling witha specific antibody (BD biosciences) shown in red. In all the images of this figure, Dapi was used to label the nuclei. The white arrow indicates the tip of a protrusion containing β-cateninin red. **E**) Shape factor analysis to compare cell morphology in cells transfected with a plasmidcontaining GFP only, or BTK-IRES-GFP alone or in presence of a mix of 5 siRNA targeting β- catenin or a negative control (Mock). ns: not significant, *** $p<0.001$, Student t-test

Figure 2. **β-catenin has a different localization and amount in adherent *versus* non-adherentCLL B-cells to HS-5 stromal cells. A)** Gating strategy applied to detect β-catenin in co-culturesof Mec-1 cells ($CD19^+$) and stromal cells ($CD90^+$). The graph underneath shows the statistical analysis of β-catenin content in adherent *versus* non-adherent cells performed on 3 independent experiments. * $p<0.05$, Student test. **B)** Image and flow cytometry analysis of CLLcells in co-culture with HS-5 cells. Upon 2 h of co-culture, the non-adherent cells were removed and labelled separately from the adherent fraction that was recovered by trypsinization. Cells were labelled with CD19-PE to gate

CLL cells. After fixation and permeabilization β-catenin was labelled with an APC-conjugated antibody. The nuclei were labelled with Dapi. CD19 positive cells were analyzed for the β-catenin signal and Dapi. In the

table, the cell counts and the percentage of cells where the signal of β-catenin and Dapi overlap is reported for the adherent and non-adherent cells.

Figure 3. BTK is involved in β-catenin stabilization in CLL cells co-cultured with HS-5. A) Western blot analysis of β-catenin from CLL B cells (UPN 299) co-cultured with the human stromal cell line HS-5 for different incubation times. β-tubulin is used as loading control. The images are representative of at least three independent experiments. **B**) Western blot analysisof β-catenin from primary CLL cells (UPN 103) cultured in conditioned medium issued from a 24-h culture of HS-5. **C**) Primary CLL cells (UPN 66) were pre-treated or not with Ibrutinib (100nM) for 1 h prior to incubation with conditioned medium issued from a 24-hours culture of stromal cells. β-catenin and β-tubulin were detected by Western blot. **D**) The graph representsthe % of pBTK (pY223) positive cells of 5 patients' primary cells (UPN 212-256-333-390-397) incubated with conditioned medium issued from stromal cells and analyzed by flow cytometry. **E**) Representative immunoblot (UPN 212) and quantification of β-catenin level following treatment with CXCL12 (100 ng/mL) of purified primary CLL cells for 1 hour (UPN 108-187-203-208-212-358). pERK1/2 was used as a positive control for the stimulation, pY223BTK as the activated protein marker and β-tubulin as a loading control. **F**) Co-Immunoprecipitation of β-catenin and BTK from purified primary CLL B cells (UPN 319) co- cultured and not with HS-5 stromal cells for one hour. The input represent the 10 % of total lysate and was set aside prior to immunoprecipitation. Mouse IgG were used as a negative control for the immunoprecipitation. ns: not significant, * $p<0.05$, Student test.

Figure 4. β-catenin functional role in CLL cells. A) Western blot analysis of the phosphorylation status of β-catenin upon co-culture with HS-5 stromal cells for 1 h. Whole cell lysates of primary purified CLL cells (UPN 263) were probed with the antibodies directed to the triple phosphorylation site, S33, S37 and T41 (indicated in the figure as 3P), to total β- catenin or to β-tubulin. The cell lysates were loaded on two different membranes probed withanti-3P-β-catenin and total β-catenin, respectively. The loading controls (β-tubulin) of the twomembranes are shown. **B**) Western blot analysis of the whole cell lysate of Mec-1 cells transfected with an empty plasmid (Mock) or a

plasmid carrying the wild type human β- catenin gene or the mutated form (S45A). **C**) Western blot analysis of the whole cell lysate of

Hg-3 cells transfected with an empty plasmid (Mock) or a plasmid carrying the mutated formof β-catenin (S45A). The immunoblot was probed with anti-β-catenin or 3P- β-catenin antibodies to show the decrease of β-catenin phosphorylation that increases the stability of the protein; Syk was used as loading control. **D**) Cell fractionation protocol followed by immunoblot was used to detect β-catenin by specific antibody in the cytosol and nucleus of Hg-3 cells transfected with the plasmid carrying S45A β-catenin or an empty plasmid (Mock).

β-tubulin and hnRNP A1 were used as a loading control for the cytosolic and nuclear fraction, respectively. **E)** Graph of the flow cytometry data used to calculate the percentage of S45A β-catenin *versus* empty plasmid (Mock) transfected Hg-3 cells adhering to HS-5 upon 1 h of co-culture. GFP was used to count transfected Hg-3 cells as described in the material and methods section. **F**) Migration experiments performed with a transwell (8 μm diameter pores)of Hg-3 cells transfected with an empty plasmid (Mock) or the S45A β-catenin. Transfected Hg-3 cells were seeded on the top chamber and let migrate for 4 h towards the bottom chamber containing RPMI, CXCL12 or HS-5 cells. Graph shows the percentage of migrated cellsover the total of seeded cells of at least 3 independent experiments. **G**) RT-qPCR on two Wnttarget genes, Axin-2 and Cyclin D1, performed on Hg-3 cells transfected with an empty plasmid(Mock) or with the S45A β-catenin and in presence or absence of HS-5 cells for 4 h. Both graphsrepresent the average data of 3 independent experiments. ns: not significant, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, Student test

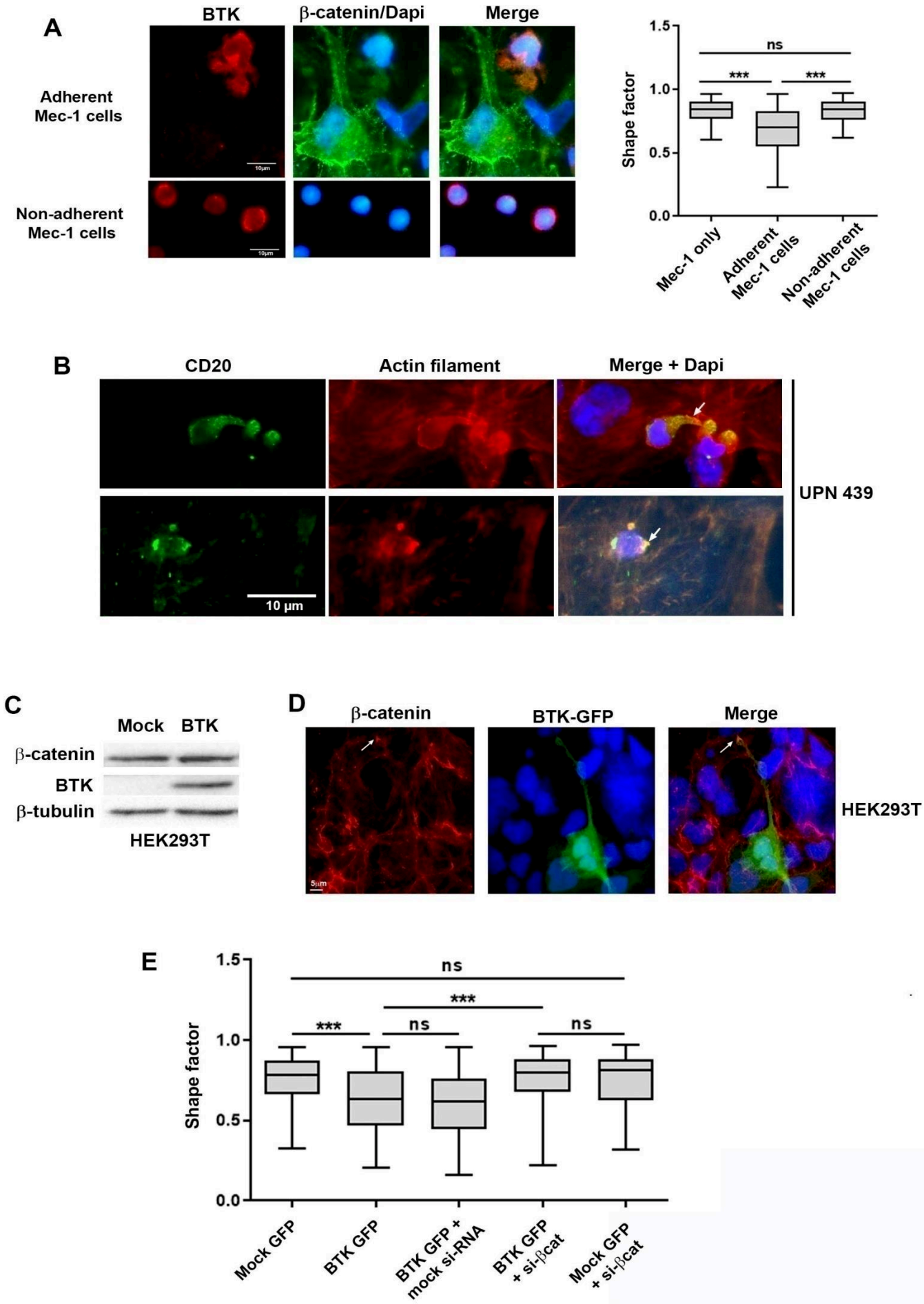
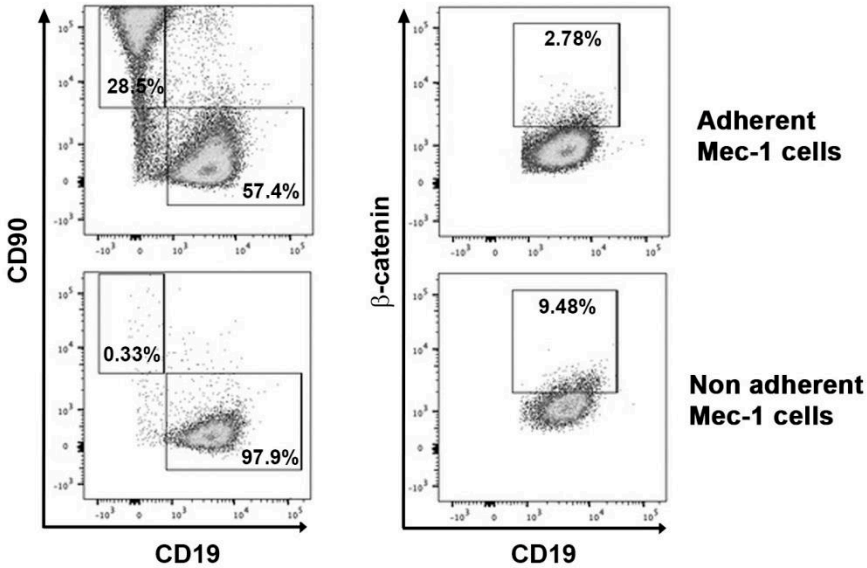
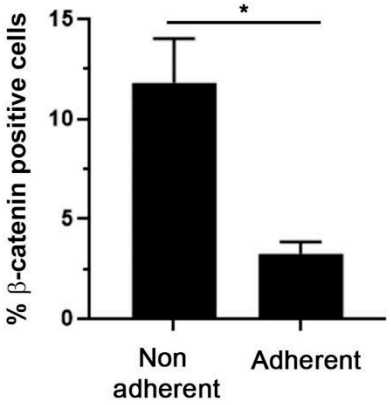

A
BTK
β-catenin/Dapi
Merge
Adherent Mec-1 cells
Non-adherent Mec-1 cells
10µm
Shape factor
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
***
***
Mec-1 only
Adherent Mec-1 cells
Non-adherent Mec-1 cells
B
CD20
Actin filament
Merge + Dapi
UPN 439
10 µm
C
Mock
BTK
β-catenin
BTK
β-tubulin
HEK293T
D
β-catenin
BTK-GFP
Merge
HEK293T
5µm
E
Shape factor
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
***
***
ns
ns
Mock GFP
BTK GFP
BTK GFP + mock si-RNA
BTK GFP + si-βcat
Mock GFP + si-βcat

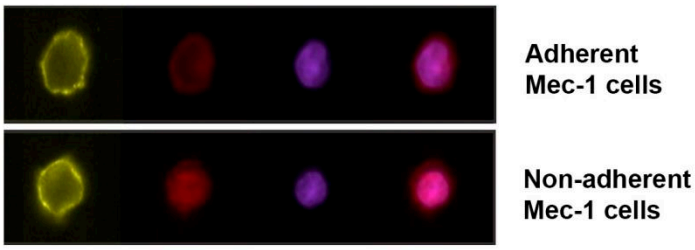
FIGURE 1

A





B



	β-catenin and Dapi positive cells (count)	Cells with nuclear β-catenin	
		count	%
Adherent cells	10706	429	4.00
Non-adherent cells	13984	1458	10.42

FIGURE 2

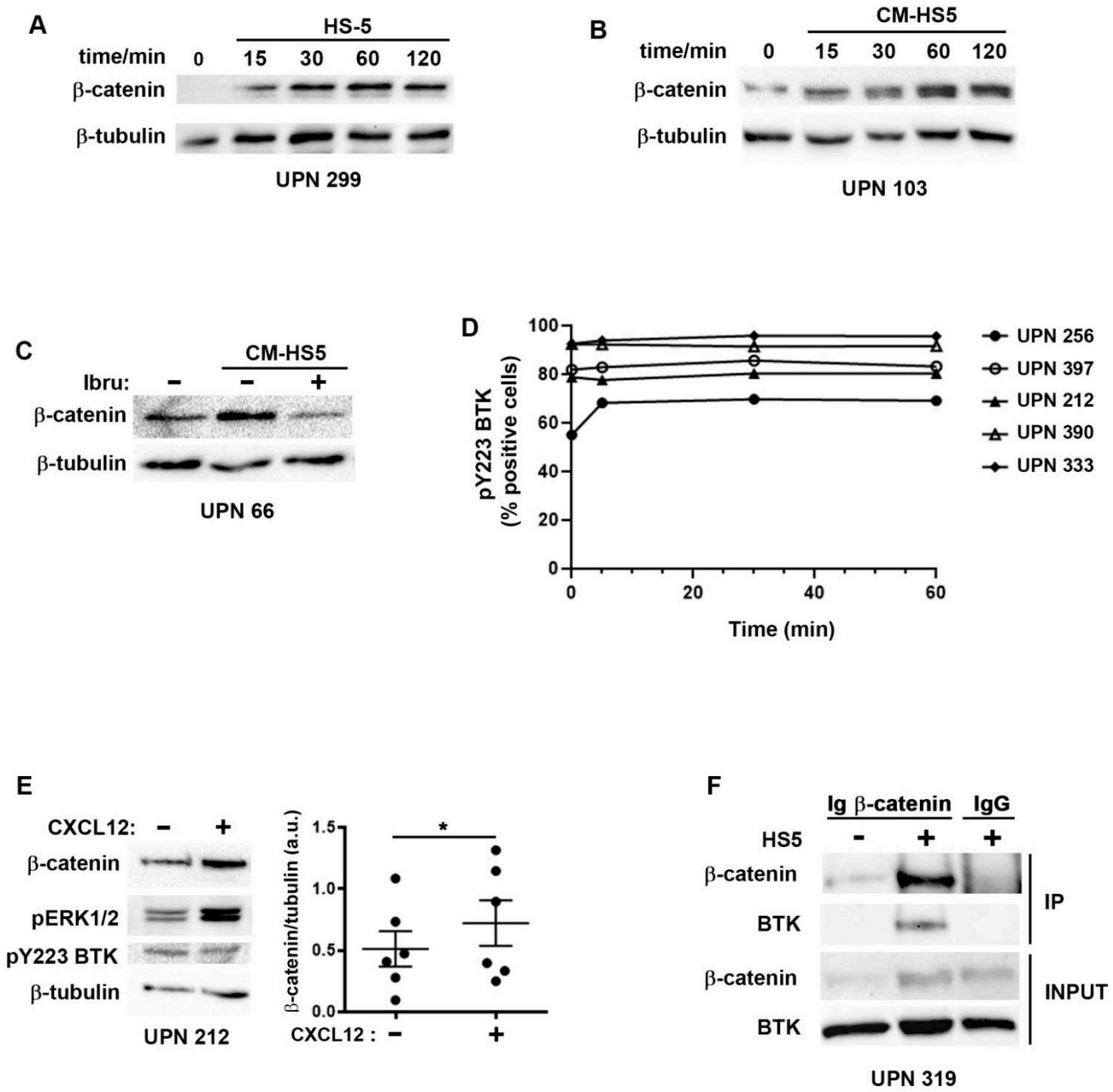

A
HS-5
time/min 0 15 30 60 120
β-catenin
β-tubulin
UPN 299
B
CM-HS5
time/min 0 15 30 60 120
β-catenin
β-tubulin
UPN 103
C
CM-HS5
Ibru: – – +
β-catenin
β-tubulin
UPN 66
D
pY223 BTK (% positive cells)
Time (min)
UPN 256
UPN 397
UPN 212
UPN 390
UPN 333
E
CXCL12: – +
β-catenin
pERK1/2
pY223 BTK
β-tubulin
UPN 212
β-catenin/tubulin (a.u.)
CXCL12 : – +
F
Ig β-catenin IgG
HS5 – + +
β-catenin
BTK
IP
β-catenin
BTK
INPUT
UPN 319

FIGURE 3

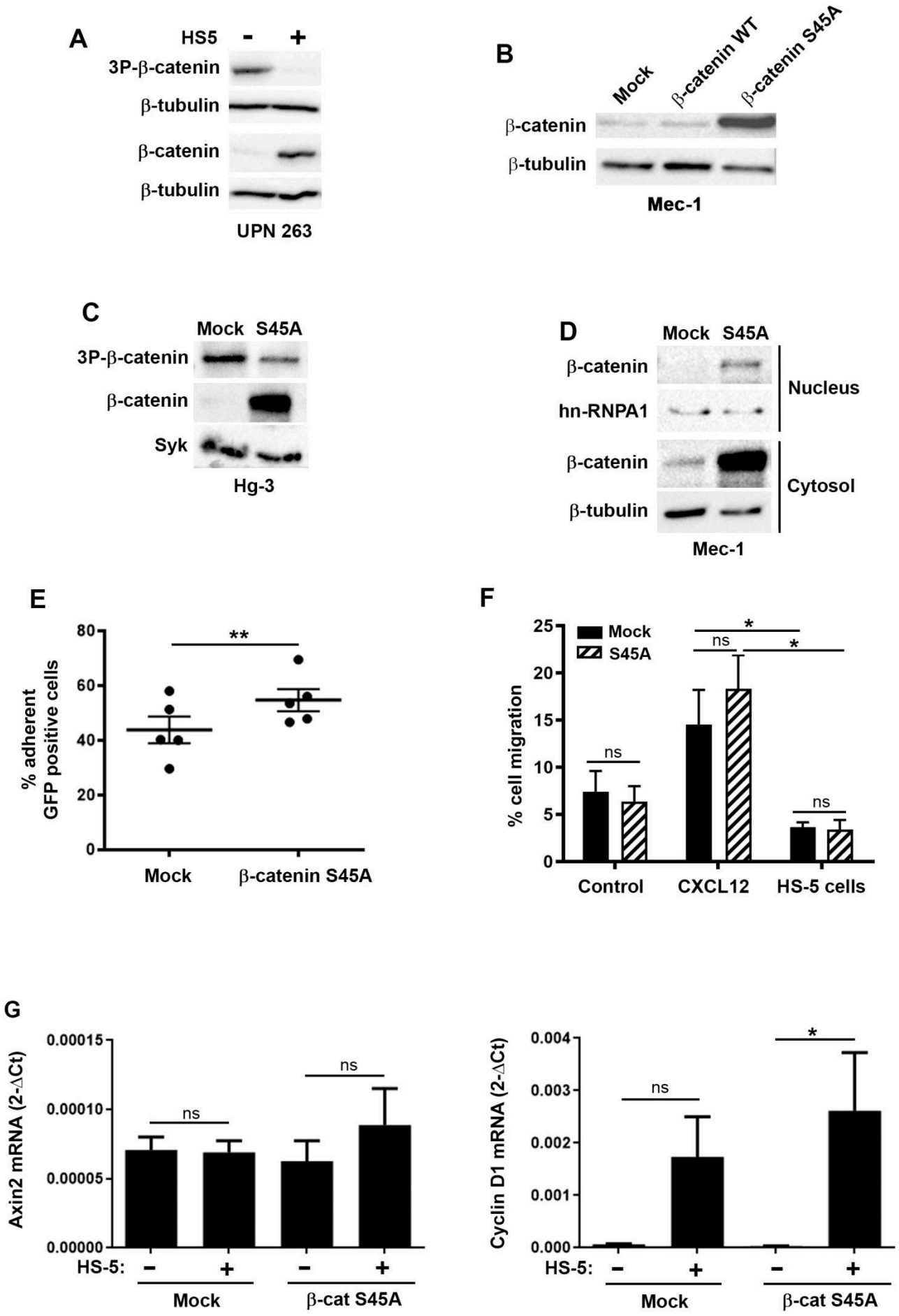

A
HS5 - +
3P-β-catenin
β-tubulin
β-catenin
β-tubulin
UPN 263
B
Mock
β-catenin WT
β-catenin S45A
β-catenin
β-tubulin
Mec-1
C
Mock S45A
3P-β-catenin
β-catenin
Syk
Hg-3
D
Mock S45A
β-catenin
hn-RNPA1
Nucleus
β-catenin
β-tubulin
Cytosol
Mec-1
E
% adherent GFP positive cells
80
60
40
20
0
**
Mock
β-catenin S45A
F
% cell migration
25
20
15
10
5
0
Mock
S45A
ns
*
ns
*
ns
Control
CXCL12
HS-5 cells
G
Axin2 mRNA (2-ΔCt)
0.00015
0.00010
0.00005
0.00000
ns
ns
HS-5: - + - +
Mock
β-cat S45A
Cyclin D1 mRNA (2-ΔCt)
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
ns
*
HS-5: - + - +
Mock
β-cat S45A

FIGURE 4

Supplementary Figure legends

Supplementary Figure S1. A) Protein cell extracts of HEK293T transfected with an empty plasmid (Mock) or with human BTK gene were analyzed by immunoblot and probed with an antibody towards BTK or its phosphorylated form (pY223). β-tubulin was used to assess equalloading. The cell extracts were loaded on two membranes and probed with anti-p-BTK (pY223)and anti-total BTK respectively. The loading controls of the two membranes are shown. **B**) Immunofluorescence on HEK293T cells transfected with a plasmid carrying GFP (Top panels) and the human BTK gene followed by an IRES-GFP cassette (Bottom panels). GFP signal (green) is used to visualize transfected cells and an antibody towards human BTK was used todetect and analyze BTK localization (red). Dapi was used to label the cell nuclei. **C**) RT-qPCR was used to validate the knock-down of β-catenin in HEK293T cells upon transfection of a mixof 5 siRNA directed towards its mRNA. The mock condition represents the negative control of the experiment. Immunofluorescence of HEK293T cells transfected with control siRNA or mix of 5 siRNA directed against β-catenin mRNA. β-catenin is detected by a specific antibodyand it is labelled in green in the image.

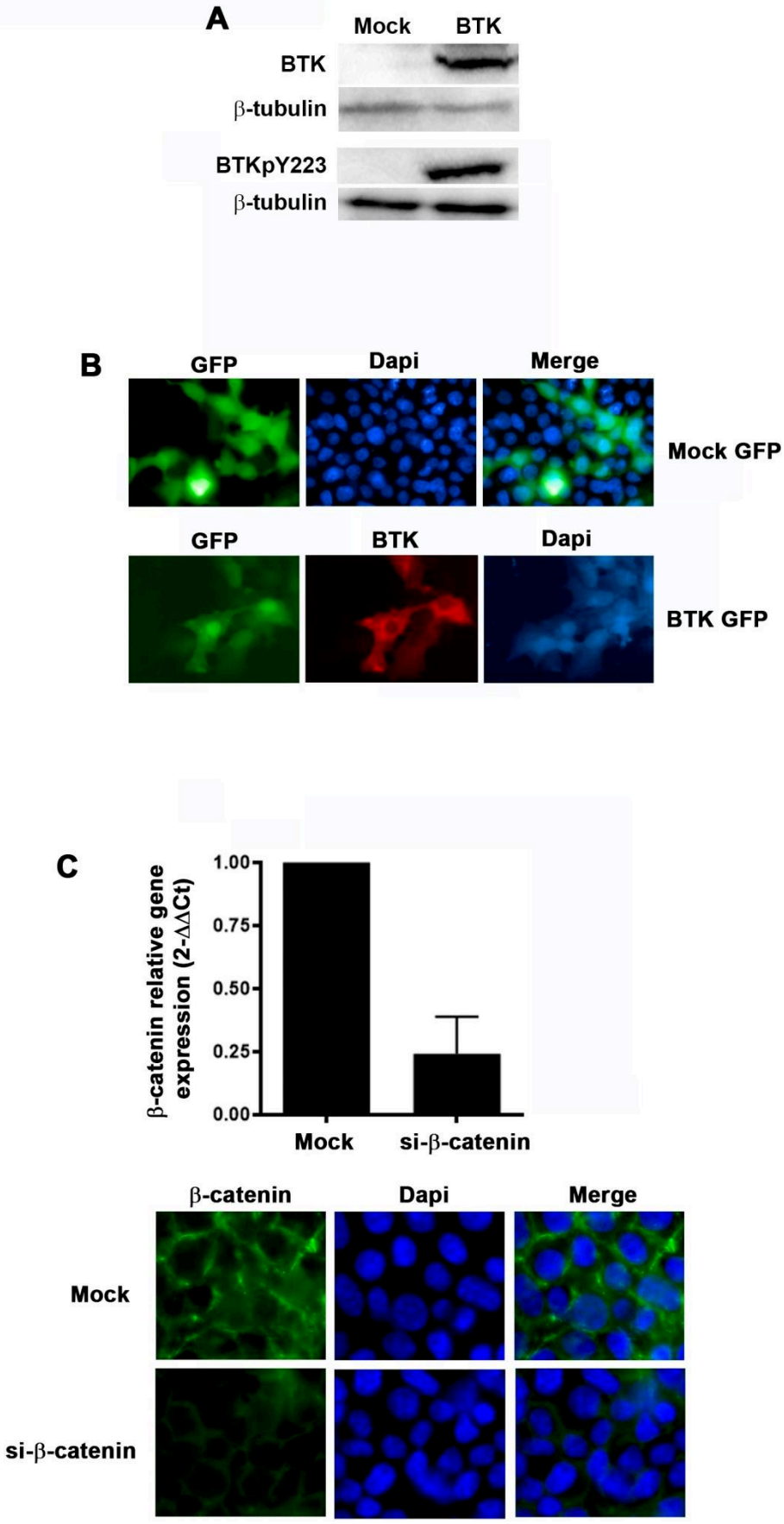
Supplementary Figure S2. A) Flow cytometry experiment of Mec-1 cells treated with LiCl for4 h. Dotplots showed $CD19^+$ MEC-1 and their level of β-catenin (determined on the FMO) in untreated (Control) and treated (LiCl) cells. **B**) Gating strategy used in flow cytometry shows the percentage of β-$catenin^+$ in Hg-3 cells in adherent *versus* non-adherent cells to human stromal cells (HS-5). Hg-3 cells selection is based on CD19 expression whereas HS-5 is based on CD90 expression.

Supplementary Figure S3. A) Immunoblot analysis of protein cell extracts of Mec-1 (left) andHg-3 (right) cells upon co-culture with HS-5 for the indicated time points, to validate the model in both CLL B cell lines. The antibody used are the same as for the previous figures. **B**) Flow cytometry gating strategy used for the detection of intracellular activated pBTK (pY223) in purified primary CLL B cells. Two patients' samples (UPN 212 & 256) are shown. CLL cells were selected upon the expression of CD19 and CD5 and, the gate for pY223 BTK positivity was placed based on FMO signal

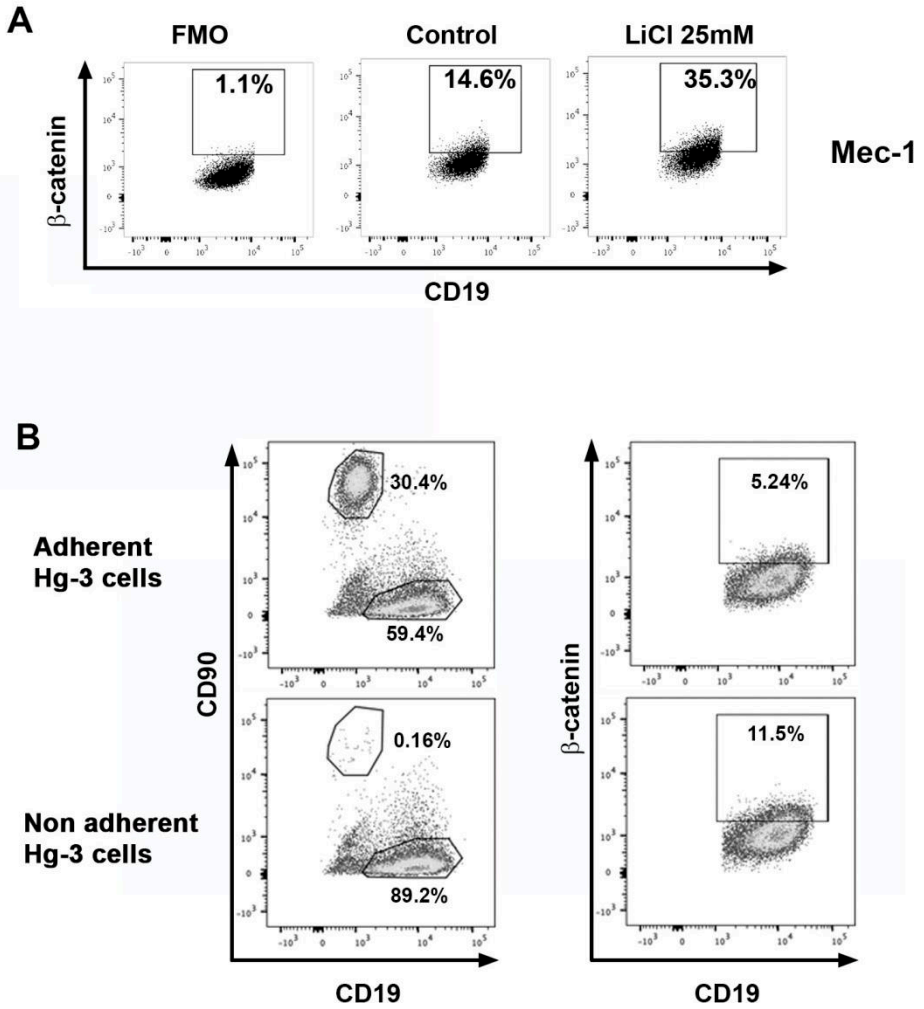
(data not shown).

Supplementary Figure S4. A) RT-qPCR of total mRNA extracted from Hg-3 cells transfected with an empty plasmid or a plasmid containing the mutated β-catenin (S45A) and co-culturedor not with HS-5 cells for 4 hours. (**B**) Immunoblot analysis of cell extracts from Mec-1 cells transfected with an empty plasmid (Mock) or a plasmid carrying the S45A mutated β-catenin was performed using an antibody against phosphorylated β-catenin on the Y654 residue upon co-culture and with or without treatment with Ibrutinib (100 nM) for 1 h. **C)** Graph summarizes the flow cytometry data with the percentage of CXCR4-positive Hg-3 cells transfected with S45A β-catenin (S45A) or an empty plasmid (Mock) and found after migration in the lower chamber of a transwell assay containing HS-5 cells. The UN condition corresponds to the percentage of CXCR4-positive cells in the total population of transfected cells prior to migration. ns: not significant, * $p<0.05$, Student test. **D**) RT-qPCR was used to detect Axin-2 transcript in 4 patients' CLL cells co-cultured or not (UN) with HS-5 cells for 4 h (UPN 19-173-182-296). Delta Ct are calculated as subtraction of Axin-2 C_t and that of the house keeping gene, β2 microglobulin. **E**) RT-qPCR to detect the indicated transcripts in Hg-3cells transfected with the mutated β-catenin S45A or not (Mock) and co-cultured or not withHS-5 cells for 4 h. c-Myc is a Wnt/TCF target gene. Dll1 and Hes 1 were used as target genes of Notch and NF-kB respectively.

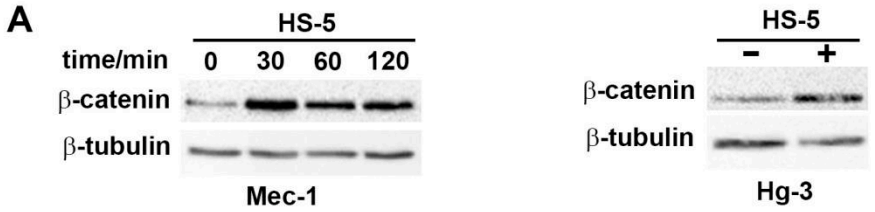
Supplementary figure S1

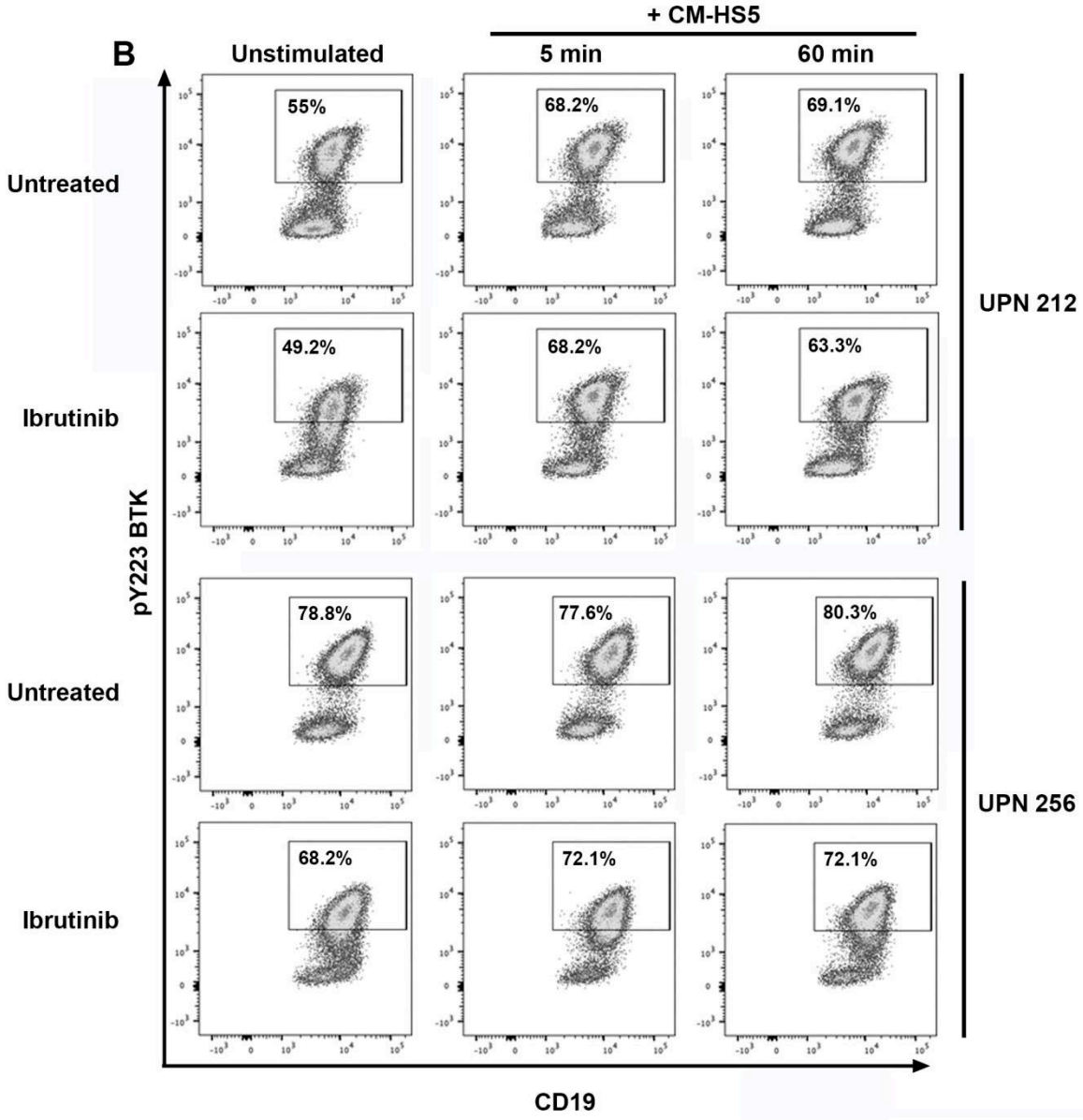


Supplementary figure S2

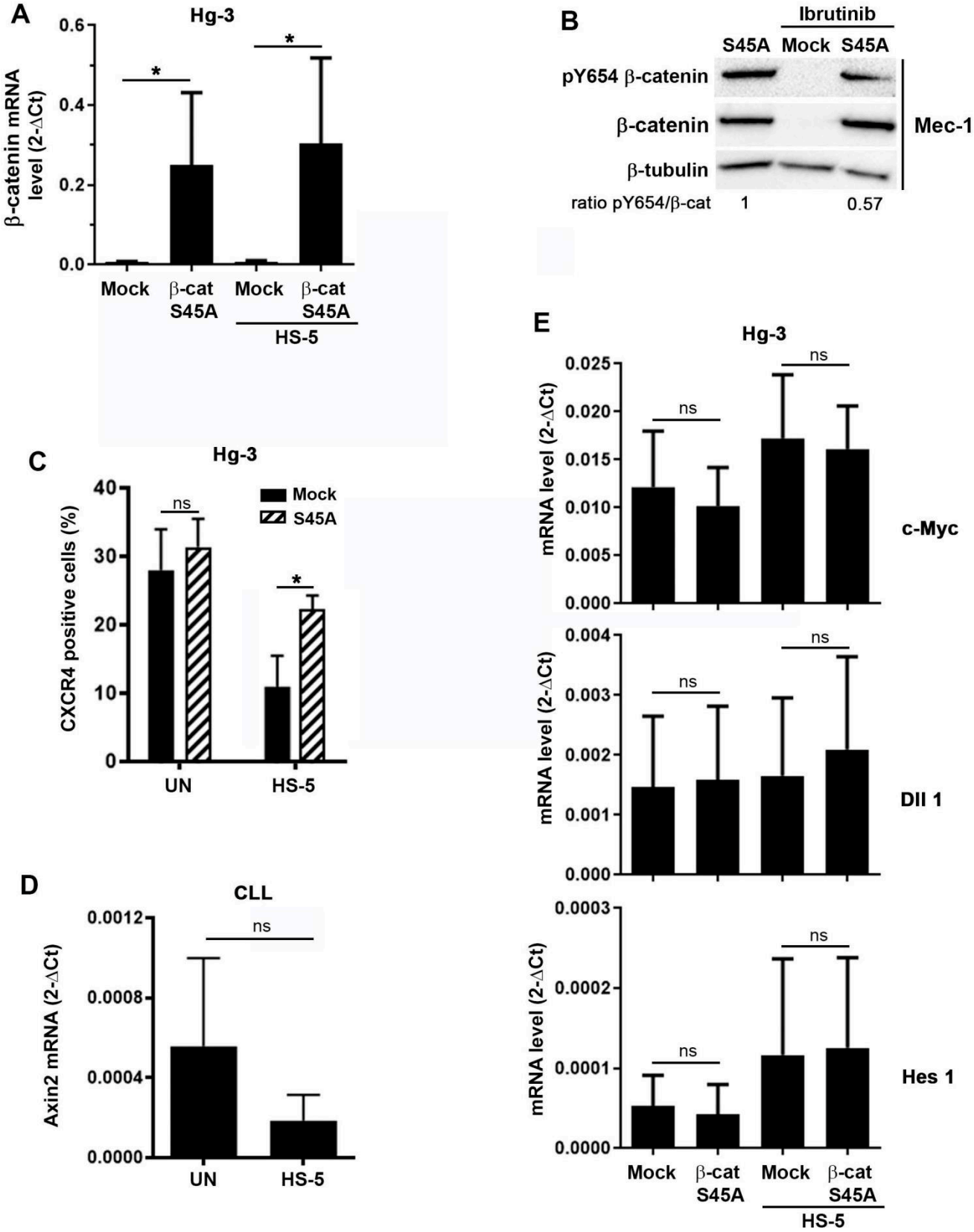


Supplementary figure S3





Supplementary figure S4



Supplementary Table 1: Characteristics of CLL patients

UPN	Gender	Age	Lymphocytosis (10^9/L)	IGHV mutational status
19	M	53	117	UM
66	F	76	193	UM
103	M	68	103	M
108	M	51	160	M
173	F	76	33	/
182	M	73	105	M
187	M	73	97	M
203	M	89	118	M
208	M	57	51	M
212	M	65	169	M
256	M	57	97	M
263	M	68	12	M
296	M	83	340	M
299	M	72	107	M
319	F	82	48	UM
333	F	80	222	M
358	M	65	190	UM
390	M	65	334	UM
397	F	66	72	UM
439	M	70	30	UM

M: Mutated ; UM : Unmutated

Partie II : Reprogrammation des cellules stromales du microenvironnement par les cellules B tumorales de LLC

Les cellules LLC dépendent des cellules du microenvironnement pour leur survie et prolifération mais elles sont aussi capables de modifier le microenvironnement à leur avantage [55]. Des travaux du laboratoire publiés récemment, ont montré que les ganglions lymphatiques des patients LLC, contrairement à ceux de sujets sains, se caractérisent par une désorganisation de l'architecture du ganglion avec la disparition des cellules FDC et une perte du réseau FRC [190]. De plus, les cellules LLC induisent la sécrétion de la cytokine CCL21 par les cellules NLC, cytokine normalement synthétisée par les FRC, pour augmenter les signaux de survie des cellules LLC [190]. La plasticité des cellules HS-5 nous a encouragé à vérifier si les cellules LLC pouvaient changer le phénotype des cellules stromales HS-5 et leur capacité à sécréter des cytokines pro-survie ou immunomodulatrices. En effet, les BMSC sont capables de se différencier in vitro et in vivo en cellules du mésoderme, tels que les ostéoblastes, les chondrocytes et les adipocytes [191]. De plus, les BMSC sont dotées de fonctions immunomodulatrices qui sont déclenchées en présence d'un microenvironnement inflammatoire. En effet, dans ce contexte, ces cellules ont la capacité d'inhiber le fonctionnement de différentes cellules de l'immunité innée (neutrophiles, monocytes, cellules NK) et de l'immunité adaptative (cellules T, cellules B, cellules dendritiques). La fonction immunosuppressive des BMSCs a été observée dans différentes maladies inflammatoires et auto-immunes [186]. La surexpression de PDL-1 (Programmed death-ligand 1) et de l'enzyme IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase) constitue un mécanisme moléculaire bien connu de l'immunosuppression médiée par les BMSC [192]. Comme les cellules stromales humaines primaires, les cellules HS-5 peuvent se différencier in vitro en ostéoblastes mais pas en chondrocytes ni en adipocytes[193]. En revanche leur capacité à acquérir une fonction immuno-modulatrice sous l'influence des cellules B malignes n'a pas encore était établie.

Afin de vérifier s'il y avait une similitude entre les cellules HS-5 et les cellules stromales du ganglion lymphatique, nous avons analysé l'expression de marqueurs des cellules stromales et plus particulièrement de marqueurs des cellules ganglionnaires FRC.

1. Caractérisation des cellules stromales HS-5

Différents marqueurs spécifiques ont été définis par la Société internationale de thérapie cellulaire et génique (ISCT) pour caractériser les cellules stromales[128] . Il s'agit de l'expression de CD73, CD90 et CD105 et de l'absence d'expression de CD14, CD31, CD34, CD45 et HLA-DR.

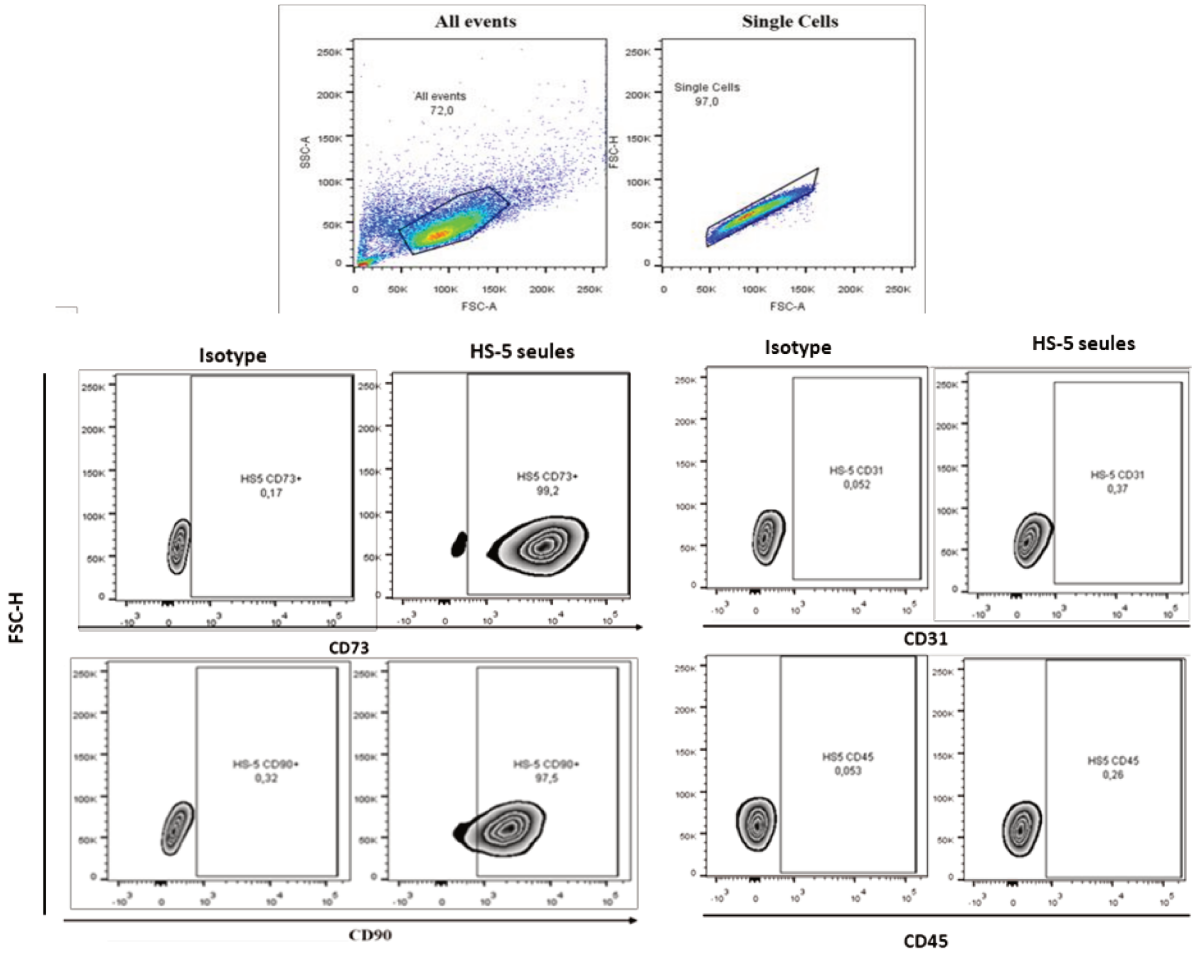


Figure 16 : Validation du phénotype stromal des cellules HS-5*. Analyse par cytométrie en flux des cellules HS-5 marquées par les anticorps anti-CD90-PE, anti-CD73-APC, anti-CD45-PECy7 et anti-CD31-FITC. Les panels montrent une analyse représentative de l'expression de CD90, CD73, CD45 et CD31 à la surface des cellules HS-5 cultivées seules. L'acquisition et l'analyse des données ont été réalisées à l'aide d'un cytomètre canto II et du logiciel FlowJo (BD Bioscience).*

Comme le montre la figure 16, les cellules HS-5 sont positives pour CD73/CD90 et négatives pour le CD45/CD31. Ce résultat confirme que les cellules HS-5 présentent bien un profil de cellules stromales. De manière intéressante, ces expressions restent inchangées lorsque les cellules sont co-cultivées en présence de cellules LLC, ce qui représente un point fort de ce modèle par rapport à l'utilisation de cellules stromales primaires qui présentent une forte l'hétérogénéité.

2. Les cellules HS-5 présentent un profil phénotypique et fonctionnel comparable à celui des cellules FRC.

Comme décrit dans l'introduction, les ganglions lymphatiques constituent les sites privilégiés de prolifération des cellules LLC, suggérant un rôle déterminant de la niche cellulaire qui compose le microenvironnement lymphatique [194]. Les cellules stromales présentes dans les ganglions lymphatiques constituent une population hétérogène et peuvent être identifiées grâce à des marqueurs

spécifiques. Le tableau ci-dessous présente les marqueurs exprimés par les différentes sous-populations stromales dans les organes lymphoïdes secondaires. Les FRC constituent les cellules les plus abondantes dans le ganglion et leur rôle dans la survie des cellules B malignes est bien établi[195]. Nous avons donc vérifié l'expression de certains marqueurs FRC par les cellules HS-5 ainsi que leurs modulations en présence de cellules LLC afin d'évaluer leur capacité à créer leur propre niche ganglionnaire.

	Tissue & location	Selected markers	Functions
Fibroblastic Reticular cells (FRC)	Lymph nodes, spleen, peyer's patches, MALT, TLT. T cell zones.	ER-TR7, podoplanin (gp38), laminin, desmin, fibrillin, fibronectin, α-SMA, LTβR, TNFR1/2, VCAM1, ICAM1, collagen I, II, IV, integrin α1, α4, β1, MHC-I, VEGF, CXCL16, CCL21, CCL19, IL-7.	Structural support; production of reticular fibers; formation of conduit network; chemokine production & expression; substrate for lymphocyte migration; APC adhesion; T cell homeostasis; antigen presentation.
Follicular Dendritic cells (FDC)	Lymph nodes, spleen, peyer's patches, MALT, TLT. B cell zones.	CD35, CD21, CD16, CD23, CD32, FDC-M2 (complement C4), VCAM1, ICAM1, MAdCAM1, laminin, desmin, CXCL13, CXCL12, BAFF.	Antigen capture; presentation of immune complexes; chemokine production & presentation; B cell homeostasis.
Marginal Reticular cells (MRC)	Lymph nodes, spleen, peyer's patches, MALT. SCS (LN) & MZ (spleen).	ER-TR7, VCAM1, ICAM1, MAdCAM1, TRANCE (RANKL), laminin, desmin, podoplanin (gp38), 1BL-11, CXCL13.	Structural support; chemokine production; conduit function.
Red-pulp fibroblasts	Spleen.	ER-TR7, desmin, laminin, integrin α3, α4, α5, β1, PDGFRα/β, ICAM1, IL-6, CXCL12.	Construct splenic cords & direct blood flow; assist in removal of dying red blood cells; control of splenic blood flow, macrophage and plasma cell attraction and retention.
LN medullary fibroblasts	Lymph node	ER-TR7, desmin, laminin, collagen III, CXCL12(?).	Macrophage and plasma cell attraction and retention?
Lymphatic endothelial cells (LEC)	Lymph nodes, spleen (?), peyer's patches, MALT, TLT.	CD31, LYVE1, VCAM1, ICAM1/2, ER-TR7, podoplanin (gp38), laminin, VE-cadherin, claudin-5, JAM-A, Prox1, Toll-like receptors, CCL21, S1P.	Transport of lymph, antigens, & cells; Facilitate entry of leukocytes into lymphatics, chemokine production & presentation.
Vascular endothelial cells (VEC)	Lymph nodes, spleen, peyer's patches, MALT, TLT.	PNAd (LN), CD31, CD34, VE-Cadherin, laminin, JAM-A/B/C, ZO-1/2, ESAM1, claudin-5, CCL21 (mice).	Transport of blood; entry of cells including lymphocytes from the blood into tissues.

Tableau 1 *: Sous-populations stromales dans les organes lymphoïdes secondaires.*[196]

Les cellules HS-5 ont été mises en culture seules ou en contact avec des cellules primaires LLC pendant 24h et l'expression à la surface de la Podoplanin (gp38), de ICAM-1 (CD54), du récepteur de la lymphotoxin β (LTβR), de VCAM-1 (CD106) et des récepteurs I et II au TNF (TNFR I/II) a été analysée par cytométrie en flux.

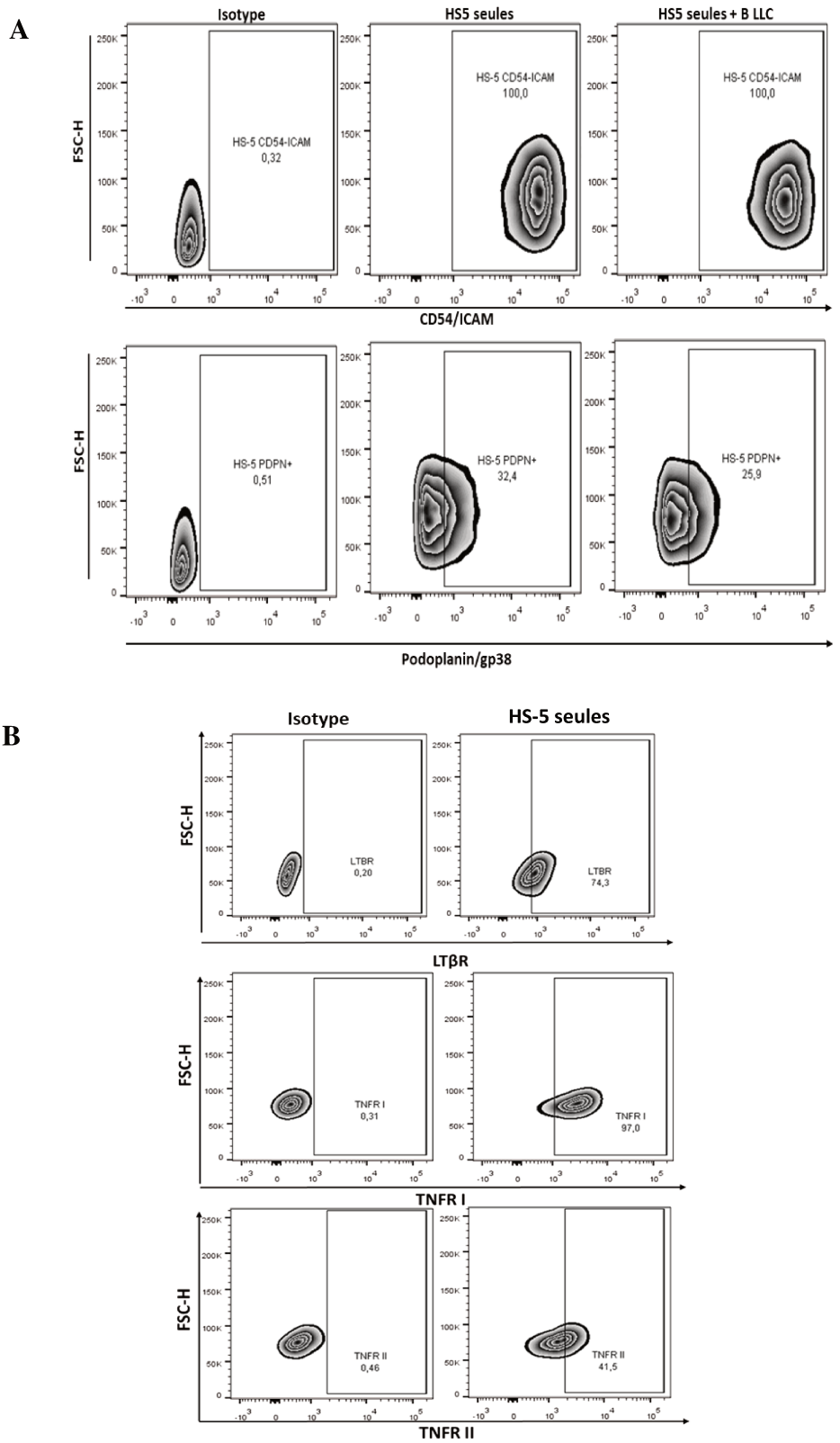


Figure 17 : Les cellules HS-5 présentent un profil FRC-like. *Analyse par cytométrie en flux des cellules HS-5 marquées par les anticorps anti-ICAM-1, anti-Podoplanin,anti-LTβR, anti-TNFRI et anti-TNFRII.* ***A)*** *Les panels montrent une analyse représentative de l'expression de ICAM-1 et de la podoplanine à la surface des cellules HS-5 CD90^{pos}CD19^{neg} cultivées seules ou en présence de cellules primaires LLC.* ***B)*** *Les panels montrent l'expression de LTβR et des TNFR I et II par les cellules HS-5 cultivées seules. L'acquisition et l'analyse des données ont été réalisées à l'aide d'un cytomètre canto II et du logiciel FlowJo (BD Bioscience).*

Les résultats présentés dans la figure 17 montrent que les cellules HS-5 sont positives pour la Podoplanine, ICAM-1, LTβR et TNFRI/II, avec une expression dominante du TNFRI par rapport au TNFRII. L'expression de la Podoplanine et de ICAM-1a également été analysée dans les cellules HS-5 cultivées avec des cellules LLC mais aucun changement de cette expression n'a été constaté entre les deux conditions. Par ailleurs, nous n'avons pas détecté d'expression de VCAM dans les cellules HS-5, qu'elles soient cultivées seules ou en présence de cellules LLC. L'ensemble de ces résultats indiquent que les cellules HS-5 présentent un phénotype comparable aux cellules FRC.

D'un point de vue fonctionnel, les FRC attirent les cellules B vers la zone pré-folliculaire du ganglion via la sécrétion du CXCL13 qui se fixe sur son récepteur CXCR5 présent sur les cellules B et favorisent leur survie. De plus, les FRC secrètent le CCL19 et CCL21 afin d'attirer les cellules T naïves vers la zone para-corticale du ganglion et induire leur survie via la sécrétion du facteur de pro-survie IL-7 [179].

L'analyse par qPCR de l'expression de CCL19, CCL21 et CXCL13 dans les cellules HS-5 seules ou en co-culture avec les cellules LLC indique que les cellules HS-5 n'expriment ni le CCL21 ni le CXCL13 (données non montrées) tandis qu'elles expriment le CCL19 (figure 18, panel A). Ce taux d'expression semble augmenter en présence de cellules LLC et des expériences supplémentaires sont en cours afin de reproduire et de confirmer ces résultats.

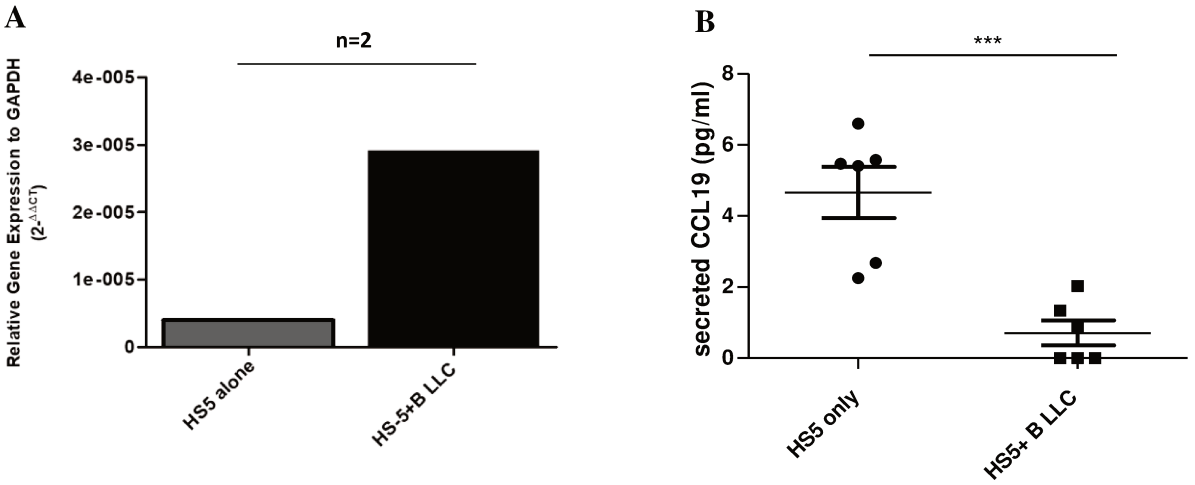


Figure 18 : Expression du CCL19 dans les cellules HS-5 en co-culture avec les cellules B LLC. A) *Analyse de l'expression de CCL19 par RTqPCR dans les cellules HS-5 en coculture (HS-5+B LLC) ou cultivées seules (HS-5 alone) avec les cellules primaires LLC pendant 24h. Les données représentent la moyenne du* $2^{-\Delta\Delta Ct}$*. Le gène de ménage utilisé est la GAPDH.* ***B)*** *Représentation graphique du taux de CCL19 sécrété et quantifié par ELISA-multiplex à partir du surnageant de cellules HS-5 cultivées seules (HS-5 only) ou en co-culture (HS-5+B LLC). ***p= 0,0006, t-test.*

En parallèle, nous avons analysé le taux de sécrétion du CCL19 par les HS-5 (figure 18, panel B). Pour cela, le surnageant de cellules de HS-5 cultivées 24h seules ou en présence de cellules primaires LLC (n=6) a été analysé par ELISA-multiplex. Le résultat montre qu'une faible concentration de CCL19 est détecté dans le surnageant et ce taux diminue de façon significative en présence des cellules B LLC. Ce dernier résultat surprenant par rapport aux données de qPCR est à mettre en relation avec un taux d'expression du CCR7 (récepteur de CCL19) élevée à la surface des cellules LLC et qui est corrélée à la présence d'adénopathies chez les patients. Cette diminution du CCL19 dans le surnageant pourrait ainsi s'expliquer par une internalisation du CCL19 par les cellules LLC via le CCR7. Ces résultats à confirmer suggèrent que les cellules de LLC pourraient conférer un rôle chimio-attractif aux cellules HS-5.

3. Les cellules tumorales de LLC pourraient orienter les cellules HS-5 vers un phénotype immuno-modulateur

Une autre caractéristique importante des cellules FRC consiste en leur fonction immunosuppressive via l'expression à leur surface de PDL-1 et/ou la sécrétion de NO en réponse à l'INFγ synthétisés par les lymphocytes T[185] .

Sur cette base, nous avons évalué par RT-qPCR le niveau d'expression du gène PDL-1 dans les cellules HS-5 en absence ou en présence de cellules LLC. Le nombre de réplicas de ces expériences ne nous permet pas d'en faire une analyse statistique mais il y a une tendance à la hausse de l'expression de PDL-1 lorsque les cellules HS-5 sont cultivées en présence de cellules LLC (figure 19, panel A). En parallèle, nous avons analysé le taux de protéine PDL-1 à la surface des HS-5 après 24h de culture avec les B LLC et les résultats montrent un taux inchangé en présence des cellules LLC (figure 19, panel B).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que les cellules LLC pourraient conférer aux cellules HS-5 un rôle immunosuppressif. Ces résultats sont concordant avec ceux de la littérature qui indiquent que les patients LLC progressifs présentent un niveau de lymphocytes T PD1+ et de lymphocytes T régulateurs plus élevés[197,198]. L'augmentation de l'expression de PDL-1 à la surface des cellules stromales correspondrait ainsi un mécanisme de perturbation du fonctionnement des cellules immunitaires responsables de la reconnaissance anti-tumorale.

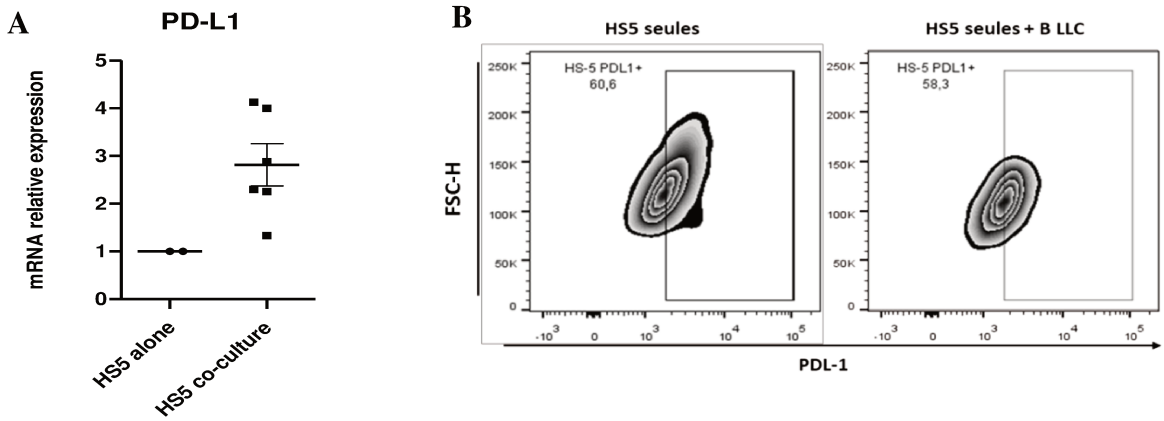


Figure 19 : Expression de PDL-1 par les HS-5 en co-culture avec les cellules LLC. A) *Analyse de l'expression de PDL-1 par RT-qPCR dans les cellules HS-5 en coculture (n=6) ou non (HS-5 alone) avec les cellules LL 24h. Les données représentent la moyenne du* $2^{-\Delta Ct}$*. Le gène de ménage utilisé est la GAPDH.* ***B)*** *Analyse par cytométrie en flux des HS-5 marquées par les anticorps anti-PDL-1. Les panels montrent une analyse représentative de l'expression de PDL-1à la surface des cellules HS-5 seules ou en co-culture. L'acquisition et l'analyse des données ont été réalisés à l'aide d'un cytomètre canto II et du logiciel FlowJo (BD Bioscience).*

Il est intéressant de noter que lorsque nous avons analysé par cytométrie l'expression de PDL-1 dans les cellules B LLC en co-culture avec les cellules HS-5, celle-ci était augmentée en comparaison avec les B LLC seules. Ce résultat est cohérent avec l'effet immunosuppresseur des cellules LLC décrit dans la leucémie lymphoïde chronique[199].

Comme cité précédemment, les cellules FRC, tout comme les BMSC, peuvent avoir un rôle immuno-modulateur et exprimer des molécules immunosuppressives tels que PDL-1 et cela dans un contexte pro-inflammatoire.

L'expression de la protéine immuno-modulatrice PD-L1 peut être induite dans les FRC par l'IFN-γ ou le TNFα secrétés par les lymphocytes T et les monocytes [200]. Dans ce contexte, nous avons évalué l'impact de la co-culture des cellules HS-5avec des cellules LLC sur la production d'IFN-γet de TNFα. Pour cela, nous avons analysé par ELISA la quantité d'IFN-γ et de TNFα présente dans les

surnageant de cellules HS-5 cultivées seules ou en présence de cellules LLC. Les résultats présentés dans la figure 20 montrent une diminution significative de la quantité d'IFN-γ et TNFα dans le surnageant de la co-culture.

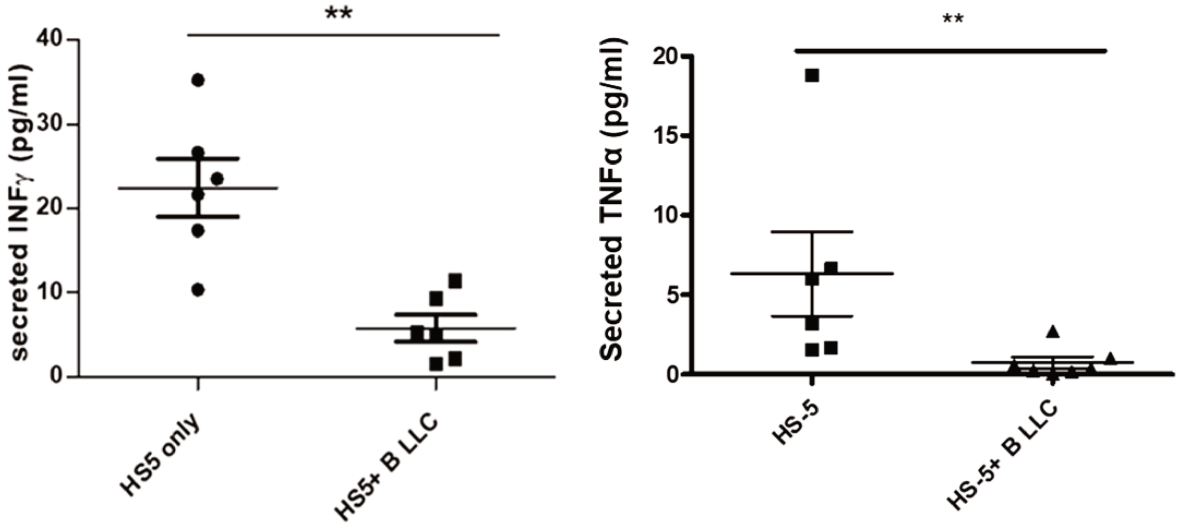


Figure 20 : *Mesure par ELISA du taux de TNFα et d'IFN-γ sécrétés dans les surnageants des cellules HS-5 cultivées seules (HS-5 only) ou en co-culture avec des cellules LLC (HS-5 + B LLC). **p<0.01*

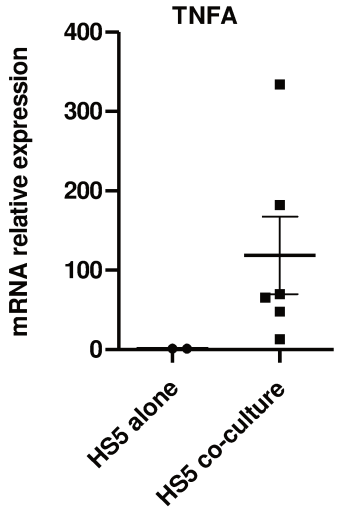


Figure 21 : Expression de TNFα par les HS-5 en co-culture avec les B LLC*. Analyse de l'expression de TNFα par RTqPCR dans les cellules HS-5 en coculture (n=6) ou non (HS-5 alone) (n=2) avec les B LLC pendant 24h. Les données représentent la moyenne de 2deltact. Le gène de ménage utilisé est la GAPDH.*

En revanche, l'analyse par RT-qPCR montre une augmentation du niveau d'expression de TNFα dans les HS-5 à la suite de la co-culture avec des cellules LLC (figure 21). Ce résultat qui apparaît contradictoire par rapport au taux protéique pourrait s'expliquer par le fait que le TNFα sécrété serait très rapidement internalisé par les cellules B LLC ou par les cellules HS-5 elles même afin d'assurer un rétrocontrôle.

Discussion

Le microenvironnement tumoral, défini comme l'ensemble des cellules et des facteurs sécrétés qui entourent les cellules tumorales, est impliqué dans la physiopathologie de la LLC favorisant le maintien, la survie et la prolifération des cellules B leucémiques qui s'accumulent dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires. La cellule tumorale communique avec son microenvironnement soit par un contact direct cellule-cellule, soit de manière indirecte via des cytokines et des chimiokines. La caractérisation de ce dialogue entre cellules LLC et son microenvironnement a fait l'objet de nombreux travaux car, malgré les avancées thérapeutiques, la LLC reste à ce jour une maladie incurable. Si le caryotype ou les mutations récurrentes des cellules leucémiques ont des impacts pronostiques bien définis dans la maladie et permettent une prise en charge personnalisée des patients, l'influence du microenvironnement tumoral de la LLC et notamment les mécanismes impliqués dans la survie, la prolifération et la résistance aux traitements ont reçu une attention particulière afin d'identifier de potentielles et nouvelles cibles thérapeutiques.

Le fil conducteur de ce travail a été l'exploration du dialogue entre la cellule tumorale et son microenvironnement. Nous avons exploré deux axes : l'impact du microenvironnement sur la cellule tumorale mais aussi comment la cellule tumorale peut modifier ce microenvironnement à son avantage.

Pour mimer le microenvironnement *in vitro* nous avons utilisé la lignée de cellules stromales HS-5, reconnue et validée comme modèle cellulaire reproduisant les caractéristiques immunorégulatrices et de soutien à la croissance des cellules tumorales[186]. Concernant la composante tumorale, nous avons utilisé des cellules primaires de patients obtenus auprès du service d'hématologie biologique de l'hôpital Avicenne. D'autre part, les lignées cellulaires de LLC MEC-1 et HG-3 ont été utilisées afin de mettre au point les expériences nécessitant un nombre important des cellules.

Les cellules LLC ont besoin du microenvironnement tumoral pour soutenir leur survie. En effet, l'isolement des cellules LLC en dehors de l'organisme entraîne rapidement leur apoptose en culture[132]. Lorsqu'elles sont mises en co-culture avec les cellules HS-5, les cellules LLC se répartissent en deux fractions cellulaires, l'une adhérente aux cellules stromales et l'autre non-adhérente à ces cellules. Dans ce contexte, notre attention s'est portée sur l'étude de la β-caténine, une protéine capable de réguler à la fois l'adhérence des cellules et la transcription des gènes pro-survie. Nous avons observé dans les cellules non-adhérentes à la composante stromales, une augmentation de la β-caténine qui présentait une activité transcriptionnelle se traduisant par l'induction de l'expression de la cycline D1. La cycline D1 est un gène cible de la voie de signalisation du ligand Wnt qui entraîne la stabilisation

de la β-caténine et l'activation de sa fonction transcriptionnelle[201]. En revanche, aucun des autres gènes cibles de la voie Wnt testés dans notre étude ne semblent être induits dans les cellules LLC en co-culture avec des cellules HS-5. Ces résultats corroborent ce que nous avions observé dans un autre modèle de syndrome lymphoprolifératif, le lymphome à cellules du manteau (MCL). Le MCL partage de multiples caractéristiques communes avec la LLC, notamment l'accumulation de lymphocytes B CD5+ avec une forte dépendance du microenvironnement et de la voie du BCR pour leur survie. Dans le MCL, la stimulation antigénique permet la stabilisation de la β-caténine, son accumulation nucléaire et sa participation à la transcription de cytokines pro-survie dont l'IL-6[189]. Dans la LLC, nous n'avons pas pu établir de rôle de la β-caténine sur la synthèse de l'IL-6, bien que sa transcription soit induite par la co-culture. En conséquence et à l'aide d'expériences de ChIP-Seq, nous cherchons actuellement à identifier d'autres gènes cibles de la β-caténine afin de mieux définir son rôle transcriptionnel ainsi que ses partenaires nucléaires potentiels compte tenu du fait que la β-caténine ne se lie pas directement à l'ADN (coactivateur transcriptionnel).

Comme dans les cellules de MCL, la stabilisation de la β-caténine dans les cellules LLC co-cultivées avec des cellules HS-5 est inhibée par un traitement à l'Ibrutinib, un inhibiteur irréversible de la kinase BTK. En plus d'être un effecteur de la voie du BCR, BTK peut être activée en aval de récepteurs de cytokines et de chimiokines tels que le CXCR4 [49]. Nous avons observé que la stimulation des cellules LLC par du CXCL12, le ligand du CXCR4, stabilise la β-caténine. Ce résultat suggère que le CXCL12 pourrait être un des facteurs solubles responsables de l'augmentation et de la stabilisation de la β-caténine dans les cellules LLC non adhérentes aux cellules stromales.

Nous avons montré que la β-caténine interagissait avec BTK dans les cellules LLC en co-culture avec des cellules HS-5. Il a été par ailleurs montré que BTK pouvait phosphoryler la β-caténine sur son résidu Y654. Cette phosphorylation diminue l'affinité de la β-caténine pour les cadhérines, augmentant ainsi la probabilité de translocation de la β-caténine stabilisée dans le noyau [202]. Par ailleurs, une étude effectuée dans notre laboratoire sur un modèle de cellules cancéreuses pulmonaires a montré que la β-caténine interagissait également avec la kinase Syk et que cette dernière phosphoryle la β-caténine sur ses résidus Y142 et Y654[203]. Tout comme BTK, Syk fait partie du signalosome associé au BCR et participe en association avec Vav1, un facteur d'échange des GTPases Rho, à la stabilisation et à la localisation de la β-caténine. Il est alors tentant de proposer que la β-caténine pourrait interagir avec BTK et Syk au sein du signalosome afin de réguler son activité et sa distribution dans la cellule.

Afin de mieux comprendre le rôle de la collaboration entre BTK et la β-caténine observée dans les cellules de LLC, nous avons utilisé les cellules HEK293T qui n'expriment pas BTK. La surexpression de BTK dans ces cellules altère leur morphologie avec la formation des protrusions. Ce phénotype dépend de la β-caténine car son invalidation par siRNA rétablie la forme cuboïde des cellules HEK293T. En parallèle, nous avons tenté d'invalider la β-caténine dans les cellules LLC par siRNA mais cette stratégie s'est révélée infructueuse probablement parce que l'activité de la β-caténine est nécessaire à la survie de ces cellules. Nous avons donc opté pour une stratégie de surexpression d'une β-caténine stabilisée en transfectant les cellules LLC (lignées HG-3 et MEC-1) par le mutant S45A qui ne peut pas être phosphorylé sur la sérine 45 par GSK3β et ne peut donc pas être dégradé par le protéasome. La surexpression de cette β-caténine S45A favorise l'adhérence des cellules LLC aux cellules stromales sans altérer leur capacité de migration en réponse au CXCL12. Cette adhérence accrue des cellules tumorales aux cellules du microenvironnement pourrait être due à l'augmentation concomitante des cadhérines, comme suggéré par les travaux de Mangolini *et al.* Nous ne pouvons cependant pas exclure un effet médié par les intégrines car il est connu que l'activation de BTK entraîne une augmentation de l'expression membranaire de VLA-4 [55,49].

Par cytométrie en flux, nous avons observé que les cellules LLC adhérentes aux cellules stromales présentent un taux de β-caténine plus faible que celui des cellules non-adhérentes. Cela peut probablement s'expliquer par le fait que dans les cellules adhérentes, la β-caténine cytoplasmique est dégradée, comme elle l'est en absence de stimulation Wnt. Une fluctuation dynamique du niveau de β-caténine membranaire permettrait aux cellules d'adhérer puis de se détacher de la composante stromale. En effet, des données préliminaires du laboratoire suggèrent que les cellules LLC adhérentes aux cellules stromales sont capables de se détacher de celles-ci mais maintiennent la capacité de réadhérer sur une nouvelle sous-couche de cellules stromales. Ce cycle dynamique d'attachement puis de détachement des cellules constituerait ainsi un mécanisme d'échange d'information entre la fraction cellulaire tumorale et son microenvironnement.

En conclusion de cette première partie du projet, il apparaît que l'axe BTK-β-caténine constitue un nouveau régulateur de l'interaction bidirectionnelle entre les cellules tumorales et le microenvironnement qui pourrait être ciblé par Ibrutinib. La mise en évidence du rôle joué par la β-caténine à la fois en tant qu'effecteur de l'adhésion cellulaire et de la transduction du signal dans les cellules B leucémiques, permet ainsi d'enrichir nos connaissances sur les modes de communication des cellules LLC avec leur microenvironnement.

Dans la 2ème partie de ce projet, toujours centré sur le dialogue entre cellules tumorales et microenvironnement, nous nous sommes intéressés à l'impact des cellules LLC sur la composante stromale, toujours représentée dans notre étude par les cellules HS-5. Il est clairement établi que les sites préférentiels de prolifération et d'accumulation des cellules LLC dans l'organisme sont les ganglions. Nous avons par ailleurs montré au laboratoire que l'architecture des ganglions des patients LLC est très désorganisée et caractérisée par une perte du réseau de cellules FRC et une disparition/non détection des cellules FDC[190]. Dans ce contexte, nous sommes demandés si les cellules LLC étaient capables d'orienter les cellules HS-5 vers un profil phénotypique et fonctionnel de type FRC (FRC-like).

Nous avons tout d'abord confirmé le profil « stromal » de la lignée cellulaire HS-5 cultivée seule ou en co-culture avec les cellules LLC. Les cellules HS-5 sont positives pour le CD90 et le CD73 et négatives pour le CD31 et le CD45. Ce profil est de plus invariable et stable au cours des passages cellulaires. De façon intéressante, les HS-5 expriment également à l'état basal des marqueurs caractéristiques des cellules FRC à savoir la Podoplanine (PDPN), le récepteur de la lymphotoxin β (LTβR), ICAM et les récepteurs de type 1 et 2 aux TNFα (TNFR1 et TNFR2). Ce profil d'expression atypique, observé de façon systématique à chaque expérience, pourrait être dû aux conditions de culture des cellules HS-5. Lorsque les cellules HS-5 sont co-cultivées avec des cellules LLC, ces profils restent inchangés indiquant les cellules LLC n'ont pas d'impact sur l'expression des marqueurs de cellules stromales et de FRC par les cellules HS-5.

Nous avons tout d'abord confirmé le profil « stromal » de la lignée cellulaire HS-5 cultivée seule ou en co-culture avec les cellules LLC. Les cellules HS-5 sont positives pour le CD90 et le CD73 et négatives pour le CD31 et le CD45. Ce profil est de plus invariable et stable au cours des passages cellulaires. De façon intéressante, les HS-5 expriment également à l'état basal des marqueurs caractéristiques des cellules FRC à savoir la Podoplanine (PDPN), le récepteur de la lymphotoxin β (LTβR), ICAM et les récepteurs de type 1 et 2 aux TNFα (TNFR1 et TNFR2). Ce profil d'expression atypique, observé de façon systématique à chaque expérience, pourrait être dû aux conditions de culture des cellules HS-5. Lorsque les cellules HS-5 sont co-cultivées avec des cellules LLC, ces profils restent inchangés indiquant les cellules LLC n'ont pas d'impact sur l'expression des marqueurs de cellules stromales et de FRC par les cellules HS-5.

Du point de vue fonctionnel, les FRC sont dotées de capacité de chimioattraction vis-à-vis des cellules immunitaires. En effet, les FRC, via la sécrétion des chimiokines CXCL13, CCL19 et CCL21, sont impliquées dans la migration des cellules B et des cellules T au sein du ganglion lymphatique.

Nous avons observé qu'en présence de cellules LLC, les cellules HS-5 augmentent leur transcription du gène CCL19. En revanche, aucune expression de CCL21 et de CXCL13 n'a été détectée, que ce soit en absence ou en présence de cellules LLC. Par ailleurs, Valencia *et al*. ont montré que les FRC humaines et murines n'expriment pas le CCL21 et le CCL19 à l'état basal mais qu'elles induisent la transcription de ces gènes lorsqu'elles sont co-cultivées avec des cellules T[200]. Dans notre modèle de coculture cellules HS-5/cellules B leucémiques, nous observons également une induction de la transcription du gène CCL19 dans les cellules HS-5. Sachant que les cellules LLC sont connues pour présenter des caractéristiques immunosuppressives, l'induction et la sécrétion de CCL19 par les cellules HS-5 permettrait d'attirer les cellules T au voisinage des cellules LLC afin d'être éliminées par ces dernières. Ce mécanisme pourrait être confirmé par des tests de co-culture entre des cellules T et des cellules HS-5 qui auraient été mises au préalable en contact avec les cellules LLC dans le but d'engager leur reprogrammation. En parallèle, nous avons également analysé la sécrétion du CCL19 dans le milieu de co-culture. Les résultats montrent une diminution du taux de CCL19 sécrété, ce qui apparaît contradictoire avec les résultats de transcription. Il est cependant intéressant de noter que les cellules LLC sur-expriment le CCR7 [136], le récepteur du CCL19, et que cette surexpression est corrélée à la présence d'adénopathie chez les patients. Cette diminution du taux de CCL19 dans le milieu de culture pourrait alors s'expliquer par un phénomène d'internalisation du CCL19 par les cellules LLC.

Une des caractéristiques communes que partagent les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) et les FRC est leur capacité immunosuppressive au sein d'un contexte inflammatoire. Aussi et considérant les cellules HS-5 présentent un phénotype mésenchymateux, nous nous sommes intéressés aux propriétés immunosuppressives des cellules HS-5 en co-culture avec les cellules LLC. Nous avons tout d'abord examiné l'expression de la protéine immunomodulatrice PDL-1 qui est exprimée à la fois par les MSC et les FRC en réponse à des cytokines inflammatoires telles que le TNFα et l'IFNγ. Les résultats montrent une augmentation de la transcription de PDL-1 dans les cellules HS-5 en présence de cellules LLC. Cette induction transcriptionnelle ne se traduit cependant par une augmentation du taux protéique à la surface des cellules. En revanche et de manière intéressante, l'expression de PDL-1 semble augmentée dans les cellules LLC en co-culture. Ce résultat est à mettre en relation avec une étude montrant une différence d'expression de PDL-1 entre les cellules LLC CXCR4+CD5- circulantes dans le sang périphérique et les cellules LLC CXCR4-CD5+ présentes dans les ganglions et la moelle osseuse, les cellules présentes dans le ganglions sont CXCR4-CD5+ présentent une expression plus élevée que les cellules CXCR4+CD5+[204].

D'autres travaux ont montré qu'au sein des centres prolifératifs des ganglions LLC, les lymphocytes T CD4+/PD-1+ étaient en contact étroit avec les cellules leucémiques PD-L1+. De plus,

l'axe PD-1/PDL-1 contribue à l'inhibition de la production d'IFN-γ par les cellules T CD8+ [205]. Sur la base de ces informations, nous avons analysé le taux de sécrétion des deux cytokines pro-inflammatoires IFNγ et TNFα dans le surnageant de co-culture en comparaison avec le surnageant des cellules HS-5 seules. Les résultats montrent une diminution significative de la quantité d'IFNγ et du TNFα sécrété dans le milieu. De manière surprenante, les résultats de la RT-qPCR montrent une augmentation significative de la transcription du TNFα dans les cellules HS-5 en co-culture. Il est important de noter que le TNFα et la lymphotoxin αβ collaborent pour induire un phénotype FRC complet dans les cellules stromales humaines [195]. Cela pourrait être lié à l'activation de deux voies de signalisation différentes : celle en aval duTNFR1 qui induit la voie NF-κB canonique impliquant le complexe IKK2/NEMO et celle en aval du LTβR qui active la voie NF-κB alternative aboutissant à une translocation des hétérodimères p52:RelB indépendante d'IKK2 et dépendante d'IKK1[179].

Dans ce travail nous avons montré que les HS-5 expriment le TNFR1 et le TNFR2. Ainsi, la diminution du taux de TNFα sécrété dans le milieu pourrait s'expliquer par une consommation rapide de cette cytokine par les cellules HS-5 ou par les cellules LLC qui expriment le TNFR2 afin d'induire la signalisation dépendante de NF-κB. De plus les cellules LLC représentent une source majeure de production de Lymphotoxin αβ qui, en se fixant sur le LTβR présent à la surface des cellules FDC, induit la libération de CXCL13[10].

L'ensemble des informations obtenues dans cette 2ème partie du projet indiquent que les cellules LLC engagent divers processus ayant pour objectif de perturber l'activité anti-tumorale du système immunitaire. Une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels la cellule tumorale permet d'échapper à la surveillance immunitaire permettrait d'établir de nouvelles pistes thérapeutiques visant à bloquer le dialogue délétère entre la cellule leucémique et son microenvironnement et à rétablir une immunité efficace au sein des sites de prolifération tumoraux.

Bibliographie

1. Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am. J. Hematol.* 90, 446–460 (2015).
2. Kitada, S. *et al.* Expression of Apoptosis-Regulating Proteins in Chronic Lymphocytic Leukemia: Correlations With In Vitro and In Vivo Chemoresponses. *Blood* 91, 3379–3389 (1998).
3. Schena, M. *et al.* Growth- and differentiation-associated expression of bcl-2 in B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 79, 2981–2989 (1992).
4. Messmer, B. T. *et al.* In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J. Clin. Invest.* 115, 755–764 (2005).
5. Defoiche, J. *et al.* Reduction of B cell turnover in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 143, 240–247 (2008).
6. Herndon, T. M. *et al.* Direct in vivo evidence for increased proliferation of CLL cells in lymph nodes compared to bone marrow and peripheral blood. *Leukemia* 31, 1340–1347 (2017).
7. Rossi, D. Venetoclax: a new weapon to treat high-risk CLL. *Lancet Oncol.* 17, 690–691 (2016).
8. Tsimberidou, A.-M. & Keating, M. J. Richter syndrome: Biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer* 103, 216–228 (2005).
9. Pflug, N. *et al.* Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 124, 49–62 (2014).
10. Dubois, N. *et al.* Importance of Crosstalk Between Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and the Stromal Microenvironment: Direct Contact, Soluble Factors, and Extracellular Vesicles. *Front. Oncol.* 10, 1422 (2020).
11. Baliakas, P. *et al.* Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 29, 329–336 (2015).
12. Landau, D. A. *et al.* Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 526, 525–530 (2015).
13. Campregher, P. V. & Hamerschlak, N. Novel Prognostic Gene Mutations Identified in Chronic Lymphocytic Leukemia and Their Impact on Clinical Practice. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 14, 271–276 (2014).
14. Collins, R. J. *et al.* Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br. J. Haematol.* 71, 343–350 (2008).
15. Caligaris-Cappio, F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 123, 380–388 (2003).
16. Arruga, F. *et al.* Functional impact of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 28, 1060–1070 (2014).
17. Burger, J. A. Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): From understanding the basics towards therapeutic targeting. *Semin. Cancer Biol.* 20, 424–430 (2010).
18. Chiorazzi, N. & Ferrarini, M. B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: Lessons Learned from Studies of the B Cell Antigen Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 841–894 (2003).
19. Stevenson, F. K. & Caligaris-Cappio, F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* 103, 4389–4395 (2004).
20. Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G. & Stevenson, F. K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 1848–1854 (1999).
21. Orchard, J. A. *et al.* ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet* 363, 105–111 (2004).

22. Pleiman, C. M., D'Ambrosio, D. & Cambier, J. C. The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Immunol. Today* 15, 393–399 (1994).
23. Burger, J. A. Inhibiting B-Cell Receptor Signaling Pathways in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 7, 26–33 (2012).
24. Davids, M. S. & Brown, J. R. Targeting the B Cell Receptor Pathway in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leuk. Lymphoma* 53, 2362–2370 (2012).
25. Johnson, G. L. & Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911–1912 (2002).
26. Krzysiek, R. *et al.* Antigen receptor engagement selectively induces macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokine production in human B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 4455–4463 (1999).
27. Niiro, H. & Clark, E. A. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 945–956 (2002).
28. Bystry, R. S., Aluvihare, V., Welch, K. A., Kallikourdis, M. & Betz, A. G. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat. Immunol.* 2, 1126–1132 (2001).
29. Sivina, M. *et al.* CCL3 (MIP-1α) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 117, 1662–1669 (2011).
30. Schönbeck, U. & Libby, P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 4–43 (2001).
31. Elgueta, R. *et al.* Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* 229, 152–172 (2009).
32. Mineva, N. D., Rothstein, T. L., Meyers, J. A., Lerner, A. & Sonenshein, G. E. CD40 ligand-mediated activation of the de novo RelB NF-kappaB synthesis pathway in transformed B cells promotes rescue from apoptosis. *J. Biol. Chem.* 282, 17475–17485 (2007).
33. Cuní, S. *et al.* A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 18, 1391–1400 (2004).
34. Kitada, S., Zapata, J. M., Andreeff, M. & Reed, J. C. Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 106, 995–1004 (1999).
35. Palacios, F. *et al.* Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. *Leukemia* 29, 115–125 (2015).
36. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397 (1997).
37. Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335–376 (2003).
38. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511 (2004).
39. Anders, H.-J., Banas, B. & Schlöndorff, D. Signaling Danger: Toll-Like Receptors and their Potential Roles in Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 854–867 (2004).
40. Bourke, E., Bosisio, D., Golay, J., Polentarutti, N. & Mantovani, A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* 102, 956–963 (2003).
41. Akira, S. TLR Signaling. in *From Innate Immunity to Immunological Memory* (eds. Pulendran, B. & Ahmed, R.) vol. 311 1–16 (Springer Berlin Heidelberg, 2006).
42. Bernasconi, N. L., Onai, N. & Lanzavecchia, A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 101, 4500–4504 (2003).
43. Grandjenette, C., Kennel, A., Faure, G. C., Béné, M. C. & Feugier, P. Expression of functional toll-like receptors by B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 92, 1279–1281 (2007).

44. Fonte, E. *et al.* In vitro sensitivity of CLL cells to fludarabine may be modulated by the stimulation of Toll-like receptors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 367–379 (2013).
45. Purroy, N. *et al.* Targeting the proliferative and chemoresistant compartment in chronic lymphocytic leukemia by inhibiting survivin protein. *Leukemia* 28, 1993–2004 (2014).
46. Spaner, D. E. & Masellis, A. Toll-like receptor agonists in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 21, 53–60 (2007).
47. Kashyap, M. K. *et al.* Targeting the CXCR4 pathway using a novel anti-CXCR4 IgG1 antibody (PF-06747143) in chronic lymphocytic leukemia. *J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol* 10, 112 (2017).
48. Guo, F. *et al.* CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene* 35, 816–826 (2016).
49. Montresor, A. *et al.* JAK2 tyrosine kinase mediates integrin activation induced by CXCL12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* 6, 34245–34257 (2015).
50. Andersson, E. R., Sandberg, R. & Lendahl, U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Dev. Camb. Engl.* 138, 3593–3612 (2011).
51. Kopan, R. & Ilagan, M. X. G. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216–233 (2009).
52. Fabbri, G. & Dalla-Favera, R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 16, 145–162 (2016).
53. Fabbri, G. *et al.* Common nonmutational NOTCH1 activation in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E2911–E2919 (2017).
54. Rosati, E. *et al.* Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* 113, 856–865 (2009).
55. Mangolini, M. *et al.* Notch2 controls non-autonomous Wnt-signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Commun.* 9, 3839 (2018).
56. Barth, A. I., Näthke, I. S. & Nelson, W. J. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 683–690 (1997).
57. Morin, P. J. *et al.* Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787–1790 (1997).
58. Sineva, G. S. & Pospelov, V. A. β-Catenin in pluripotency: adhering to self-renewal or Wnting to differentiate? *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 312, 53–78 (2014).
59. Kumar, R. & Bashyam, M. D. Multiple oncogenic roles of nuclear beta-catenin. *J. Biosci.* 42, 695–707 (2017).
60. Daugherty, R. L. & Gottardi, C. J. Phospho-regulation of β-Catenin Adhesion and Signaling Functions. *Physiol. Bethesda Md* 22, 303–309 (2007).
61. Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a Drosophila segment polarity gene - PubMed. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2707602/.
62. Graham, T. A., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D. & Xu, W. Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. *Cell* 103, 885–896 (2000).
63. Pronobis, M. I. & Peifer, M. Wnt Signaling: The Many Interfaces of β-Catenin. *Curr. Biol.* 22, R137–R139 (2012).
64. Heuberger, J. & Birchmeier, W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a002915 (2010).
65. Hulpiau, P. & van Roy, F. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 349–369 (2009).
66. Shapiro, L. & Weis, W. I. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003053 (2009).

67. Nelson, W. J. Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 149–155 (2008).
68. Piedra, J. *et al.* Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 20436–20443 (2001).
69. Daugherty, R. L. & Gottardi, C. J. Phospho-regulation of β-Catenin Adhesion and Signaling Functions. *Physiol. Bethesda Md* 22, 303–309 (2007).
70. Gottardi, C. J., Wong, E. & Gumbiner, B. M. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J. Cell Biol.* 153, 1049–1060 (2001).
71. Soncin, F. *et al.* E-Cadherin Acts as a Regulator of Transcripts Associated with a Wide Range of Cellular Processes in Mouse Embryonic Stem Cells. *PLOS ONE* 6, e21463 (2011).
72. Wang, B. *et al.* β-Catenin: oncogenic role and therapeutic target in cervical cancer. *Biol. Res.* 53, (2020).
73. Liu, C. *et al.* Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837–847 (2002).
74. Yost, C. *et al.* The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* 10, 1443–1454 (1996).
75. Hart, M. *et al.* The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr. Biol. CB* 9, 207–210 (1999).
76. Cadigan, K. M. & Liu, Y. I. Wnt signaling: complexity at the surface. *J. Cell Sci.* 119, 395–402 (2006).
77. Wang, H., Liu, T. & Malbon, C. C. Structure-function analysis of Frizzleds. *Cell. Signal.* 18, 934–941 (2006).
78. Davidson, G. *et al.* Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 438, 867–872 (2005).
79. Zeng, X. *et al.* A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873–877 (2005).
80. Gao, Z.-H., Seeling, J. M., Hill, V., Yochum, A. & Virshup, D. M. Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1182–1187 (2002).
81. Li, L. *et al.* Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J.* 18, 4233–4240 (1999).
82. Wnt-induced dephosphorylation of Axin releases β-catenin from the Axin complex. http://genesdev.cshlp.org/content/13/14/1768.
83. Piao, S. *et al.* Direct Inhibition of GSK3β by the Phosphorylated Cytoplasmic Domain of LRP6 in Wnt/β-Catenin Signaling. *PLoS ONE* 3, e4046 (2008).
84. SAITO-DIAZ, K. *et al.* The way Wnt works: Components and mechanism. *Growth Factors Chur Switz.* 31, 1–31 (2013).
85. Su, Y. *et al.* APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Mol. Cell* 32, 652–661 (2008).
86. Fagotto, F., Glück, U. & Gumbiner, B. M. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr. Biol. CB* 8, 181–190 (1998).
87. Xue, J. *et al.* Tumour suppressor TRIM33 targets nuclear β-catenin degradation. *Nat. Commun.* 6, 6156 (2015).
88. Morgan, R. G., Ridsdale, J., Tonks, A. & Darley, R. L. Factors affecting the nuclear localization of β-catenin in normal and malignant tissue. *J. Cell. Biochem.* 115, 1351–1361 (2014).

89. Lilien, J. & Balsamo, J. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 459–465 (2005).
90. Wu, X. *et al.* Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133, 340–353 (2008).
91. Fang, D. *et al.* Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 282, 11221–11229 (2007).
92. Wnt signaling pathway in development and cancer. *J. Physiol. Pharmacol.* (2018) doi:10.26402/jpp.2018.2.07.
93. Thakur, R. & Mishra, D. P. Pharmacological modulation of beta-catenin and its applications in cancer therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 17, 449–456 (2013).
94. Boso, D. *et al.* HIF-1α/Wnt signaling-dependent control of gene transcription regulates neuronal differentiation of glioblastoma stem cells. *Theranostics* 9, 4860–4877 (2019).
95. Nlandu-Khodo, S. *et al.* Tubular β-catenin and FoxO3 interactions protect in chronic kidney disease. *JCI Insight* 5, 135454 (2020).
96. Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling - PubMed. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18423204/.
97. Luis, T. C., Ichii, M., Brugman, M. H., Kincade, P. & Staal, F. J. T. Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development. *Leukemia* 26, 414–421 (2012).
98. Staal, F. J. T., Chhatta, A. & Mikkers, H. Caught in a Wnt storm: Complexities of Wnt signaling in hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 44, 451–457 (2016).
99. Khan, W. N. *et al.* Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* 3, 283–299 (1995).
100. Pan, Z. *et al.* Discovery of Selective Irreversible Inhibitors for Bruton's Tyrosine Kinase. *ChemMedChem* 2, 58–61 (2007).
101. Byrd, J. C. *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 369, 32–42 (2013).
102. McDonald, C., Xanthopoulos, C. & Kostareli, E. The role of Bruton's tyrosine kinase in the immune system and disease. *Immunology* 164, 722–736 (2021).
103. Corneth, O. B. J., Klein Wolterink, R. G. J. & Hendriks, R. W. BTK Signaling in B Cell Differentiation and Autoimmunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 393, 67–105 (2016).
104. Burger, J. A. & Wiestner, A. Targeting B cell receptor signalling in cancer: preclinical and clinical advances. *Nat. Rev. Cancer* 18, 148–167 (2018).
105. Rawlings, D. J., Schwartz, M. A., Jackson, S. W. & Meyer-Bahlburg, A. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 282–294 (2012).
106. Hendriks, R. W., Yuvaraj, S. & Kil, L. P. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 14, 219–232 (2014).
107. Dadashian, E. L. *et al.* TLR Signaling Is Activated in Lymph Node–Resident CLL Cells and Is Only Partially Inhibited by Ibrutinib. *Cancer Res.* 79, 360–371 (2019).
108. Ritter, S. L. & Hall, R. A. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 819–830 (2009).
109. Okada, T. *et al.* Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J. Exp. Med.* 196, 65–75 (2002).
110. Lowry, W. E. & Huang, X.-Y. G Protein beta gamma subunits act on the catalytic domain to stimulate Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 1488–1492 (2002).
111. Tsukada, S., Simon, M. I., Witte, O. N. & Katz, A. Binding of beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins to the PH domain of Bruton tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 11256–11260 (1994).

112. Servant, G. *et al.* Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* 287, 1037–1040 (2000).
113. de Gorter, D. J. J. *et al.* Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity* 26, 93–104 (2007).
114. de Rooij, M. F. M. *et al.* The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119, 2590–2594 (2012).
115. Zain, R. & Vihinen, M. Structure-Function Relationships of Covalent and Non-Covalent BTK Inhibitors. *Front. Immunol.* 12, (2021).
116. Estupiñán, H. Y. *et al.* BTK gatekeeper residue variation combined with cysteine 481 substitution causes super-resistance to irreversible inhibitors acalabrutinib, ibrutinib and zanubrutinib. *Leukemia* 35, 1317–1329 (2021).
117. Burger, J. A. & Montserrat, E. Coming full circle: 70 years of chronic lymphocytic leukemia cell redistribution, from glucocorticoids to inhibitors of B-cell receptor signaling. *Blood* 121, 1501–1509 (2013).
118. Ponader, S. *et al.* The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood* 119, 1182–1189 (2012).
119. Ferrer, G. & Montserrat, E. Critical molecular pathways in CLL therapy. *Mol. Med.* 24, 9 (2018).
120. Burger, J. A. *et al.* Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nat. Commun.* 7, 11589 (2016).
121. Furman, R. R. *et al.* Ibrutinib Resistance in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 370, 2352–2354 (2014).
122. Zhang, S. Q., Smith, S. M., Zhang, S. Y. & Lynn Wang, Y. Mechanisms of ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin lymphoma. *Br. J. Haematol.* 170, 445–456 (2015).
123. Audrito, V. *et al.* Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia offers novel therapeutic options. *Cancer Lett.* 328, 27–35 (2013).
124. Panayiotidis, P., Jones, D., Ganeshaguru, K., Foroni, L. & Hoffbrand, A. V. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells *in vitro*. *Br. J. Haematol.* 92, 97–103 (1996).
125. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. & Frolova, G. P. HETEROTOPIC TRANSPLANTS OF BONE MARROW: *Transplantation* 6, 230–247 (1968).
126. Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641–650 (1991).
127. Lindner, U., Kramer, J., Rohwedel, J. & Schlenke, P. Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfus. Med. Hemotherapy* 37, 75–83 (2010).
128. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317 (2006).
129. Lagneaux, L., Delforge, A., Dorval, C., Bron, D. & Stryckmans, P. Excessive production of transforming growth factor-beta by bone marrow stromal cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia inhibits growth of hematopoietic precursors and interleukin-6 production. *Blood* 82, 2379–2385 (1993).
130. Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., Bosmans, E. & Stryckmans, P. Comparative Analysis of Cytokines Released by Bone Marrow Stromal Cells from Normal Donors and B-cell Chronic Lymphocytic Leukemic Patients. *Leuk. Lymphoma* 17, 127–133 (1995).
131. Pontikoglou, C. *et al.* Study of the Quantitative, Functional, Cytogenetic, and Immunoregulatory Properties of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Patients with B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Stem Cells Dev.* 22, 1329–1341 (2013).

132. Lagneaux, L., Delforge, A., Bron, D., De Bruyn, C. & Stryckmans, P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 91, 2387–2396 (1998).
133. Brachtl, G. *et al.* Differential Bone Marrow Homing Capacity of VLA-4 and CD38 High Expressing Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *PLoS ONE* 6, e23758 (2011).
134. Burger, J. A., Zvaifler, N. J., Tsukada, N., Firestein, G. S. & Kipps, T. J. Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipolesis via a stromal cell–derived factor-1– and CD106 (VCAM-1)–dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 107, 305–315 (2001).
135. Tissino, E. *et al.* Functional and clinical relevance of VLA-4 (CD49d/CD29) in ibrutinib-treated chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 215, 681–697 (2018).
136. Till, K. J. *et al.* CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and α4β1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood* 105, 4813–4819 (2005).
137. Kubeczko, M. *et al.* Efficacy and safety of vitamin D supplementation in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 70, 534–541 (2016).
138. Trimarco, V. *et al.* Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia (CLL) tumor B cells and mesenchymal stromal cells (MSCs): implications for neoplastic cell survival. *Oncotarget* 6, 42130–42149 (2015).
139. Zhu, F., McCaw, L., Spaner, D. E. & Gorczynski, R. M. Targeting the IL-17/IL-6 axis can alter growth of Chronic Lymphocytic Leukemia in vivo/in vitro. *Leuk. Res.* 66, 28–38 (2018).
140. Plander, M. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia cells induce anti-apoptotic effects of bone marrow stroma. *Ann. Hematol.* 90, 1381–1390 (2011).
141. Coffman, L. G. *et al.* Ovarian Carcinoma-Associated Mesenchymal Stem Cells Arise from Tissue-Specific Normal Stroma. *Stem Cells Dayt. Ohio* 37, 257–269 (2019).
142. McLean, K. *et al.* Human ovarian carcinoma–associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J. Clin. Invest.* 121, 3206–3219 (2011).
143. Coffman, L. G. *et al.* Human carcinoma-associated mesenchymal stem cells promote ovarian cancer chemotherapy resistance via a BMP4/HH signaling loop. *Oncotarget* 7, 6916–6932 (2016).
144. Spaeth, E. L. *et al.* Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PloS One* 4, e4992 (2009).
145. Öhlund, D., Elyada, E. & Tuveson, D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J. Exp. Med.* 211, 1503–1523 (2014).
146. Paunescu, V. *et al.* Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 635–646 (2011).
147. Arena, S., Salati, M., Sorgentoni, G., Barbisan, F. & Orciani, M. Characterization of tumor-derived mesenchymal stem cells potentially differentiating into cancer-associated fibroblasts in lung cancer. *Clin. Transl. Oncol. Off. Publ. Fed. Span. Oncol. Soc. Natl. Cancer Inst. Mex.* 20, 1582–1591 (2018).
148. Barcellos-de-Souza, P. *et al.* Mesenchymal Stem Cells are Recruited and Activated into Carcinoma-Associated Fibroblasts by Prostate Cancer Microenvironment-Derived TGF-β1. *Stem Cells Dayt. Ohio* 34, 2536–2547 (2016).
149. Shangguan, L. *et al.* Inhibition of TGF-β/Smad signaling by BAMBI blocks differentiation of human mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts and abolishes their protumor effects. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 2810–2819 (2012).
150. Atiya, H., Frisbie, L., Pressimone, C. & Coffman, L. Mesenchymal Stem Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1234, 31–42 (2020).

151. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964 (2005).
152. Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K. & Itano, N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* 6, 1670–1690 (2014).
153. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549–555 (2002).
154. Hao, N.-B. *et al.* Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 948098 (2012).
155. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795 (2012).
156. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* 11, 889–896 (2010).
157. Heusinkveld, M. & van der Burg, S. H. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J. Transl. Med.* 9, 216 (2011).
158. Cook, J. & Hagemann, T. Tumour-associated macrophages and cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 595–601 (2013).
159. Ojalvo, L. S., King, W., Cox, D. & Pollard, J. W. High-density gene expression analysis of tumor-associated macrophages from mouse mammary tumors. *Am. J. Pathol.* 174, 1048–1064 (2009).
160. Adeegbe, D. O. & Nishikawa, H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front. Immunol.* 4, 190 (2013).
161. Ostuni, R., Kratochvill, F., Murray, P. J. & Natoli, G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol.* 36, 229–239 (2015).
162. Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41, 49–61 (2014).
163. Ysebaert, L. & Fournié, J.-J. Genomic and phenotypic characterization of nurse-like cells that promote drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 52, 1404–1406 (2011).
164. Giannoni, P. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive type 2 skewed macrophages. *Haematologica* 99, 1078–1087 (2014).
165. Filip, A. A. *et al.* Circulating microenvironment of CLL: are nurse-like cells related to tumor-associated macrophages. *Blood Cells. Mol. Dis.* 50, 263–270 (2013).
166. Zucchetto, A. *et al.* CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 Chemokines, and CD49d/Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Are Interchained by Sequential Events Sustaining Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Survival. *Cancer Res.* 69, 4001–4009 (2009).
167. Bhattacharya, N. *et al.* Non-malignant B cells and chronic lymphocytic leukemia cells induce a pro-survival phenotype in CD14+ cells from peripheral blood. *Leukemia* 25, 722–726 (2011).
168. Panse, J. *et al.* Chemokine CXCL13 is overexpressed in the tumour tissue and in the peripheral blood of breast cancer patients. *Br. J. Cancer* 99, 930–938 (2008).
169. Bürkle, A. *et al.* Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 110, 3316–3325 (2007).
170. Poggi, A. *et al.* Engagement of CD31 delivers an activating signal that contributes to the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* 151, 252–264 (2010).
171. Deaglio, S. *et al.* CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 105, 3042–3050 (2005).
172. Anderson, A. O. & Shaw, S. T cell adhesion to endothelium: the FRC conduit system and other anatomic and molecular features which facilitate the adhesion cascade in lymph node. *Semin. Immunol.* 5, 271–282 (1993).

173. Multifunctional Roles of Reticular Fibroblastic Cells: More Than Meets the Eye? https://www.hindawi.com/journals/jir/2014/402038/.
174. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1 - PubMed. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9486651/.
175. Heinig, K. *et al.* Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation. *Cancer Discov.* 4, 1448–1465 (2014).
176. Kim, H. S., Zhang, X. & Choi, Y. S. Activation and proliferation of follicular dendritic cell-like cells by activated T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 153, 2951–2961 (1994).
177. Endo, T. *et al.* BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood* 109, 703–710 (2007).
178. Granziero, L. *et al.* CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5+ B lymphocytes. *Blood* 101, 1962–1969 (2003).
179. Fletcher, A. L., Acton, S. E. & Knoblich, K. Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 350–361 (2015).
180. Fletcher, A. L. *et al.* Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells. *Front. Immunol.* 2, 35 (2011).
181. Malhotra, D. *et al.* Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat. Immunol.* 13, 499–510 (2012).
182. Bajénoff, M. *et al.* Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity* 25, 989–1001 (2006).
183. Katakai, T., Hara, T., Sugai, M., Gonda, H. & Shimizu, A. Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J. Exp. Med.* 200, 783–795 (2004).
184. Lukacs-Kornek, V. *et al.* Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. *Nat. Immunol.* 12, 1096–1104 (2011).
185. Siegert, S. & Luther, S. Positive and negative regulation of T cell responses by fibroblastic reticular cells within paracortical regions of lymph nodes. *Front. Immunol.* 3, (2012).
186. Adamo, A. *et al.* HS-5 and HS-27A Stromal Cell Lines to Study Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Support to Cancer Development. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 584232 (2020).
187. Roecklein, B. A. & Torok-Storb, B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood* 85, 997–1005 (1995).
188. Bernard, S. *et al.* Activity of ibrutinib in mantle cell lymphoma patients with central nervous system relapse. *Blood* 126, 1695–1698 (2015).
189. Lazarian, G. *et al.* Stabilization of β-catenin upon B-cell receptor signaling promotes NF-kB target genes transcription in mantle cell lymphoma. *Oncogene* 39, 2934–2947 (2020).
190. Zaaboub, R. *et al.* Nurselike cells sequester B cells in disorganized lymph nodes in chronic lymphocytic leukemia via alternative production of CCL21. *Blood Adv.* 6, 4691–4704 (2022).
191. Colpo, G. D. *et al.* Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative and psychiatric disorders. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 87, 1435–1449 (2015).
192. Burrello, J. *et al.* Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Immune-Modulation. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 83 (2016).
193. Adamo, A. *et al.* HS-5 and HS-27A Stromal Cell Lines to Study Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Support to Cancer Development. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, (2020).
194. Vandewoestyne, M. L. *et al.* Laser microdissection for the assessment of the clonal relationship between chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma and proliferating B cells within lymph node pseudofollicles. *Leukemia* 25, 883–888 (2011).

195. Amé-Thomas, P. *et al.* Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood* 109, 693–702 (2006).
196. Mueller, S. N. & Germain, R. N. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 618–629 (2009).
197. Riches, J. C. *et al.* T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 121, 1612–1621 (2013).
198. D'Arena, G. *et al.* Circulating regulatory T cells in "clinical" monoclonal B-cell lymphocytosis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 24, 915–923 (2011).
199. Manso, B. A. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia B-cell-derived TNFα impairs bone marrow myelopoiesis. *iScience* 24, (2021).
200. J, V. *et al.* Characterization of human fibroblastic reticular cells as potential immunotherapeutic tools. *Cytotherapy* 19, (2017).
201. Valenta, T., Hausmann, G. & Basler, K. The many faces and functions of β-catenin. *EMBO J.* 31, 2714–2736 (2012).
202. Boudria, R. *et al.* Regulatory interplay between Vav1, Syk and β-catenin occurs in lung cancer cells. *Cell. Signal.* 86, 110079 (2021).
203. Razanadrakoto, L. *et al.* Mutation of Vav1 adaptor region reveals a new oncogenic activation. *Oncotarget* 6, 2524–2537 (2015).
204. Böttcher, M. *et al.* Control of PD-L1 expression in CLL-cells by stromal triggering of the Notch-c-Myc-EZH2 oncogenic signaling axis. *J. Immunother. Cancer* 9, e001889 (2021).
205. Brusa, D. *et al.* The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 98, 953–963 (2013).

Annexe

Oncogene (2020) 39:2934–2947
https://doi.org/10.1038/s41388-020-1183-x

ARTICLE

Stabilization of β-catenin upon B-cell receptor signaling promotes NF-kB target genes transcription in mantle cell lymphoma

Gregory Lazarian[1,2,3] · Chloe Friedrich[1,2] · Anne Quinquenel[1,2] · Julie Tran[1,2] · Souhail Ouriemmi[1,2] · Elisabetta Dondi[1,2] · Antoine Martin[1,2,4] · Imane Mihoub[1,2] · David Chiron[5] · Céline Bellanger[5] · Carole Fleury[1,2,3] · Pascal Gélébart[6] · Emmet McCormack[6] · Dominique Ledoux[1,2] · Catherine Thieblemont[7] · Jacek Marzec[8] · John G. Gribben[9] · Florence Cymbalista[1,2,3] · Nadine Varin-Blank[1,2] · Laura Gardano[1,2] · Fanny Baran-Marszak[1,2,3]

Received: 17 June 2019 / Revised: 14 January 2020 / Accepted: 23 January 2020 / Published online: 7 February 2020
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2020

Abstract

B-cell receptor (BCR) signaling pathways and interactions with the tumor microenvironment account for mantle cell lymphoma (MCL) cells survival in lymphoid organs. In several MCL cases, the WNT/β-catenin canonical pathway is activated and β–catenin accumulates into the nucleus. As both BCR and β-catenin are important mediators of cell survival and interaction with the microenvironment, we investigated the crosstalk between BCR and WNT/β-catenin signaling and analyzed their impact on cellular homeostasis as well as their targeting by specific inhibitors. β-catenin was detected in all leukemic MCL samples and its level of expression rapidly increased upon BCR stimulation. This stabilization was hampered by the BCR-pathway inhibitor Ibrutinib, supporting β-catenin as an effector of the BCR signaling. In parallel, MCL cells as compared with normal B cells expressed elevated levels of WNT16, a NF-κB target gene. Its expression increased further upon BCR stimulation to participate to the stabilization of β-catenin. Upon BCR stimulation, β-catenin translocated into the nucleus but did not induce a Wnt-like transcriptional response, i.e., TCF/LEF dependent. β-catenin rather participated to the regulation of NF-κB transcriptional targets, such as IL6, IL8, and IL1. Oligo pull down and chromatin immunoprecipitation experiments demonstrated that β-catenin is part of a protein complex that binds the NF-κB DNA consensus sequence, strengthening the idea of an association between the two proteins. An inhibitor targeting β-catenin transcriptional interactions hindered both NF-κB DNA recruitment and induced primary MCL cells apoptosis. Thus, β-catenin likely represents another player through which BCR signaling impacts on MCL cell survival.

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a B-cell non-Hodgkin lymphoma that remains incurable despite advances in chemotherapy. MCL is described as a very heterogeneous disease: some patients show accumulation of tumor B cells in primary and secondary lymphoid organs while others present with a more indolent nonnodal disease associated with a leukemic phase [1, 2]. The t(11;14)(q13;32) translocation is observed in a majority of MCL cases and leads to cyclin D1 overexpression [3]. However, dysregulation of cyclin D1 is not sufficient to promote the disease and other genetic events are required for MCL development [4, 5]. For a long time MCL has been considered as a naïve B-cells neoplasm but a large study including more than 800 cases reconsidered this notion [6]. Notably, the presence of somatic hypermutation in immunoglobulin heavy chain genes (*IGHV*), of a biased *IGHV* repertoire and of stereotyped CDR3 sequences indicates an antigenic-mediated ontogenesis for several MCL cases. Hypermutated *IGHV* genes are preferentially found in indolent cases [2, 7]. The heterogeneity of both clinical outcome and biological

These authors contributed equally: Gregory Lazarian, Chloe Friedrich

These authors jointly supervised this work: Laura Gardano, Fanny Baran-Marszak

Supplementary information The online version of this article (https://doi.org/10.1038/s41388-020-1183-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Nadine Varin-Blank
nadine.varin@inserm.fr

✉ Fanny Baran-Marszak
fanny.baran-marszak@aphp.fr

Extended author information available on the last page of the article

parameters among MCLs suggest the implication of a number of signaling pathways in lymphoma evolution.

Gene expression profiling of MCL compared with normal naïve B cells revealed that effectors of the PI3K-AKT and of the WNT signaling pathways were overexpressed in MCL cells [8, 9]. In addition, about half of MCL tumors displayed accumulation of nuclear β-catenin suggesting its transcriptional activation [10]. However, the mechanisms underlying β-catenin nuclear accumulation and transcriptional implication remain fragmentary in MCL. The WNT/ Frizzled/ β-catenin pathway is implicated in differentiation, migration, and proliferation process in many cell types and is altered in a number of carcinoma [11]. At the membrane, β-catenin interacts with cadherins and α-catenin. In absence of WNT-mediated activation, the cytosolic pool of β-catenin is maintained at low levels through a proteasome degradative process via a APC/Axin/ GSK-3β complex [12]. WNT refers to a family of secreted glycoproteins that generate canonical signaling upon binding to members of the Frizzled family of receptors. Binding of WNT proteins to their cognate receptors leads to the inhibition of the degradation process resulting in β-catenin stabilization. According to this canonical mechanism, the stability of β-catenin is largely dependent on its phosphorylation status. GSK-3β phosphorylates β-catenin at sites important for degradation, while WNT signaling inhibits GSK-3β kinase activity, which results in β-catenin stabilization (reviewed in [13]). GSK-3β kinase activity is also inhibited by signals emanating from PI3K/AKT or PKC (α, β, γ) [14–16] leading to cell survival and proliferation. Stabilized β-catenin partly translocates into the nucleus where it interacts with the TCF/LEF family of transcription factors inducing expression of target genes among which *Axin2*, *MYC*, and *cyclin D1* [17–20], (http://web.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html).

We previously showed that B-cell antigen receptor (BCR) dependent pathways are key regulators of MCL cells survival in peripheral blood [21]. Downstream effectors include transcription factors such as NF-κB that controls expression of several antiapoptotic factors and pro-survival cytokines, i.e., IL-6, IL8, or IL1 β [22]. BCR-mediated signals also activate PI3K and AKT leading to GSK3 inhibitory phosphorylation (reviewed in [23]). In the murine B-cell lymphoma WEHI-231, BCR triggering initiated a PI3K/AKT/GSK-3β signaling pathway stabilizing β-catenin [16]. Both BCR- and PI3K- pathways are constitutively activated in MCL and contribute to GSK-3β inhibition and β-catenin stabilization [7, 8, 24].

In this study we investigated the mechanisms underlying β-catenin stabilization in MCL cells upon BCR stimulation. We identified β-catenin as a downstream effector of the BCR signaling, which is rapidly stabilized upon BCR triggering and translocates into the nucleus. Interrupting this pathway by therapeutic compounds, such as the BTK inhibitor Ibrutinib, hampered the stabilization of β-catenin. Long-term BCR stimulation resulted in the production of WNT16 ligand that further contributed to β-catenin stabilization. Into the nucleus, β-catenin transcriptional activity was not directed toward canonical WNT regulated genes, but rather triggered NF-κB targets. The inhibition of β-catenin interaction with its transcriptional partners impacted cell survival.

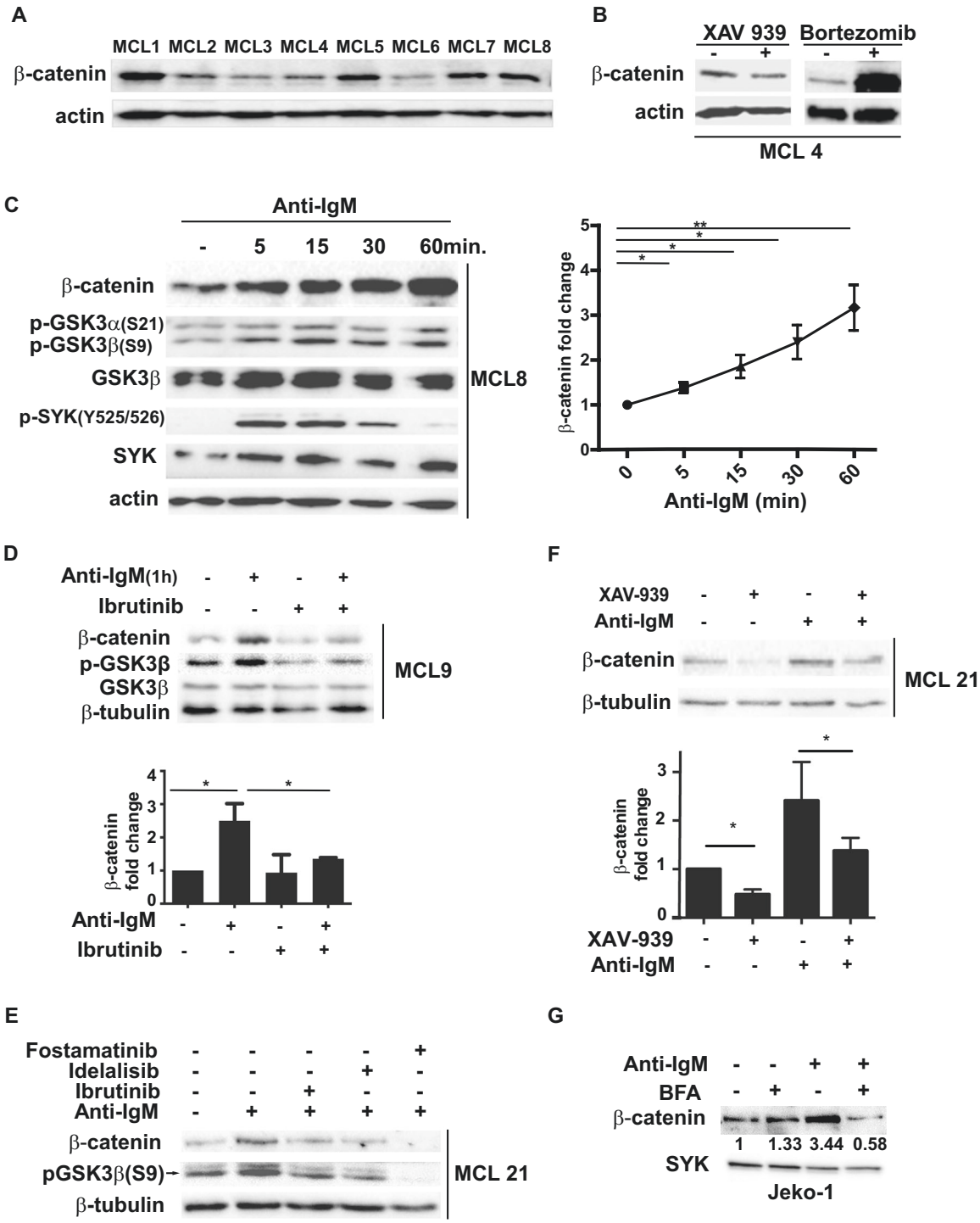
Results

BCR stimulation stabilizes β-catenin in MCL cells

It has been previously shown in MCL cell lines and in paraffin-embedded MCL tumors a stabilization and a nuclear accumulation of β-catenin [10]. Nevertheless, the dynamics of the translocation and the nuclear function of β-catenin remained unclear in MCL cells.

We first investigated the expression of β-catenin in peripheral blood MCL lymphocytes (Fig. 1a). Despite variability in the level of expression, β-catenin was detected in MCL cells of all patients tested. Since the steady state level of β-catenin depends on the activity of the destruction complex [12] we treated MCL primary cells with the compound XAV-939 that stabilizes Axin and favors the activity of the degradation complex. In such conditions, we observed a decrease of β-catenin in primary cells (Fig. 1b). On the contrary, treatment with a proteasome inhibitor, bortezomib (PS-341, Velcade) induced a strong increase of β-catenin levels in both primary cells and MCL cell lines (Fig. 1b, Supplementary Fig. 1a), indicating that the degradation complex and the proteasome participate in the regulation of the steady state levels of β-catenin in MCL cells.

BCR engagement was also described to induce the accumulation of β-catenin via a PI3K/AKT/GSK-3β pathway [25]. We sought to verify in MCL cells whether BCR stimulation, in addition to the chronic BCR-mediated activation, could further increase the level of β-catenin. BCR triggering, which induced Y525/526 phosphorylation of the SYK kinase, increased β-catenin level within 5 min suggesting a rapid inhibition of its degradation. The increase of β-catenin was sustained over 60 min of anti-IgM exposure (Fig. 1c left and right panels). β-catenin accumulation upon BCR stimulation was also observed in Maver and Granta-519 MCL cell lines (Supplementary Fig. 1b and c). In parallel, the phosphorylated form of GSK-3β (pS9) increased upon 5 min of BCR stimulation and remained phosphorylated after this time point, indicating the kinase inhibition in an AKT dependent manner (Fig. 1c left and Supplementary Fig. 1d). The increase of p-S9 GSK-3β upon BCR stimulation indicated that the stabilization of β-catenin



occurs as a result of the inhibition of its phosphorylation. Pretreatment with the BTK inhibitor, Ibrutinib, hampered BCR-induced phosphorylation of GSK3β and β-catenin stabilization (Fig. 1d top and bottom panels). We reproduced the Ibrutinib dependent decrease of β-catenin even when we treated primary MCL cells with a clinically relevant concentration of this BTK inhibitor (100 nM) prior to BCR stimulation (Fig. 1e and Supplementary Fig. 1e). Since BCR stimulation activates PI3K, which is responsible of BTK anchoring to the cell membrane and SYK, which phosphorylates BTK, we inhibited these kinases either by Idelalisib or Fostamatinib respectively, to assess their role in β-catenin stabilization. Both inhibitors impacted negatively on β-catenin level, implying that SYK and PI3K are involved in β-catenin stabilization upon BCR stimulation (Fig. 1e). These findings confirmed that β-catenin

◀ **Fig. 1 BCR-mediated stabilization of β-catenin in primary MCL cells. a** Western blot analysis of PBMCs cell extracts from eight MCL patients to detect β-catenin. Actin was also detected and used as loading control. **b** PBMCs were treated (+) or not (−) with XAV-939 (20 μM, 4 h) or Bortezomib (10 nM, 2 h) ($n = 2$) and the level of β-catenin was analyzed. Actin was used to verify equal loading of the protein extracts. **c** PBMCs were stimulated with 10 μg/ml F(ab)'2 anti-IgM antibody for the indicated times. Total protein extracts were analyzed with the indicated antibodies (Left panel). Membranes were reprobed with anti-GSK-3β (total), anti-SYK (total), and anti-actin antibodies. β-catenin levels at each time point were quantified by densitometry relative to Actin levels and to unstimulated cells. The mean ± SEM is indicated ($n = 6$ MCL cell extracts, Right panel). **d** PBMCs were pretreated or not with Ibrutinib (7 μM, 90 min) prior to BCR stimulation (+) or not (−) with 10 μg/ml F(ab)'2 anti-IgM Ab. Western blot analysis (upper panel) and densitometric quantification of β-catenin (lower panel) were similar to (**c**) ($n = 3$). **e** Primary PBMC from MCL patients were pretreated or not with Ibrutinib (100 nM), Idelalisib (1 μM), or Fostamatinib (2 μM) for 1 h prior to stimulation with 10 μg/ml F(ab)'2 anti-IgM Ab for 1 h. β-catenin was detected with a specific antibody and β-tubulin was used as loading control. The image is representative of three independent experiments. **f** Primary PBMC from MCL patients were treated or not with XAV-939 (20 μM) prior to stimulation with 10 μg/ml F(ab)'2 anti-IgM Ab for 24 h. β-catenin was detected as in the previous panels, β-catenin levels at each condition were quantified by densitometry of β-catenin relative to β–tubulin level (Lower panel) ($n = 3$). **g** Jeko-1 cells were stimulated (+) or not (−) for 6 h with F(ab)'2 anti-IgM (10 μg/ml) and, where indicated, Brefeldin A (10 μg/ml) was added for the last 4 h of stimulation. Total cell extracts were analyzed for β-catenin expression. Quantitation is relative to unstimulated and untreated cells. Significance was determined by Student's *t* test: $*p < 0.05$; $**p < 0.01$.

stabilization depends on BCR stimulation. Interestingly, while pY525 SYK decreased after 30 min of stimulation (Fig. 1c and [22]), the elevated level of β-catenin persisted beyond this time. Even after 24 h we found that β-catenin remains consistently higher than in nonstimulated conditions, albeit the difference did not reach statistical significance. XAV-939 treatment decreased significantly β-catenin both in unstimulated and stimulated cells for 24 h (Fig. 1f up and down) and Supplementary Fig. 1g). Importantly, XAV-939 treatment did not affect cell survival nor it altered the BCR-dependent apoptosis inhibition as verified by Annexin V labeling followed by flow cytometry (Supplementary Fig. 1f). When Brefeldin A was added to block all cell secretions in MCL cell lines, the long-term stabilization of β-catenin was no longer observed (Fig. 1g and Supplementary Fig. 1h). This observation indicates that a soluble factor present in the medium upon BCR stimulation might contribute to the stabilization of β-catenin in long-term BCR stimulation.

β-catenin translocates to the nucleus upon BCR engagement

Following the canonical WNT signaling pathway, the stabilization of β-catenin triggers its nuclear translocation and the interaction with the TCF/LEF family of transcription factors. Therefore, we investigated whether the BCR-mediated stabilization of β-catenin modifies its subcellular localization. Primary MCL cells, Maver and Granta-519 cell line, were stimulated for 1 h with anti-IgM antibody and cells were subjected to cell fractionation. β-catenin was detected in both cytosolic and nuclear fractions and BCR stimulation resulted in β-catenin stabilization in both fractions (Fig. 2a and Supplementary Fig. 2a). Using confocal microscopy, we confirmed a nuclear accumulation of β-catenin upon BCR stimulation. While staining of β-catenin was essentially cytoplasmic in unstimulated cells, BCR stimulation triggered β-catenin translocation into the nucleus (Fig. 2b). The nuclear localization of β-catenin prompted us to inquire its transcriptional activity. In the majority of cell types, in the WNT-canonical pathway β-catenin interacts with the TCF/LEF family of transcription factor to induce the transcription of *Axin2, CCND1, MYC*, and *LEF1* among others. Stimulation of MCL primary cells with anti-IgM for 4 h did not induce the transcription of the WNT-dependent target genes *Axin2* and *LEF1* but induced *MYC*, a well-known BCR downstream target [26], and repressed *CCND1/cyclin D1* expression (Fig. 2c). Noteworthy, the transcriptional effect was confirmed at the protein level for MYC but not for Cyclin D1 that remained unchanged after stimulation (Supplementary Fig. 2B). These results show that BCR-dependent stabilization of β-catenin does not elicit a WNT-like, TCF-dependent transcriptional activity in MCL cells.

WNT16 is overexpressed in MCL and participates in β-catenin stabilization

Since high level of β-catenin persisted over a long-term BCR stimulation even after the dephosphorylation and inactivation of the BCR effectors prompted us to search for a secreted factor that could stabilize β-catenin in an autocrine fashion. As the canonical WNT-mediated pathway is best known to stabilize β-catenin, we undertook a transcriptomic approach to assess the WNT ligands that are transcribed by MCL cells in the presence and absence of BCR stimulation for 3 h. We evidenced in MCL cells the expression of several members of the WNT family, among them the higher expression level was observed for WNT10A, WNT16, and WNT3 and their cognate receptors of the Frizzled family (Supplementary Table 2 and Fig. 3a). Interestingly, only WNT16 was significantly induced upon 3 h of BCR stimulation (Fig. 3a). RT-qPCR evaluation confirmed the expression of high amount of WNT16 mRNA in a number of primary MCL cells as compared with the physiological counterpart of CD5+ B cells from normal umbilical cord used as control (NCB) (Fig. 3b). Western blot analysis showed a BCR-dependent increase of WNT16

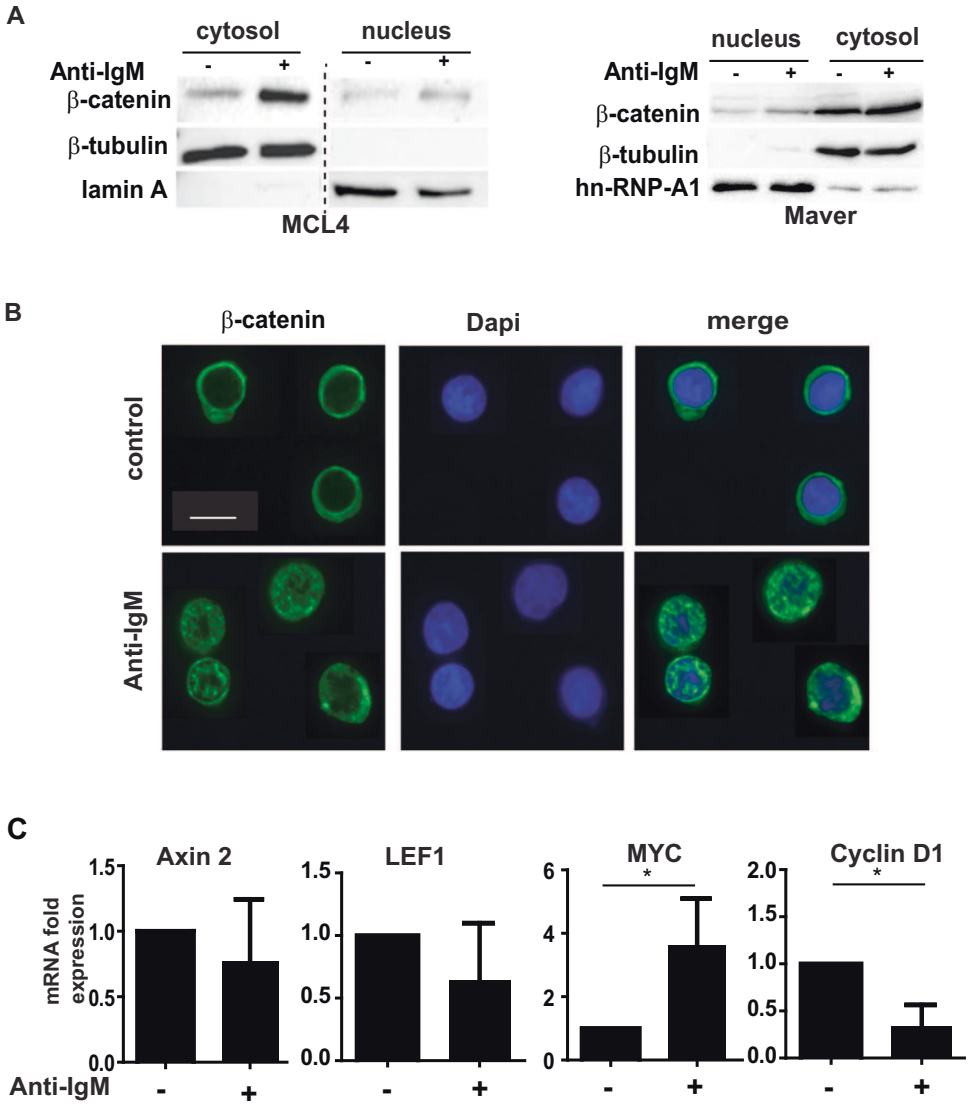
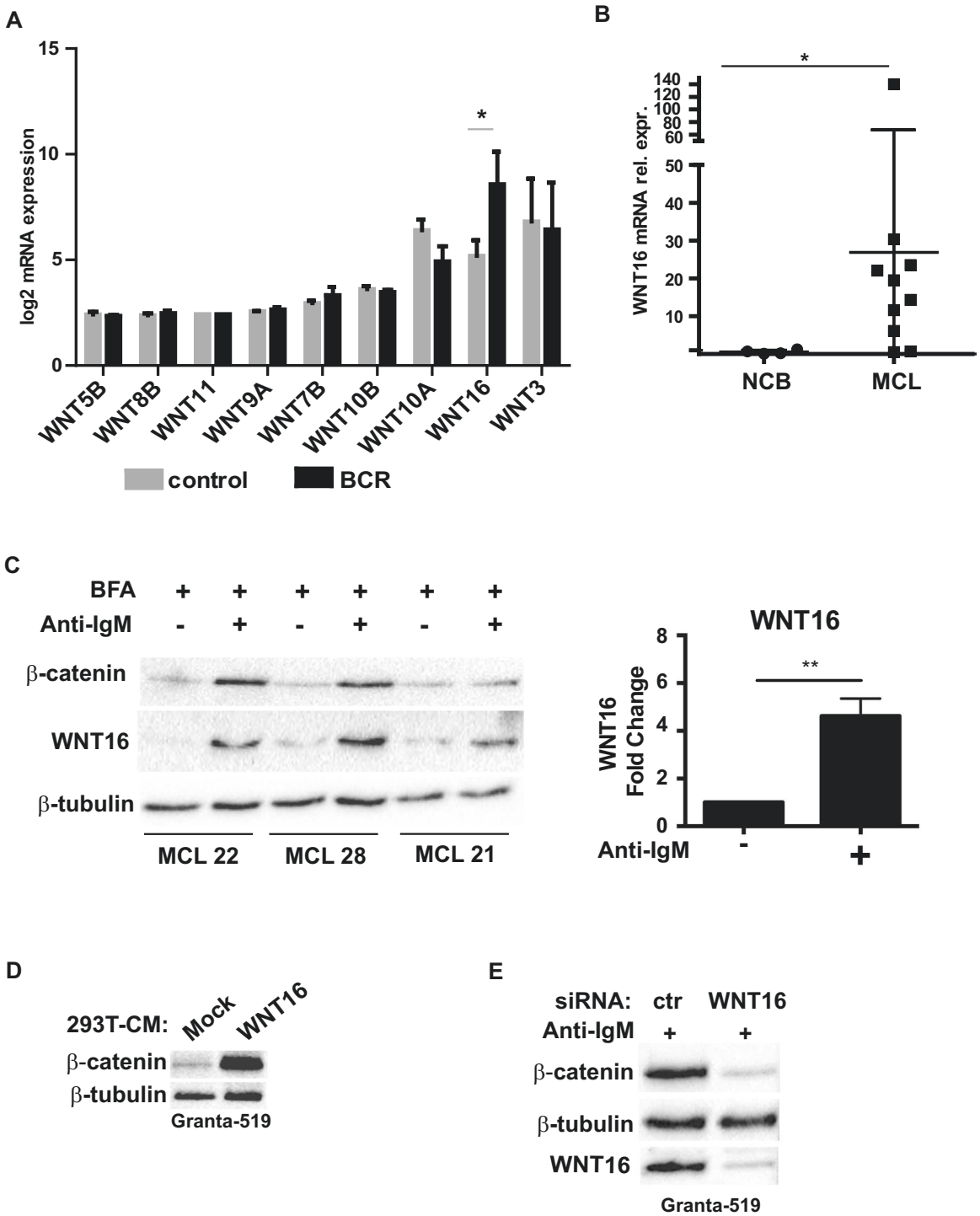


Fig. 2 BCR engagement induces β-catenin stabilization and nuclear translocation. a Cell fractionation. Primary PBMCs (MCL4) and Maver cell line were stimulated (+) or not (−) with 10 µg/mL of soluble F(ab)'2 anti-IgM for 1 h. Cytosolic and nuclear fractions were prepared and analyzed by immunoblotting with the indicated Abs. β-tubulin and Lamin A were used to verify the purity of the cytoplasmic and nuclear fractions respectively. The figure is derived from the same gel and the dotted line represents the omitted lanes. The image is representative of two independent experiments. **b** Immunofluorescence. Primary PBMCs (MCL9) were stimulated (F(ab)'2 anti-IgM, 1 h, 10 µg/mL) or not (control). Confocal microscopy was performed using Alexa-488 coupled anti-β-catenin and Dapi to label nuclei. A minimum of 20 cells were analyzed. The scale bar corresponds to 10 µm. **c** RT-qPCR to assess the transcriptional activity of β-catenin. PBMCs from MCL patients were stimulated (+) or not (−) with soluble F(ab)'2 anti-IgM antibody (10 µg/ml, 4 h). Total RNAs were extracted and the indicated TCF/LEF target genes were analyzed. Data represent fold differences to unstimulated samples (mean ± SEM of 2^{-ddCT}, $n = 6$). The housekeeping genes used were *ABL1* or *HPRT1*. Significance was determined by Student's *t* test: $*p < 0.05$.

in primary MCL cells treated with Brefeldin A to block cellular secretion (Fig. 3c left and right and Supplementary Fig. 2D). We hypothesized that WNT16 secretion is one of the factor that can contribute to the high level of β-catenin in MCL cells upon BCR stimulation. To confirm that WNT16 is able to elicit an increase of β-catenin, we transfected HEK293T cells with a WNT16-expressing plasmid or a control plasmid. The overexpression of WNT16 in HEK293T cells increased β-catenin level confirming that this ligand is secreted by the transfected cells (Supplementary Fig. 2E). Next, we used the conditioned media issued from these cells to stimulate Granta-519 cells. The treatment of Granta-519 cells for 6 h with the WNT16 enriched medium strongly increased β-catenin levels as compared with the control medium (Fig. 3d). To confirm the dependence of β-catenin stabilization on WNT16 secretion upon BCR stimulation, we transfected Granta-519 cells with a pool of three specific RNA



sequences that target WNT16 mRNA. A control siRNA sequence was used to exclude off-target effects. Along with the knock down of WNT16, the decrease of β-catenin was also observed by western blot arguing for the role of WNT16 on the regulation of β-catenin stability following BCR stimulation (Fig. 3e).

All these results confirmed that WNT16 is highly expressed in MCL cells. Its expression is further induced upon BCR signaling and can contribute to β-catenin stabilization in an autocrine fashion.

β-catenin participates in the transcription of NF-kB regulated genes

The absence of WNT-like transcriptional activity of β–catenin in in MCL cells prompted us to determine

◀ **Fig. 3 MCL cells express WNT16 ligands that contribute to β-catenin stabilization. a** Transcriptomic analysis of primary MCL cells stimulated (BCR) or not (control) with anti-IgM at 10 μg/mL for 4 h. Data show the mean of four different MCL primary cells samples and error bars represent SEM. Statistical analysis was performed with paired sample Student's *t* test: $*p < 0.05$. **b** RT-qPCR to detect WNT16 transcript in MCL cells and in B cells from normal umbilical cord (NCB). **c** Left, primary MCL cells ($n = 3$) were stimulated (+) or not (−) with F(ab)'2 anti-IgM (10 μg/mL) for 16 h and treated with Brefeldin A (10 μg/mL) for the last 4 h. Total cell extracts were analyzed by western-blotting with mouse anti-WNT16 Ab and anti-β-catenin. Tubulin was used as loading control and normalizing factor in the densitometric analysis (Right panel). Quantitation is relative to unstimulated cells. Significance was determined by Student's *t* test: $**p < 0.01$. **d** Granta-519 cells were incubated for 6 h with the conditioned medium issued from HEK293T cells transfected with the empty- or WNT16-expressing plasmid analyzed in (Supplementary Fig. 2E). Expression of β-catenin and WNT16 in Granta-519 was detected by immunoblotting with the indicated Abs. **e** Granta-519 cells were transfected with a pool of siRNA sequences to knock down WNT16 expression or a nontargeting siRNA sequence used as a control. Expression of WNT16 and β-catenin expression were verified by western blot as previously described. β-tubulin was used as loading control.

whether β–catenin participates in NF-κB-mediated transcription of the different cytokines and factors as described in diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) [27]. We previously showed that BCR signaling induces NF-κB-dependent expression of proliferative and inflammatory cytokines, e.g., IL-6, IL-8, and IL-1β [22]. Indeed, mRNA expression of *IL-6* and *IL-1*β decreased upon treatment with XAV-939 that induces β-catenin degradation (Fig. 4a). The transcription of IL-8 shows a tendency to decrease with XAV-939 although it is not statistically significant in the cohort of patients used to perform this analysis (Fig. 4a). In agreement with the transcriptional control of *IL-6* expression, treatment of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from MCL patients with XAV-939 hindered the stimulation-dependent increase of the protein in leukemic cells as observed by flow cytometry (Fig. 4b, c). To further confirm the role of β-catenin in *IL-6* induction, we transfected Jeko-1 cells with a plasmid carrying the coding sequence of *CTNNB1* and confirmed its overexpression by RT-qPCR (Supplementary Fig. 2C). β-catenin overexpression significantly induced *IL-6* transcription (Fig. 4d). As *WNT16* is a NF-κB target gene, we inquired whether β-catenin is involved in its transcriptional regulation in primary MCL cells. By RT-qPCR we observe that XAV-939 treatment decreases WNT16 expression both in presence and absence of BCR stimulation for 4 h (Fig. 4e).

Following BCR engagement, WNT16 maintains the high level of β-catenin. To investigate the transcriptional outcome of WNT16 dependent stabilization of β-catenin, we performed a RT-qPCR in primary cells stimulated for 6 h by conditioned medium containing WNT16 and we observed the induction of *IL-6* and *IL1*β transcription. Interestingly, in these conditions β-catenin still does not participate to a TCF-dependent transcription as *Axin2* mRNA remains unchanged upon WNT16 stimulation (Fig. 4f).

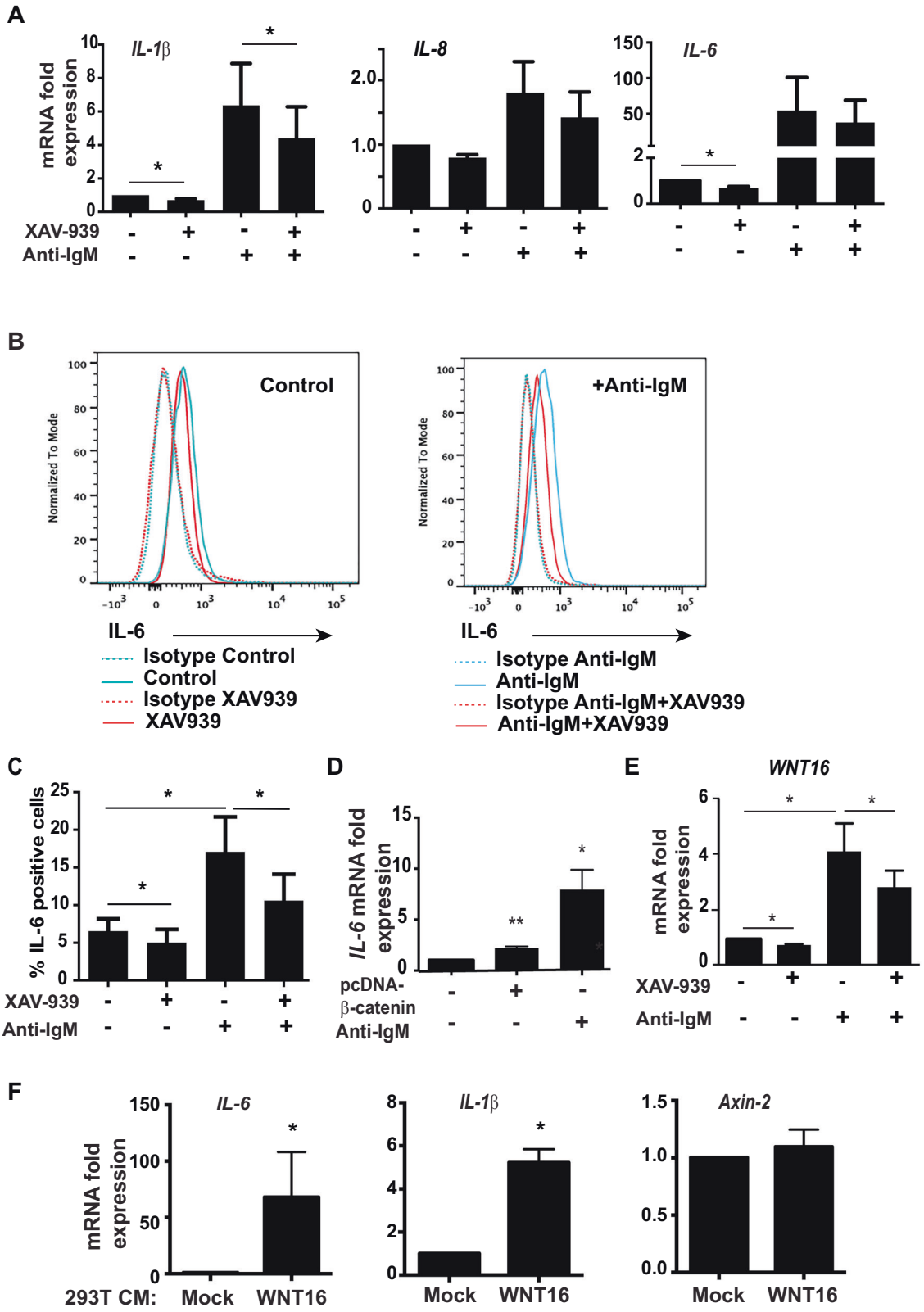
Overall these results show that β-catenin participates in the regulation of NF-κB target genes such as *IL-6*, known to increase the survival of MCL cells and *WNT16* which is involved in the β-catenin stabilization in these cells.

β-catenin is present at promoter sequences specific for NF-κB

To verify whether BCR stimulation modulates β-catenin presence on NF-κB DNA binding sequence, we undertook an oligo pull-down approach with a biotinylated NF-κB consensus DNA sequence [28] using nuclear extracts of cells that have been stimulated with a soluble F(ab)'2 anti-IgM antibody. p65 NF-κB and β-catenin were detected in the oligonucleotide precipitate in Granta-519 without BCR stimulation, in agreement with the constitutive BCR activation in these cells. Both proteins were present in larger amounts in both the nuclear cell extract and the precipitate after BCR stimulation (Fig. 5a). The specificity of the interaction between the proteins and the DNA was confirmed using the identical non-biotinylated oligonucleotide in a competitive experiment. When an excess of the competitor oligonucleotide was incubated with the nuclear extract neither NF-κB nor β-catenin were detected in the precipitate. Importantly, while the interaction of NF-κB with the biotinylated oligonucleotide was confirmed in primary MCL cells, β-catenin was only detected in the precipitate upon BCR stimulation (Fig. 5a).

To assess that β-catenin is present at the NF-κB binding region present on *IL-6* promoter [29], we performed chromatin immunoprecipitation with a specific β-catenin antibody and rabbit IgG as a negative control in cells previously stimulated with a soluble anti-IgM for 1 h. The precipitate with the β-catenin antibody contained significantly higher amount of DNA containing the NF-κB binding region as compared with the IgG control (Fig. 5b). To verify the specific binding to the promoter region, the immunoprecipitates by the β–catenin antibody were subjected to another PCR using either a primer pair to amplify a region in the ORF or in the 3′-UTR of the *IL-6* gene. For both primers pairs, the enrichment over the IgG control was lower than for the promoter region containing the NF-κB binding sequence (Supplementary Fig. 3A).

To assess whether in MCL cells β-catenin and NF-κB p65 can interact, we undertook a co-immunoprecipitation approach in Maver cell line stimulated with a soluble anti-IgM for 1 h. In the immunoprecipitate with an antibody anti-NF-κB p65 we detected β-catenin by immunoblot indicating that the two proteins belong to the same molecular complex to regulate gene expression (Fig. 5c).


A
IL-1β
IL-8
IL-6
mRNA fold expression
XAV-939
Anti-IgM
B
Control
+Anti-IgM
Normalized To Mode
IL-6
Isotype Control
Control
Isotype XAV939
XAV939
Isotype Anti-IgM
Anti-IgM
Isotype Anti-IgM+XAV939
Anti-IgM+XAV939
C
% IL-6 positive cells
D
IL-6 mRNA fold expression
pcDNA-β-catenin
Anti-IgM
E
WNT16
mRNA fold expression
F
IL-6
IL-1β
Axin-2
293T CM:
Mock
WNT16

◀ **Fig. 4 β-catenin is involved in non-TCF-dependent transcription. a** PBMCs from MCL patients were treated (+) or not (−) with XAV-939 (20 μM) for 4 h, total RNA was extracted and modulation of *IL8, IL1*β, and *IL6* was analyzed by RT-qPCR relative to nontreated cells. Data represent mean ± SEM of 2^{-ddCT}, normalized to the mRNA of the housekeeping genes *HPRT1* or *ABL*. Significance was determined by Wilcoxon-signed rank test $*p < 0.05$ ($n = 6$ for IL-6 and IL-8 $n = 5$ for IL-1β). **b** PBMCs from 6 MCL patients were treated (+) or not (−) with XAV-939 (20 μM) for 90 min prior to BCR stimulation or not for 15 h with soluble F(ab)'2 anti-IgM (10 μg/ml). Intracellular IL-6 was detected by flow cytometry. CD19 and CD5 were used to discriminate MCL cells. Gating of IL-6 positive cells was placed according to the control isotype. The figure shows a representative result (MCL9) of a flow cytometry histogram of control untreated cells (left) and stimulated anti-IgM cells (right). **c** The percentage of IL-6 positive cells among the $CD19^+$ cells is presented (mean ± SEM, $n = 6$ MCL patients). Significance was determined by the Wilcoxon-signed rank test, $*p < 0.05$. **d** Jeko-1 cells were transfected with a β-catenin expressing plasmid for 24 h, total RNA was extracted and RT-qPCR of *IL-6* was analyzed. As controls *IL-6* expression was evaluated in cells transfected with a control plasmid and in cells stimulated with soluble F(ab)'2 anti-IgM (10 μg/ml) for 4 h. **e** PBMCs from MCL patients were treated (+) or not (−) with XAV-939 (20 μM) for 4 h, total RNA was extracted and modulation of *WNT16* expression was analyzed by RT-qPCR relative to nontreated cells. **f** PBMC from MCL patients were incubated for 4 h with a conditioned medium issued from HEK293T transfected with an empty plasmid or a plasmid carrying WNT16 gene. RT-qPCR on *IL-6, IL-1*β, and *Axin2* transcripts was performed. For all the RT-qPCRs the data represent mean ± SEM of 2^{-ddCT}, normalized to the mRNA of the housekeeping genes *HPRT1*. Significance was determined by the Wilcoxon-signed rank test $*p < 0.05$ $**p < 0.01$ ($n = 6$).

Inhibition of β–catenin-mediated transcription induces apoptosis and inhibition of tumor growth in vivo

Finally, since both BCR stimulation and NF-κB regulated genes contribute to MCL cell survival we investigated whether inhibitors that proved efficacy in the disruption of the TCF-β-catenin complex might also impact β-catenin/NF-κB cooperation. PKF118-310 inhibitor alters the interaction between β-catenin and TCF7L2 to inhibit TCF-dependent transcriptional activity [30] but, its impact on the interaction of β-catenin with other partners has not been investigated. In Granta-519 cells PKF118-310 treatment did not impact the complex observed on NF-κB consensus oligonucleotide in basal conditions but hindered the higher recruitment of both β-catenin and NF-κB upon BCR stimulation (Fig. 5d). We also analyzed the impact of this inhibitor on the BCR-dependent survival response of MCL cells. First, analyzing the apoptotic response to various doses of the inhibitor, a minimal cytotoxicity was observed in healthy control cells up to 1 μM of PKF 118-310 for 24 h while tumor primary cells were already sensitive to 500 nM treatment (Supplementary Fig. 3B). This dose was used to measure the apoptotic rate in a series of primary MCL cells. As shown in Fig. 5e, PKF118-310 treatment increased apoptosis in unstimulated cells and blocked the survival response induced by BCR stimulation. Furthermore, PKF118-310 also affected MCL tumor growth in vivo. JeKo-1 cells were injected subcutaneously in NOD/SCID IL2γnull (NSG) mice. Tumor growth was monitored every other day upon intratumoral injection after 4 days of either vehicle (PBS, 0,1% DMSO; $n = 3$) or PKF118-310 (0.4 mg/kg in vehicle solution, $n = 3$) solution. PKF118-310 treatment greatly inhibited tumor growth already after 4 days of treatment (day 8) while body weight remained constant under such conditions (Fig. 5f and Supplementary Fig. 3C and 3D). These results indicate that inhibition of β-catenin-mediated transcriptional activity impacts MCL cell survival.

Discussion

β-catenin is involved in a number of human solid tumors [11] and B-cell malignancies [31, 32]. An earlier study described a nuclear accumulation of β-catenin in a number of tumor biopsies [10]. The present analysis demonstrates, in circulating primary MCL lymphocytes, that β-catenin also behaves as an effector of the BCR signaling pathway. Upon antigenic stimulation β-catenin is rapidly stabilized and partly localized into the nucleus. The BCR-dependent stabilization of β-catenin involves downstream effectors such as the BTK kinase and the phosphorylation of GSK3β at the S9 inhibitory residue. Indeed, the inhibition of BTK by Ibrutinib leads to a reduction of S9-phosphorylated GSK3β which results in a decrease of β-catenin. Inhibition of both PI3Kδ by Idelalisib and SYK by R406 also decrease the phosphorylated form of GSK3β leading to a decrease of β-catenin. These results are in agreement with a current model whereby BCR stimulation activated PI3K and SYK for the recruitment and phosphorylation of BTK, respectively [33]. Activated BTK kinase phosphorylates AKT, which in turn leads to the phosphorylation of GSK3β at the S9 inhibitory residue [16, 34]. A synergistic effect of Idelalisib and Ibrutinib was reported on the adhesive ability of CLL and MCL cells to the microenvironment cells [35]. Since membrane β-catenin is able to stabilize cell adhesion structures in multiple cell types, one can hypothesize that a similar role is possible in MCL cells and that it can be targeted by combination of BCR associated kinases inhibitors. Noteworthy, SYK and BTK activations, as seen by their phosphorylation status, are transient, whereas β-catenin stabilization persists as long as BCR stimulation is applied. This differential timing suggests that BCR-mediated signals initiate a rapid stabilization of β-catenin, while another mechanism might take place to maintain the stability of the protein in the long term. Indeed, our transcriptomic approach showed the production of a number of WNT ligands in MCL cells. Among those, only WNT16

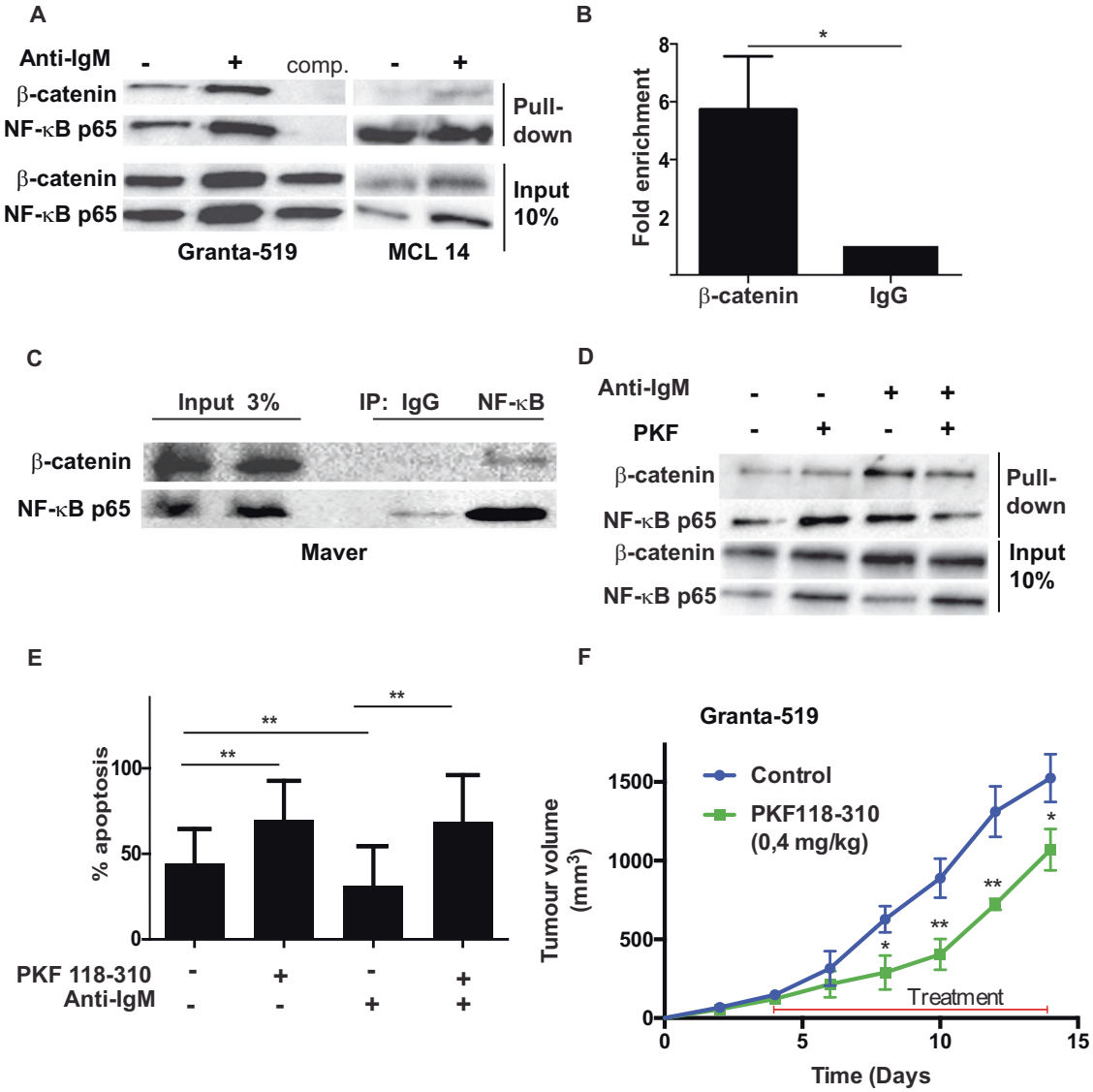


Fig. 5 β-catenin participates to a complex at NF-κB consensus DNA sequence. a Oligo pull-down assay in Granta-519 cell line (Left panel) and primary cells (Right panel). Extracts from unstimulated (−) or anti-IgM stimulated (+) cells were precipitated with a biotinylated oligonucleotide corresponding to NF-κB consensus DNA sequence. Presence of β-catenin and NF-κB (p65) in the precipitate was analyzed with the indicated antibodies. Specificity was verified by the addition of an excess (20×, comp.) of the same non-biotinylated oligonucleotide during the pull-down experiment. 10% of the initial total extracts were also analyzed with the same Abs. The image is representative of a minimum of three independent pull-downs. **b** Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP). Anti-IgM stimulated Granta-519 cell extracts were immunoprecitated with anti-β-catenin specific Ab or rabbit IgG as a negative control. Primers around the NF-κB binding site present on IL-6 promoter (IL-6) were used to amplify to detect the DNA in the immunoprecipitate. The fold enrichment was calculated as ratio of 2^{-dCT} values of the immunoprecipitate with anti-β-catenin and rabbit IgG control. The histogram represents the mean ± SEM of four independent ChIP assays. **c** Maver cells were stimulated with anti-IgM and protein cells lysates were subjected to immunoprecipitation using either isotype anti-IgG or anti-NF-κB antibodies. The immunoprecipitated fractions were analysed by western blot with anti-β-catenin or anti-p65 NF-κB antibodies. **d** Granta-519 cells were treated 90 min (+) or not (−) with PKF 118-310 (5 μM) prior to BCR stimulation (1 h,+) or not (−). An oligo pull-down assay was then realized as in (**a**) with a biotinylated NF-κB DNA consensus sequence in presence of PKF118-310 (5 μM). The image is representative of three independent pull-downs. **e** Apoptosis (% of Annexin V/PI positive cells) was measured by flow cytometry on PBMCs from seven MCL patients treated (+) or not (−) with PKF 118-310 (5 μM) prior to BCR stimulation or not with soluble anti-IgM for 24 h. **f** NSG mice subcutaneously grafted with Jeko-1 cells were treated after 4 days by intratumoral injection of either a vehicle solution (PBS, 0,1% DMSO, control) or PKF118-310 (0,4 mg/kg in vehicle solution) every day. Tumor volumes (mm^3) were measured by a digital calliper every other day. Data represent mean ± SEM ($n = 3$). Significance was determined by Student's t test: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

was upregulated upon BCR triggering. A role for WNT16 has already been described in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment [36, 37]. WNT16 is a NF-κB target gene transcribed by stromal cells in the tumor microenvironment following genotoxic stress and it promotes therapy resistance and cancer progression [36]. Our

results showed that MCL cells produce WNT16 and they can respond to it by stabilizing β-catenin. Thus, WNT16 represents one of the soluble factors that is secreted following BCR stimulation and that can maintain high level of β–catenin in an autocrine/paracrine fashion.

Despite the stabilization and nuclear translocation of β-catenin upon BCR stimulation, similar to the canonical WNT signaling, its transcriptional outcome is different as there is no transcription of TCF/LEF targets genes, such as *Axin2* and *LEF1*. A similar TCF-independent mechanism was described in primary mature T lymphocytes whereby TCR stimulation led to β-catenin accumulation without triggering a TCF-dependent transcriptional activity [38]. In contrast, Christian et al. showed in immature B-cell lines that BCR stimulation induces β-catenin stabilization and the activation of TCF/LEF transcriptional activity [16]. Thus, in line with our results in MCL mature B lymphocytes one can hypothesize that, depending on the state of differentiation of the cells, BCR or WNT signaling direct β-catenin toward a different transcriptional response. We found that *cyclin D1* transcript decreases upon BCR stimulation. Unlikely β-catenin is involved in this event since, in the majority of MCL cases, the level of *cyclin D1* mRNA is largely determined by the t(11;14)(q13;q32) translocation that juxtaposes the gene *CCDN1* to the promoter of IGHV. The decrease of *CCND1* mRNA does not correspond to a change in the protein level arguing for a posttranscriptional regulation of the protein.

Investigating the possible outcome of β-catenin nuclear localization, we observed that treatment with XAV-939, an activator of β-catenin degradation, hampered the transcription of NF-κB target genes essential for MCL cells survival. An interplay between the canonical WNT/β-catenin and NF-κB signaling pathways has been observed in several cell types and cancers with either positive or negative impact of one another depending on the model [39, 40]. We showed that β-catenin is found on NF-κB DNA consensus sequence and interacts with *IL-6* promoter region bound by NF-κB. These observations and the co-immunoprecipitation results strongly argue for β-catenin acting as a co-regulator of NF-κB in MCL cells. In DLBCL, another mature B-cell lymphoma, β-catenin, and NF-κB are also transcription partners [27]. In this mature B-cell lymphoma, where a constitutive activation of NF-κB is observed, β-catenin stabilization did not induce WNT-like transcriptional signature. However, β-catenin was required for the induction of NF-κB regulated genes, such as *IL-10* [27]. All these data point to an association between NF-κB and β-catenin in BCR-mediated regulation of important cytokines and factors modulating cell survival in mature lymphomas. The comparison of gene expression profiles between MCL cells issued of the blood stream or the lymph node underlined a strong NF-κB signature in both compartments for several patients while others presented this signature in the lymph node only [7]. Thus, in the periphery, in absence of microenvironment-secreted survival factors, the crosstalk between NF-κB and β-catenin might provide a BCR-initiated mechanism to WNT16 and IL-6 production. In turn, these factors provide further autocrine/paracrine-mediated β-catenin stabilization and additional survival signals for leukemic cells.

Given this role of β-catenin in mediating the NF-κB-induced survival signals, the specific inhibition of β-catenin in MCL cells might represent a therapeutic strategy. Moreover, β-catenin interacts with a number of transcription factors apart from TCF and NF-κB [41]; so, targeting β-catenin capacity to regulate transcription in specific cell types would be of interest in tumor targeting. Therapeutic agents targeting the WNT/β-catenin pathway are in development and, a number of small molecules and biological agents have entered clinical trials [42] but, taking into account the developmental role of β-catenin, a very specific targeting of the leukemic cells should be addressed. Noteworthy, WNT/β-catenin inhibition was proposed to be particularly effective in eliminating a MCL-initiating cell pool that exhibits stem cells like properties and is responsible for cancer relapse. These cells relied on the WNT signaling pathway for their survival and proliferation [43]. In this work, induction of β-catenin degradation through XAV-939 decreased the expression of survival cytokines, such as IL-6. Whether this degradation induces further apoptosis of MCL cells is difficult to determine in vitro. Moreover, XAV-939 treatment might reduce only partially the level of β-catenin and the residual pool of the protein might still be sufficient for cell survival. Like in other tumor models, administration of PKF118-310 to tumor-grafted mice inhibited the tumor growth in vivo [44].

As a factor that helps maintaining high levels of β-catenin, WNT16 represents another interesting therapeutic target. Its inhibition, directly or through the blockade of its receptor, would reduce β-catenin level and induce apoptosis as it was shown in acute B lymphoblastic leukemia with t(1;19) [45]. Altogether, our results showed that BCR signaling stabilized β-catenin and allowed increased WNT16 production. As further enhancement of β-catenin stabilization might notably rely on autocrine or paracrine WNT16 production, targeting the BCR-dependent production of WNT16 in these cells could be part of a new therapeutic strategy.

Materials and methods

MCL samples and cell lines

PBMCs were obtained from 29 MCL leukemic patients by Ficoll-Hypaque density gradient (Stem Cell Technologies,

Grenoble, France). All lymphocytosis were superior to 3.0 10^9/L (Supplementary Table 1). For patients with low lymphocytosis (<10.10^9/L) B cells were purified by negative selection using RosetteSep kit (Stemcell technologies, Grenoble France). The diagnosis of MCL was ascertained by immunophenotyping, cytogenetic and FISH analysis of t (11;14), and the overexpression of *cyclin D1* was detected by competitive RT-PCR according to the World Health Organization classification. All experiments were performed with PBMC containing as a mean 80% of MCL cells. All patients provided written informed consent, validated by the Ethics Committee from the Avicenne Hospital in accordance with the Declaration of Helsinki. Patients usually received treatment shortly after sampling which made challenging to repeat experiments on samples of the same patient. Granta-519, Jeko-1, Maver, and HEK293T cell lines were purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). HBL2 was kindly provided by Dr B. Sola (Caen University, France).

Cell culture and reagents

Patients' cells were cryopreserved in liquid nitrogen in the presence of 10% dimethyl sulfoxide and 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) at Avicenne Hospital. MCL leukemic cells (3×10^6 cells/mL) and Granta-519, Jeko-1, Maver or HEK293T cells (1×10^6 cells/mL) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin, 10 µg/mL streptomycin (Gibco BRL, ThermoFischer Scientific, Courtaboeuf, France), 1 mM sodium pyruvate (Gibco BRL), MEM vitamins 100× (Gibco BRL), and 5 µg/mL plasmocin (Cayla InvivoGen, Toulouse, France). For BCR stimulation soluble $F(ab')_2$ fragment of donkey antihuman IgM antibody (10 µg/mL; Jackson ImmunoResearch, Interchim, Monluçon, France) were used for the indicated periods of time. Cells were also treated with either Bortezomib (10 nM) (Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France), Ibrutinib (PCI-32765) (100 nM–5 µM), Idelalisib (1 µM) or Fostamatinib (2 µM) (Selleck Chemicals Euromedex, Souffelweyersheim, France), XAV-939 (20 µM) (Selleck Chemicals) or PKF 118-310 (500 nM or 5 µM) (Sigma Aldrich Chimie, Lyon, France).

Animal experiment

Animal experiments were approved by the Norwegian Animal Research Authority and conducted according to The European Convention for the protection of vertebrates used for scientific purposes. Local Ethics Committees (REK number 2012/2245). REK: Regional committees for medical and health research ethics. To determine the efficacy of PKF118-310 in vivo, six NOD/SCID IL2γnull (NSG) female mice (6–10 weeks old) (three per group) were injected subcutaneously in the left flank area with 5×10^6 JeKo-1 cells resuspended in 100 µL of PBS solution containing 12.5 % Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). The health status and weight of the mice were analysed every other day and they were randomized into two groups when tumor volumes reached ~100 mm^3 at 4 days from engraftment. PKF118-310 toxicity was evaluated in an initial maximum tolerated dose (MTD) experiment. The toxicity screen showed that PKF118-310 at 0.4 mg/kg was tolerated. Mice were then either treated with vehicle solution (PBS, 0.1% DMSO) or PKF118-310 (0.4 mg/kg in vehicle solution) every other day. The vehicle solution and PKF118-310 were given intratumorally. Tumor volumes were measured every second day by a digital calliper using the following ellipsoid formula: $\text{Volume} = \pi(\text{length} \times \text{width} \times \text{height})/6$. The experiment ended and the animals were humanely killed when tumors reached the preestablished tumor size endpoint of ~1500 mm^3.

Statistical analysis

Statistical analysis was made using the GraphPad Prism version 5.0. (La Jolla, CA, USA). As stated in the figures legend, Student's unpaired *t* test and Wilcoxon-signed rank test were employed. Data are generally presented as the mean ± SEM and statistics were considered significant with $*p < 0.05$; $**p < 0.01$.

Acknowledgements CF was the recipient of a "Année Recherche" support from APHP. AQ was the recipient of a Jansen fellowship. This project was funded by a "Bonus Qualité Recherche" grant from University Paris 13 and benefited from the financial support of INSERM, University Paris 13 and the Labex INFLAMEX, contract ANR11 IDEX00502. We thank Dr C. Leroy for reading the manuscript, Dr L. Guittat for helpful discussion during the experimental work and Dr B. Papp for initiating collaboration with Dr P. Gelebart.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. Blood. 1997;89:2067–78.
2. Orchard J, Garand R, Davis Z, Babbage G, Sahota S, Matutes E, et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. Blood. 2003;101:4975–81.
3. Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in

chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. Blood. 1994;84:2726–32.
4. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. J Clin Invest. 2012;122:3416–23.
5. Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. Blood. 2011;117:26–38.
6. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, Delfau-Larue MH, Pedersen LB, et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. Blood. 2011;118:3088–95.
7. Saba NS, Liu D, Herman SE, Underbayev C, Tian X, Behrend D, et al. Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF-kappaB activation in mantle cell lymphoma. Blood. 2016;128:82–92.
8. Rizzatti EG, Falcao RP, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Anselmo-Lima WT, Okamoto OK, et al. Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signalling pathways. Br J Haematol. 2005;130:516–26.
9. Kimura Y, Arakawa F, Kiyasu J, Miyoshi H, Yoshida M, Ichikawa A, et al. The Wnt signaling pathway and mitotic regulators in the initiation and evolution of mantle cell lymphoma: gene expression analysis. Int J Oncol. 2013;43:457–68.
10. Gelebart P, Anand M, Armanious H, Peters AC, Dien Bard J, Amin HM, et al. Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma. Blood. 2008;112:5171–9.
11. Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. Cell. 2012;149:1192–205.
12. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Dev. 1997;11:3286–305.
13. Stamos JL, Weis WI. The beta-catenin destruction complex. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5:a007898.
14. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature. 1995;378:785–9.
15. Goode N, Hughes K, Woodgett JR, Parker PJ. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. J Biol Chem. 1992;267:16878–82.
16. Christian SL, Sims PV, Gold MR. The B cell antigen receptor regulates the transcriptional activator beta-catenin via protein kinase C-mediated inhibition of glycogen synthase kinase-3. J Immunol. 2002;169:758–69.
17. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. Nature. 1999;398:422–6.
18. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science. 1998;281:1509–12.
19. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. Mol Cell Biol. 2002;22:1172–83.
20. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cell Signal. 2002;14:381–95.
21. Baran-Marszak F, Boukhiar M, Harel S, Laguillier C, Roger C, Gressin R, et al. Constitutive and B-cell receptor-induced activation of STAT3 are important signaling pathways targeted by bortezomib in leukemic mantle cell lymphoma. Haematologica. 2010;95:1865–72.
22. Bernard S, Danglade D, Gardano L, Laguillier C, Lazarian G, Roger C, et al. Inhibitors of BCR signalling interrupt the survival signal mediated by the micro-environment in mantle cell lymphoma. Int J Cancer. 2014;136:2761–74.
23. Gold MR, Ingham RJ, McLeod SJ, Christian SL, Scheid MP, Duronio V, et al. Targets of B-cell antigen receptor signaling: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 signaling pathway and the Rap1 GTPase. Immunol Rev. 2000;176:47–68.
24. Dal Col J, Dolcetti R. GSK-3beta inhibition: at the crossroad between Akt and mTOR constitutive activation to enhance cyclin D1 protein stability in mantle cell lymphoma. Cell Cycle. 2008;7:2813–6.
25. Gold MR, Scheid MP, Santos L, Dang-Lawson M, Roth RA, Matsuuchi L, et al. The B cell antigen receptor activates the Akt (protein kinase B)/glycogen synthase kinase-3 signaling pathway via phosphatidylinositol 3-kinase. J Immunol. 1999;163:1894–905.
26. Boukhiar MA, Roger C, Tran J, Gressin R, Martin A, Ajchenbaum-Cymbalista F, et al. Targeting early B-cell receptor signaling induces apoptosis in leukemic mantle cell lymphoma. Exp Hematol Oncol. 2013;2:4.
27. Bognar MK, Vincendeau M, Erdmann T, Seeholzer T, Grau M, Linnemann JR, et al. Oncogenic CARMA1 couples NF-kappaB and beta-catenin signaling in diffuse large B-cell lymphomas. Oncogene. 2016;35:4269–81.
28. Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. Nature. 1998;391:410–3.
29. Raskatov JA, Meier JL, Puckett JW, Yang F, Ramakrishnan P, Dervan PB. Modulation of NF-kappaB-dependent gene transcription using programmable DNA minor groove binders. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109:1023–8.
30. Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, et al. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. Cancer Cell. 2004;5:91–102.
31. Khan NI, Bradstock KF, Bendall LJ. Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 2007;138:338–48.
32. Gandhirajan RK, Poll-Wolbeck SJ, Gehrke I, Kreuzer KA. Wnt/beta-catenin/LEF-1 signaling in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a target for current and potential therapeutic options. Curr Cancer Drug Targets. 2010;10:716–27.
33. Spaargaren M, de Rooij MF, Kater AP, Eldering E. BTK inhibitors in chronic leukemia: a glimpse to the future. Oncogene. 2015;34:2426–36.
34. Lindvall J, Islam TC. Interaction of Btk and Akt in B cell signaling. Biochem Biophys Res Commun. 2002;293:1319–26.
35. de Rooij MF, Kuil A, Kater AP, Kersten MJ, Pals ST, Spaargaren M. Ibrutinib and idelalisib synergistically target BCR-controlled adhesion in MCL and CLL: a rationale for combination therapy. Blood. 2015;125:2306–9.
36. Sun Y, Campisi J, Higano C, Beer TM, Porter P, Coleman I, et al. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. Nat Med. 2012;18:1359–68.
37. Sun Y, Zhu D, Chen F, Qian M, Wei H, Chen W, et al. SFRP2 augments WNT16B signaling to promote therapeutic resistance in the damaged tumor microenvironment. Oncogene. 2016;35:4321–34.
38. Lovatt M, Bijlmakers MJ. Stabilisation of beta-catenin downstream of T cell receptor signalling. PLoS ONE. 2010;5:e12794.
39. Koopmans T, Eilers R, Menzen M, Halayko A, Gosens R. beta-catenin directs nuclear Factor-kappaB p65 output via CREB-binding protein/p300 in human airway smooth muscle. Front Immunol. 2017;8:1086.
40. Ma B, Hottiger MO. Crosstalk between Wnt/beta-Catenin and NF-kappaB signaling pathway during Inflammation. Front Immunol. 2016;7:378.
41. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of beta-catenin. EMBO J. 2012;31:2714–36.
42. Zhang X, Hao J. Development of anticancer agents targeting the Wnt/beta-catenin signaling. Am J Cancer Res. 2015;5:2344–60.
43. Mathur R, Sehgal L, Braun FK, Berkova Z, Romaguerra J, Wang M, et al. Targeting Wnt pathway in mantle cell lymphoma-initiating cells. J Hematol Oncol. 2015;8:63.

44. Hallett RM, Kondratyev MK, Giacomelli AO, Nixon AM, Girgis-Gabardo A, Ilieva D, et al. Small molecule antagonists of the Wnt/beta-catenin signaling pathway target breast tumor-initiating cells in a Her2/Neu mouse model of breast cancer. PLoS ONE. 2012;7:e33976.

45. Mazieres J, You L, He B, Xu Z, Lee AY, Mikami I, et al. Inhibition of Wnt16 in human acute lymphoblastoid leukemia cells containing the t(1;19) translocation induces apoptosis. Oncogene. 2005;24:5396–400.

Affiliations

Gregory Lazarian[1,2,3] · Chloe Friedrich[1,2] · Anne Quinquenel[1,2] · Julie Tran[1,2] · Souhail Ouriemmi[1,2] · Elisabetta Dondi[1,2] · Antoine Martin[1,2,4] · Imane Mihoub[1,2] · David Chiron[5] · Céline Bellanger[5] · Carole Fleury[1,2,3] · Pascal Gélébart[6] · Emmet McCormack[6] · Dominique Ledoux[1,2] · Catherine Thieblemont[7] · Jacek Marzec[8] · John G. Gribben[9] · Florence Cymbalista[1,2,3] · Nadine Varin-Blank[1,2] · Laura Gardano[1,2] · Fanny Baran-Marszak[1,2,3]

1 U978 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Bobigny, France

2 Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Labex Inflamex, Bobigny, France

3 Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Avicenne, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Bobigny, France

4 Service d'anatomopathologie, Hôpital Avicenne, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Bobigny, France

5 Centre de Recherches en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, U1232 INSERM, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) ERL6001, Université de Nantes, Nantes, France

6 Department of clinical science, University of Bergen, Bergen, Norway

7 Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Paris, France

8 Department of Clinical Pathology, University of Melbourne, Melbourne, VIC, Australia

9 Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London, London, UK

Résumé

Le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur dans la physiopathologie de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) car il contribue à la survie et la prolifération des cellules B malignes par l'intermédiaire d'interactions directes intercellulaires ou indirectes via des facteurs solubles. Dans le cadre de l'étude du dialogue entre les cellules LLC et leur microenvironnement, nous avons porté notre attention sur la β-caténine pour sa capacité à réguler l'adhérence cellulaire mais également à induire une réponse transcriptionnelle de gènes pro-survie. La co-culture de cellules LLC (primaires ou lignées) avec des cellules stromales (la lignée HS-5) constitue un modèle de choix pour mimer les échanges avec le microenvironnement. Lors de leur co-culture, les cellules LLC se répartissent en deux fractions : une fraction adhérente et une fraction non adhérente aux cellules stromales. Dans les cellules LLC non-adhérentes, la β-caténine est fortement stabilisée, interagit avec la kinase BTK et régule la transcription du gène Cyclin D1. En revanche, cette stabilisation n'est pas observée dans les cellules adhérentes et la β-caténine est localisée à la membrane cellulaire. La surexpression dans les cellules LLC de la β-caténine augmente leur adhérence aux cellules stromales. Ces données indiquent que la β-caténine, en association avec BTK, joue un rôle de régulateur du dialogue entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. Dans une deuxième partie, nous avons analysé l'impact des cellules LLC sur la reprogrammation phénotypique et fonctionnelle des cellules HS-5. Nos résultats montrent que les cellules LLC orientent les cellules HS-5 vers un profil de cellules ganglionnaires de type FRC via notamment la sécrétion de cytokines immunomodulatrices (IFNβγ, TNFα), favorisant ainsi l'échappement immunitaire de la tumeur. La description à l'échelle moléculaire du dialogue entre la cellule tumorale et son microenvironnement permettra de mieux comprendre la physiopathologie de la LLC mais également de mettre en évidence des cibles thérapeutiques alternatives aux stratégies actuelles afin de cibler et de bloquer le dialogue délétère que la tumeur établit avec son microenvironnement.

Abstract

The tumor microenvironment plays an important role in the pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia (CLL) as it promotes the survival and proliferation of malignant B cells either through direct cell-cell interactions or indirectly through soluble factors. In this study, we focused our attention on β-catenin as an effector of the cross-talk between CLL cells and the microenvironment using a co-culture model of tumor cells with a human bone marrow stromal cell line, HS-5. β-catenin is a known regulator of cell adhesion but it also behaves as a transcriptional co-activator in several signal transduction cascades induced by different stimuli, including Wnt and the BCR. When CLL and HS-5 cells are co-cultured, a fraction of CLL cells adhere to HS-5 whereas another fraction remain in suspension. We observed that the amount and distribution of β-catenin varies in the adherent versus suspension cells, suggesting a different role of β-catenin in these two cell fractions. Indeed, we observed that in suspension cells, β-catenin is stabilized, interacts with the kinase BTK and, regulates Cyclin D1 gene transcription. However, in adherent cells β-catenin is mainly in the cytosol/membrane compartments. When β-catenin is overexpressed in CLL cells, their adhesion to stromal cells is exacerbated without consequences on cell migration. Thesedata indicate that β-catenin, in association with BTK, plays a role in regulating the dialogue between tumor cells and their microenvironment. In the second part of this project, we analyzed the effect of CLL cells on the phenotypic and functional reprogramming of HS-5 cells. Our results suggest that CLL cells promote tumor immune evasion by secreting immunomodulatory cytokines (IFNγ, TNFα) to direct HS-5 cells to a FRC-like lymph node cell lineage. A better understanding of the mechanisms by which tumor cells increase their survival and escape immune surveillance could open new therapeutic avenues to block the harmful dialogue between leukemic cells and their microenvironment and restore effective immunity at sites of tumor proliferation.