



HAL
open science

Étude de la niche lymphatique dans un modèle ex-vivo de LLC

Caroline Ruetsch

► **To cite this version:**

Caroline Ruetsch. Étude de la niche lymphatique dans un modèle ex-vivo de LLC. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02507658

HAL Id: dumas-02507658

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02507658>

Submitted on 13 Mar 2020

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.



Université de Nice Sophia-Antipolis
Faculté de Médecine de Nice



Année : 2019

THÈSE

Pour le diplôme d'État de Docteur en Médecine
Discipline : Biologie : Immunologie-Hématologie

Présentée et soutenue publiquement à La Faculté de Médecine de
Nice le 7 Octobre 2019 par :

Caroline Ruetsch

Née le 05 janvier 1989, à Pau (64)

Étude de la niche lymphatique dans un modèle *ex-vivo* de LLC

Membres du Jury :

Madame le Professeur Valérie Giordanengo :	Présidente
Monsieur le Professeur Pierre Simon Rohrlich :	Assesseur
Madame le Docteur Ghislaine Bernard :	Assesseur
Madame le Docteur Barbara Seitz-Polski :	Assesseur
Monsieur le Docteur Marcel Deckert :	Assesseur
Monsieur le Docteur Michel Ticchioni :	Directeur

Remerciements :

A Madame le Professeur Giordanengo qui a accepté d'être présidente du Jury. Je vous remercie pour l'aide et l'écoute apportées pendant ces quatre années d'internat. Vous vous préoccupez de chaque interne et allez à ses devants. Dans les moments difficiles, de doutes vous avez su m'écouter et me soutenir. Vous êtes une femme passionnée qui dirige son service avec élégance et justice. Soyez assurée de ma profonde admiration.

A Monsieur le Professeur Rohrllich qui a très aimablement accepté d'être membre du jury. Je vous remercie pour les visites professorales à l'UP. J'y ai passé six mois magnifiques, riches en enseignements tant scientifiques qu'humains. Soyez assuré de ma gratitude.

A Madame le Docteur Bernard : Merci pour m'avoir fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse. Je n'oublierai jamais notre première rencontre marquée par tant de bienveillance et de gentillesse. Merci pour m'avoir accueilli les bras ouverts dans le service. J'ai pu grâce à votre aide et soutien, évoluer et développé mes connaissances en Immunologie.

A Madame le Dr Seitz-Polski : Merci pour m'avoir fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse. Ton ambition force l'admiration, j'ai hâte de travailler avec toi et de partager ton dynamisme.

A Monsieur le Dr Deckert : Merci pour m'avoir accepté en thèse dans ton équipe. La reprise difficile en science a laissé place à une réelle motivation de poursuivre le projet. Merci pour m'avoir fait confiance.

A Monsieur le Docteur Ticchioni : Merci pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse. Tu m'as transmis le goût de la cytométrie en flux. Merci de partager ta rigueur au quotidien, tes connaissances théoriques et scientifiques ainsi que ton enseignement. C'est un plaisir de pouvoir continuer de travailler à tes côtés.

A ma famille,

A mes parents : Vous m'avez tout donné. Tout ce que je ferai ne pourra jamais égaler l'amour et le soutien que vous m'avez toujours confié. Merci pour m'avoir transmis toutes vos valeurs. Je vous admire pour tout ce que vous avez accompli dans la plus grande simplicité.

Plus particulièrement à toi maman, merci pour ta générosité, ton amour sans limite, et ta tendresse rassurante. Je t'aime

A Valérie, ma sœur, ma confidente, ma fierté. Difficile de combler le vide que tu as laissé après ton départ à Paris. Je te passe le flambeau dans cette dernière ligne droite.

A Anthony, mon frère, mon double. Merci pour ta sagesse, ton courage et ta bienveillance. Je suis fière de tes choix et de tout ce que tu as accompli. Tu me manques un peu plus chaque jour mais je sais que tu es épanoui en Israël.

A David, mon frère, mon pilier. Quel challenge d'égaliser ta réussite. Merci de me donner ta force et me montrer l'exemple.

A Camille, ma belle-sœur, merci de rendre mon frère si heureux et de me combler par un deuxième neveu.

A mes amis,

Moussi et Reouven, évoluer à vos côtés me renforce dans tous les domaines. Sarah, je ne te remercierai jamais assez pour tous nos moments de complicité et surtout pour Mikaël. Merci à Karine et Paul, Aviva et Nathan !! Ma Anne, merci d'avoir rendu cet internat plus léger et d'avoir répondu présente à chaque moment difficile. Audrey mon petit bout de femme toujours de bonne humeur et de bons conseils merci d'être à mes côtés !! à Hajar le binôme du 3^{ième}, qu'est-ce que je ferais sans tes petits calembours !!?;) A Edmond, merci pour avoir fait de mon stage clinique un stage (...à remplir...) (On se comprend 😊). Merci à Robin pour m'avoir aidé les premiers jours au laboratoire, puis pour être devenu un véritable ami.

A mes co-internes :

Juliette, tu as mis la barre très haute, un modèle pour la biologie merci de m'avoir transmis ta passion pour la science. Anne, merci pour tes conseils et ces petits moments de confidences qui m'ont permis d'aller de l'avant. Merci à tous mes co-internes, Lamine, Célia, Morgane, Hajar, Lucas, Grégoire, Mathilde (X3), Stéphane, Jacques, Loïc, Alicia.

A l'équipe du C3M :

Merci à l'ensemble de l'équipe 11 : Mika pour tes pauses café d'un grand réconfort, Serena pour m'avoir initié à la PCR, Pierrick pour m'avoir aidé et soutenu dans toutes mes premières manip, à Ilona et Margaux pour les sphères et un grand merci à Christopher pour partager les dimanches au labo, le bureau d'à côté et un peu de tes HLF 😊. Merci à Lauren, Virginie, Christophe et Fred.

Au personnel de l'hôpital :

Le cursus d'interne m'a permis de passer dans de nombreux services et de rencontrer des personnes formidables qui ont contribué à transformer mon internat en une véritable expérience humaine. Je tiens à les remercier et plus particulièrement :

Aux médecins qui m'ont fait l'honneur de m'accueillir dans leurs services et qui ont grandement contribué à ma formation d'interne : Professeur Giordanengo, Docteur Bernard, Professeur Chinetti, Professeur Marty, Professeur Raynaud, Professeur Ruimy. Aux médecins attachés à ces différents services qui m'ont accordé de leur temps, qui m'ont transmis leurs connaissances médicales et ce toujours dans une ambiance très agréable : Un grand merci : à Isabelle Sudaka pour ton aide et soutien pendant ces années d'internat, tes connaissances solides en cytologie et ton enseignement que tu divulgues avec classe et élégance m'ont permis de me passionner pour l'hématologie, à Corinne Ferrero ; merci pour ta douceur et ton soutien, à Danielle Acquarone, Hélène Billet, Maria Hamoir, Annie Appert, Florence Fisher, Didier Jambou, Pierre Toulon, Pascale Bayer, Patricia Ferrari, Nicolas Degand, Romain Lotte, Alice Gaudart, Caroline Touati, Lilia Hasseine, Pascal Delaunay.

Un grand merci à toute l'équipe d'immunologie : à Alessandra Rosenthal à qui je dois mon bureau, mon PC (Range ta chambre !!!), à Sylvia Benzaquen, Monique Pourtein, Muriel De

Matteis et Mylène Vivinus. A l'ensemble des techniciennes de CMF : à Alex, Marion, Virginie, Liliane, Darlène, Zahia, Bérangère. Aux techniciens du HLA et de l'auto immunité, à mes secrétaires préférées Christine(s), Brigitte, Sarah, sans oublier le sacré duo Danny et Coco.

A tout le personnel de jour des laboratoires et les secrétaires de virologie, biochimie, hématologie, parasitologie, bactériologie et immunologie avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant mes semestres d'internat. A l'équipe de nuit du laboratoire de réponse rapide de Saint-Roch, Pasteur, Archet : Myriam « mimi », Cathy, Claire, Samantha, Philippe, Michel, Michaël, Jean-Laurent, et tous les autres que je n'ai pas cité mais que je n'oublie pas pour autant. Comme je vous l'ai souvent dit « vous m'avez vu grandir », grâce à vous mes gardes resteront des souvenirs extraordinaires, je souhaite garder contact avec vous tous, vous allez me manquer !

Aux médecins attachés et personnel infirmier du service d'hématologie clinique qui m'ont accueillie alors que j'étais déjà interne de biologie médicale et m'ont transmis le goût de l'hématologie. Aux Professeurs Cluzeau, Mounier et aux docteurs Karsenti, Mannone, Vinti, Richez et Loschi. Merci de votre gentillesse, votre patience, votre enseignement et votre humour qui ont rendu mes six mois d'hématologie clinique en un véritable bonheur.

A l'exceptionnelle équipe de l'UP ! Merci à Audrey, Laura, Amélie, charlotte, Jean-mi, Jean, Mumu, Stéphanie et tous ceux que j'oublie.

Merci à tous d'avoir contribué à mon voyage initiatique en médecine.

Et enfin au plus précieux d'entre tous :

A Mikaël, mon ouragan,

Je me laisse emportée dans ton tourbillon d'énergie, entraînée dans ton univers palpitant, stimulée par ta soif d'apprendre insatiable. Tu me plonges sans cesse dans un océan de bonheur, motivant, frémissant, exaltant.

Je t'aime...

Liste des enseignants au 1er septembre 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

Doyen

Pr. BAQUÉ Patrick

Vice-doyens

Pédagogie

Pr. ALUNNI Véronique

Recherche

Pr DELLAMONICA jean

Etudiants

M. JOUAN Robin

Chargé de mission projet Campus

Pr. PAQUIS Philippe

Conservateur de la bibliothèque

Mme AMSELLE Danièle

Directrice administrative des services

Mme CALLEA Isabelle

Doyens Honoraires

M. AYRAUD Noël

M. RAMPAL Patrick

M. BENCHIMOL Daniel

Liste des enseignants au 1er septembre 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M.	AMIEL Jean	Urologie (52.04)
M.	BAQUÉ Patrick	Anatomie - Chirurgie Générale (42.01)
M.	BERNARDIN Gilles	Réanimation Médicale (48.02)
M.	BOILEAU Pascal	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M.	DARCOURT Jacques	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M.	ESNAULT Vincent	Néphrologie (52-03)
M.	FENICHEL Patrick	Biologie du Développement et de la Reproduction (54.05)
M.	FUZIBET Jean-Gabriel	Médecine Interne (53.01)
M.	GILSON Éric	Biologie Cellulaire (44.03)
M.	GUGENHEIM Jean	Chirurgie Digestive (52.02)
M.	HASSEN KHODJA Reda	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M.	HÉBUTERNE Xavier	Nutrition (44.04)
M.	HOFMAN Paul	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
Mme	ICHAÏ Carole	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	LACOUR Jean-Philippe	Dermato-Vénérologie (50.03)
M.	LEFTHERIOTIS Geogres	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (51.04)
M.	MARQUETTE Charles-Hugo	Pneumologie (51.01)
M.	MARTY Pierre	Parasitologie et Mycologie (45.02)
M.	MICHIELS Jean-François	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M.	MOUROUX Jérôme	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
Mme	PAQUIS Véronique	Génétique (47.04)
M.	PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)
M.	QUATREHOMME Gérald	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	RAUCOULES-AIMÉ Marc	Anesthésie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	ROBERT Philippe	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M.	SANTINI Joseph	O.R.L. (55.01)
M.	THYSS Antoine	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	TRAN Albert	Hépatogastro-entérologie (52.01)

Liste des enseignants au 1er septembre 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEURS PREMIERE CLASSE

Mme	ASKENAZY-GITTARD Florence	Pédopsychiatrie (49.04)
M.	BARRANGER Emmanuel	Gynécologie Obstétrique (54.03)
M.	BÉRARD Étienne	Pédiatrie (54.01)
Mme	BLANC-PEDEUTOUR Florence	Cancérologie – Génétique (47.02)
M.	BONGAIN André	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
Mme	BREUIL Véronique	Rhumatologie (50.01)
M.	CASTILLO Laurent	O.R.L. (55.01)
M.	CHEVALLIER Patrick	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	DE PERETTI Fernand	Anatomie-Chirurgie Orthopédique (42.01)
M.	DRICI Milou-Daniel	Pharmacologie Clinique (48.03)
M.	FERRARI Émile	Cardiologie (51.02)
M.	FERRERO Jean-Marc	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	FONTAINE Denys	Neurochirurgie (49.02)
M.	GIBELIN Pierre	Cardiologie (51.02)
M.	HANNOUN-LEVI Jean-Michel	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	LEVRAUT Jacques	Médecine d'urgence (48.05)
M.	LONJON Michel	Neurochirurgie (49.02)
M.	MOUNIER Nicolas	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	PADOVANI Bernard	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	PICHE Thierry	Gastro-entérologie (52.01)
M.	PRADIER Christian	Épidémiologie, Économie de la Santé et Prévention (46.01)
Mme	RAYNAUD Dominique	Hématologie (47.01)
M.	ROSENTHAL Éric	Médecine Interne (53.01)
M.	SCHNEIDER Stéphane	Nutrition (44.04)
M.	STACCINI Pascal	Biostatistiques et Informatique Médicale (46.04)
M.	THOMAS Pierre	Neurologie (49.01)
M.	TROJANI Christophe	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie (50.02)

Liste des enseignants au 1er septembre 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE

Mme	ALUNNI Véronique	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	ANTY Rodolphe	Gastro-entérologie (52.01)
M.	BAHADORAN Philippe	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	BAILLIF Stéphanie	Ophtalmologie (55.02)
Mme	BANNWARTH Sylvie	Génétique (47.04)
M.	BENIZRI Emmanuel	Chirurgie Générale (53.02)
M.	BENOIT Michel	Psychiatrie (49.03)
M.	BOZEC Alexandre	ORL- Cancérologie (47.02)
M.	BREAUD Jean	Chirurgie Infantile (54-02)
M.	CHEVALIER Nicolas	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
Mme	CHINETTI Giulia	Biochimie-Biologie Moléculaire (44.01)
M.	CLUZEAU Thomas	Hématologie (47.01)
M.	DELLAMONICA Jean	réanimation médicale (48.02)
M.	DELOTTE Jérôme	Gynécologie-obstétrique (54.03)
M.	FOURNIER Jean-Paul	Thérapeutique (48-04)
Mlle	GIORDANENGO Valérie	Bactériologie-Virologie (45.01)
Mme	GIOVANNINI-CHAMI Lisa	Pédiatrie (54.01)
M.	GUÉRIN Olivier	Méd. In ; Gériatrie (53.01)
M.	IANNELLI Antonio	Chirurgie Digestive (52.02)
M.	ILIE Marius	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M	JEAN BAPTISTE Elixène	Chirurgie vasculaire (51.04)
M.	PASSERON Thierry	Dermato-Vénérologie (50-03)
M.	ROGER Pierre-Marie	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M.	ROHRLICH Pierre	Pédiatrie (54.01)
M.	ROUX Christian	rhumatologie (50.01)
M.	RUIMY Raymond	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme	SACCONI Sabrina	Neurologie (49.01)
M.	SADOUL Jean-Louis	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)

Liste des enseignants au 1er septembre 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

M.	AMBROSETTI Damien	Cytologie et Histologie (42.02)
M.	BENOLIEL José	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme	BERNARD-POMIER Ghislaine	Immunologie (47.03)
M.	BRONSARD Nicolas	Anatomie Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (42.01)
Mme	BUREL-VANDENBOS Fanny	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	DOGLIO Alain	Bactériologie-Virologie (45.01)
M	DOYEN Jérôme	Radiothérapie (47.02)
M	FAVRE Guillaume	Néphrologie (52.03)
M.	FOSSE Thierry	Bactériologie-Virologie-Hygiène (45.01)
M.	GARRAFFO Rodolphe	Pharmacologie Fondamentale (48.03)
Mme	HINAULT Charlotte	Biochimie et biologie moléculaire (44.01)
M.	HUMBERT Olivier	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme	LAMY Brigitte	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme	LONG-MIRA Elodie	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	MAGNIÉ Marie-Noëlle	Physiologie (44.02)
Mme	MOCERI Pamela	Cardiologie (51.02)
M.	MONTAUDIE Henri	Dermatologie (50.03)
Mme	MUSSO-LASSALLE Sandra	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	NAÏMI Mourad	Biochimie et Biologie moléculaire (44.01)
Mme	POMARES Christelle	Parasitologie et mycologie (45.02)
M.	SAVOLDELLI Charles	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie (55.03)
Mme	SEITZ-POLSKI Barbara	Immunologie (47.03)
M.	TESTA Jean	Épidémiologie Économie de la Santé et Prévention (46.01)
M.	TOULON Pierre	Hématologie et Transfusion (47.01)

Liste des enseignants au 1er septembre 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS

M. HOFLIGER Philippe Médecine Générale (53.03)

MAITRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS

M. DARMON David Médecine Générale (53.03)

PROFESSEURS AGRÉGÉS

Mme LANDI Rebecca Anglais

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

M. DURAND Matthieu Urologie (52.04)

PROFESSEURS ASSOCIÉS

M. GARDON Gilles Médecine Générale (53.03)

Mme MONNIER Brigitte Médecine Générale (53.03)

MAITRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Mme CASTA Céline Médecine Générale (53.03)

M. GASPERINI Fabrice Médecine Générale (53.03)

M. HOGU Nicolas Médecine Générale (53.03)

Liste des enseignants au 1er septembre 2018 à la Faculté de Médecine de Nice

Constitution du jury en qualité de 4ème membre

Professeurs Honoraires

M ALBERTINI Marc	M. GÉRARD Jean-Pierre
M. BALAS Daniel	M. GILLET Jean-Yves
M. BATT Michel	M. GRELLIER Patrick
M. BLAIVE Bruno	M. GRIMAUD Dominique
M. BOQUET Patrice	M. HARTER Michel
M. BOURGEON André	M. JOURDAN Jacques
M. BOUTTÉ Patrick	M. LAMBERT Jean-Claude
M. BRUNETON Jean-Noël	M. LAZDUNSKI Michel
Mme BUSSIERE Françoise	M. LEFEBVRE Jean-Claude
M. CAMOUS Jean-Pierre	M. LE FICHOUX Yves
M. CANIVET Bertrand	Mme LEBRETON Elisabeth
M. CASSUTO Jill-patrice	M. LOUBIERE Robert
M. CHATEL Marcel	M. MARIANI Roger
M. COUSSEMENT Alain	M. MASSEYEFF René
Mme CRENESSE Dominique	M. MATTEI Mathieu
M. DAR COURT Guy	M. MOUIEL Jean
M. DELLAMONICA Pierre	Mme MYQUEL Martine
M. DELMONT Jean	M. ORTONNE Jean-Paul
M. DEMARD François	M. PRINGUEY Dominique
M. DESNUELLE Claude	M. SAUTRON Jean Baptiste
M. DOLISI Claude	M. SCHNEIDER Maurice
Mme EULLER-ZIEGLER Liana	M. TOUBOL Jacques
M. FRANCO Alain	M. TRAN Dinh Khiem
M. FREYCHET Pierre	M VAN OBBERGHEN Emmanuel
M. GASTAUD Pierre	M. ZIEGLER Gérard

M.C.U. Honoraires

M. ARNOLD Jacques	M. GIUDICELLI Jean
M. BASTERIS Bernard	M. MAGNÉ Jacques
Mlle CHICHMANIAN Rose-Marie	Mme MEMRAN Nadine
Mme DONZEAU Michèle	M. MENGUAL Raymond
M. EMILIOZZI Roméo	M. PHILIP Patrick
M. FRANKEN Philippe	M. POIRÉE Jean-Claude
M. GASTAUD Marcel	Mme ROURE Marie-Claire

Table des matières

1	INTRODUCTION :	15
1.1	Généralités sur la LLC : Définition, origine et pathogenèse.	15
1.2	Métabolisme énergétique :	21
2	MATERIELS ET METHODES :	24
2.1	Patients	24
2.2	Sources cellulaires.....	24
2.3	Techniques de culture cellulaire.....	25
2.4	Microscopie.....	25
2.5	Cytométrie en flux.....	25
2.6	Immunohistochimie.....	26
2.7	Western-Blot	27
2.8	Etude des cytokines	27
2.9	Analyse des métabolites	27
2.10	Test ATP	28
2.11	PCR	28
2.12	Analyse statistique.....	29
3	RESULTATS	29
3.1	Caractéristiques des patients	29
3.2	Anomalies cytogénétiques et index de prolifération	31
3.3	Co-culture des cellules de LLC avec des fibroblastes médullaires (HS5) et ganglionnaires (HLF) : mesure de la viabilité, de la prolifération et de la sécrétion des cytokines	32
3.4	Co-culture en 2D	35
3.5	Co-culture en 3D : Formation du sphéroïde de LLC en co-culture avec des fibroblastes :.....	36
3.6	Activation des voies de signalisation et des protéines anti apoptotiques dans les cellules de LLC en co-culture avec les fibroblastes ganglionnaires HLF (contrôle HS5).....	38
3.7	Différences d'expression géniques dans les cellules de LLC seules et en co-culture	39
3.8	Profils métaboliques des cellules de LLC seules et en co-culture.....	40
4	DISCUSSION	42
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	46
6	BIBLIOGRAPHIE	48
7	ANNEXES :	52
7.1	Annexe 1 : Score de Matutes.....	52
7.2	Annexe 2 : Classification de Binet.....	52
7.3	Annexe 3 : Pronostic de la LLC	52
7.4	Annexe 4 : Autorisation de la CNIL et consentement	53

Abréviations :

ATP : Adénosine triphosphate

BCL₂ : B-cell lymphoma 2

BCR : B cell receptor (récepteur de la cellule B)

BTK : Bruton tyrosine kinase

CCTIRS : Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche

CNIL: Commission nationale de l'informatique et des libertés

CpG ODN : CpG oligodeoxynucleotide

CG : Centre germinatif

CSH : Cellule souche hématopoïétique

CSL: Cellule souche leucémique

DMSO : Dimethyl sulfoxide

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique,

FC : Fludarabine cyclophosphamide

FSC : Forward Side scatter : donne la taille des cellules par cytométrie de flux

GAPDH : Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase

GSK3 : Glycogène Synthase Kinase 3

HES : Hematoxylin eosine saffron

HIF-1: Facteur 1 inductible d'hypoxie

HLF : Human Leucocyte fibroblasts

HS5 : Human Stromal 5

LBDGC : Lymphome B diffus à grande cellule

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LYN : Tyrosine protein kinase Lyn

MCL1 : Myeloid cell leukemia

OxPhos : <phosphorylation oxydative

PBS : Phosphate-buffered saline

PCR : Polymerase chain reaction

PI3K : Phosphoinositol 3 kinase

PFS : Survie sans progression

RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium

SVF : Sérum veau fœtal

SSC : Side Scatter : donne la granularité des cellules par cytométrie de flu

1 Introduction :

1.1 Généralités sur la LLC : Définition, origine et pathogenèse.

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la plus fréquente des leucémies de l'adulte dans les pays industrialisés, on compte chaque année 4000 nouveaux cas en France et 15000 aux Etats unis¹. Elle se définit à la fois par une accumulation de lymphocytes B matures CD5⁺ monotypiques quiescents dans le sang associé à une hyperlymphocytose sanguine de plus de 5000/mm³². L'évolution de la LLC est très variable avec un tiers de patients qui ne nécessitera aucun traitement, un tiers qui présentera une phase indolente suivie d'une phase de progression et un dernier tiers qui présentera une forme d'emblée agressive. L'émergence en routine de la cytogénétique et de l'immunologie a permis d'affiner les facteurs pronostiques. Avec les classifications clinico-biologiques de RAI BINET et le nouveau score pronostique IPI (*TP53* délétion/mutation, statut mutationnel des immunoglobulines, β 2 microglobuline, le stade clinique et l'âge)³⁻⁶, les mutations *NOTCH*, le temps de doublement de la lymphocytose permettent de définir le pronostic et de mieux orienter le traitement (annexe 1,2,3)^{3,7-12}. Jusqu'en 2008, le traitement standard reposait sur l'association de la fludarabine, un analogue de purine, et du cyclophosphamide, un agent alkylant (FC). L'introduction du rituximab (R, anticorps monoclonal dirigé contre le CD20, un marqueur exprimé à la surface des lymphocytes B dès les stades pré-B) en association avec la chimiothérapie FC s'est imposée comme traitement de référence de la LLC depuis 10 ans¹³. La principale avancée de cette dernière décennie a cependant concerné la prise en charge des patients réfractaires ou présentant des anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic, qui concernent 30% de ces patients pour lesquels nous disposons de peu de possibilités thérapeutiques. L'arrivée des thérapies ciblées, comme les inhibiteurs de la Bruton tyrosine kinase (BTK) (Imbruvica® ; Ibrutinib)¹³⁻¹⁵ ou (Zydeligl® ; Idélalisib) un inhibiteur de la phosphatidylinositol-3-kinase ont particulièrement amélioré la survie des patients présentant une mutation de *TP53* en première intention (tableau 1). L'ibrutinib est recommandé comme traitement de première intention pour tous les patients présentant une aberration de TP53 en l'absence de contre-indication. Malgré une efficacité améliorée l'ibrutinib permet une survie globale estimée à 25%¹⁶. Les antagonistes de BCL-2 (Le Venclexta® Venetoclax) ont une efficacité thérapeutique indépendante des paramètres pronostiques défavorables tels qu'une aberration de la *TP53* ou une résistance à la fludarabine. Le Venetoclax a récemment été approuvé pour le traitement des patients présentant une aberration de la *TP53* lors de la rechute. En Europe, le Venetoclax

est approuvé comme traitement de première intention pour les patients ne répondant pas à l'ibrutinib ou à l'idélalisib associé à un anticorps anti-CD20 après chimio-immunothérapie. Sur la base de découvertes récentes, l'association de Venetoclax et du rituximab est également approuvée dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique en rechute. Néanmoins ce traitement entraîne des résistances ainsi que de nombreuses neutropénies chez des patients déjà très immunodéprimés.

Malgré un arsenal thérapeutique largement développé⁴⁻⁶, de nombreuses résistances et effets secondaires liés aux traitements émergent et sont responsables de rechutes parfois précoces et graves (figure 1). Ceci s'explique en partie par la persistance d'une maladie résiduelle liée au développement de niches de cellules leucémiques résistantes au traitement, associées à de nombreuses altérations génétiques de la cellule tumorale¹⁷⁻²⁰.

Tableau 1 : Ière ligne de traitement chez des patients LLC fit et unfit et prise en charge thérapeutique des patients en rechute.²¹

Réfractaire ou évolution dans les 3 ans	Thérapie Standard	Thérapeutiques alternatives
Patient Fit	Ibrutinib possible suivi par une allogreffe de cellules souche hématopoïétique	Idelalisib + Rituximab, Venetoclax ou lenalidomide
Patient Unfit	Changement de thérapie	Ibrutinib, Idélalisib + rituximab, lénalidomide, antic

Ière ligne de traitement	TP53 muté	TP 53 non muté
Patient Fit	Fludarabine + Cyclophosphamide + Rituximab (âge < 65 ans) ou Bendamustine + Rituximab (âge > 65 ans)	Ibrutinib ou Idélalisib + Rituximab ou Venetoclax si Ibrutinib impossible en raison des comorbidités
Patient Unfit	Chlorambucil + Obinutizimab, Chlorambucil + Ofatumumab, Chlorambucil + Rituximab, Ibrutinib en monothérapie	Ibrutinib ou Idélalisib + rituximab ou Venetoclax si Ibrutinib impossible en raison des comorbidités

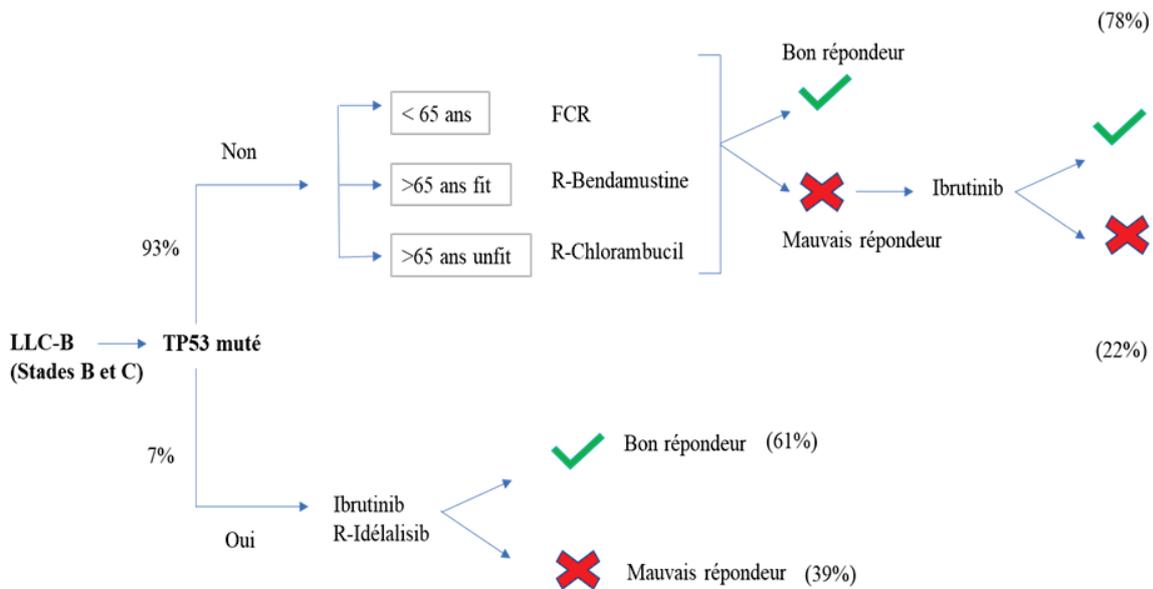


Figure 1 : Arbre décisionnel de la prise en charge thérapeutique d'une LLC-B.

Dans les stades B et C des LLC, le statut de P53 oriente la stratégie thérapeutique choisie par le clinicien. Environ 25 % des patients ne répondent pas aux thérapies actuelles. Abréviations : FCR : Fludarabine (analogue de purine) ; Cyclophosphamide (agent alkylant) ; Rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20) ; Bendamustine (agent alkylant) ; Chlorambucil (agent alkylant) ; Ibrutinib (inhibiteur de BTK bruton tyrosine kinase) ; Idelalisib (inhibiteur de PI3K). Fit : Patient en bon état général ; Unfit : mauvais état général

1.1.1 Origine cellulaire de la LLC :

La LLC est caractérisée par une accumulation de lymphocytes B matures monoclonaux qui s'accumulent dans le sang (niche vasculaire), les organes lymphoïdes secondaires (niches lymphatiques : rate, ganglions lymphatiques), et la moelle osseuse (niche médullaire). La diversité de ces niches s'explique en partie par l'origine cellulaire de la LLC qui s'opère de la façon suivante (figure 2) : Dans la moelle osseuse, la cellule souche hématopoïétique (CSH) subit des modifications génétiques et épigénétiques, conduisant à l'apparition d'une cellule souche leucémique (CSL)^{22,23}. La CSL poursuit sa différenciation en mimant le développement d'un lymphocyte B normal. A chacune des étapes de la différenciation de la CSH en lymphocyte B mature, une transformation maligne peut s'opérer pour conduire à l'apparition d'une LLC, ce qui rend très complexe l'étude de cette pathologie et qui rend compte de l'hétérogénéité de la maladie.

Le lymphocyte B naïf, migre ensuite dans le ganglion lymphatique pour terminer sa maturation et recevoir les signaux de prolifération. Dans le centre germinatif, au contact des cellules du microenvironnement, tels que les lymphocytes T, les fibroblastes et les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, monocytes), la cellule B maligne se divise et

s'accumule. La LLC peut également avoir pour origine le lymphocyte B mémoire^{19,20}. Le statut mutationnel muté correspond aux lymphocytes mémoires alors que le statut mutationnel non muté correspond aux lymphocytes B naïfs. La prolifération des cellules B de LLC dans le ganglion, conduit à l'accumulation des cellules de LLC dans le sang.²⁶⁻²⁸

Il est intéressant de noter que les cellules B de LLC en culture, *in vitro* ne se divisent pas et meurent spontanément par apoptose²⁹. Ceci suggère l'importance du rôle du microenvironnement dans la survie et la prolifération des LLC *in vivo*. Le ganglion semble être le siège d'une prolifération de la LLC documenté par l'activation substantielle du récepteur des cellules B (BCR) et du facteur de transcription NFκB et par rapport aux cellules de LLC situées dans la moelle osseuse et dans le sang.³⁰

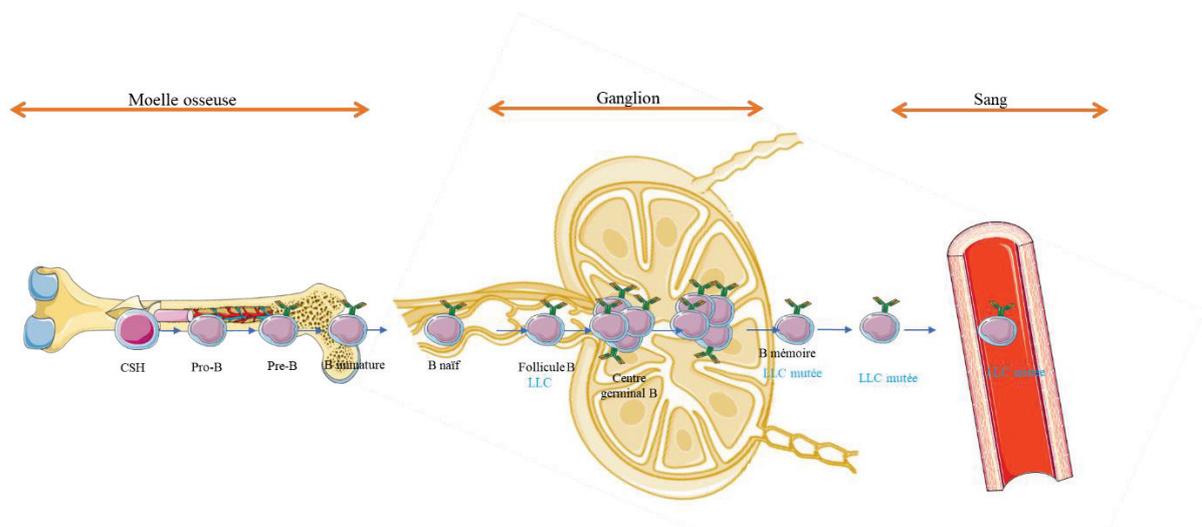


Figure 2 : Schéma simplifié de l'origine cellulaire de la leucémie lymphoïde chronique B (LLC). La cellule souche hématopoïétique (CSH) subit des modifications épigénétiques dans la moelle osseuse (MO) et se transforme en cellule souche leucémique (CSL). La CSL se différencie ensuite en lymphocyte B naïf qui migre de la moelle osseuse vers le ganglion, où il se multiplie au contact des lymphocytes T dans le centre germinatif (GC). La LLC est caractérisée par l'accumulation des lymphocytes B dans le ganglion lymphatique et dans la circulation sanguine

1.1.2 Pathogenèse de la LLC :

1.1.2.1 Le microenvironnement lymphatique

Les cellules de LLC reçoivent de nombreux signaux au sein des microenvironnements de la moelle osseuse et des organes lymphoïdes secondaires qui promeuvent la prolifération et la survie de la cellule tumorale et constituent des niches de résistance. En effet, il existe plusieurs niches comme « la niche médullaire » composée de cellules stromales, qui génèrent des signaux anti-apoptotiques et protègent les cellules de LLC de l'apoptose. Il existe aussi

« la niche lymphatique » qu'on retrouve dans les organes lymphoïdes secondaires. Ceux-ci ont une structure désorganisée contenant des “pseudo-follicules” composés de cellules stromales nurse-like (NLC), de cellules folliculaires dendritiques (FDC), de lymphocytes T et de cellules leucémiques (figure 3). Ces pseudo-follicules ont été identifiés comme le site de prolifération des lymphocytes de LLC. Le microenvironnement tumoral des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse est activement façonné par les cellules tumorales par la sécrétion de chimiokines pour créer des niches dans lesquelles les cellules cancéreuses reçoivent en retour des signaux extracellulaires favorisant la prolifération, la survie, l'échappement immunitaire et la résistance thérapeutique. Sur ce principe les techniques de cytogénétiques actuelles utilisent une stimulation *in vitro* par du CpG ODN et de l'IL2. Le CpG ODN est un agoniste du TLR9 caractérisé par des motifs CpG déméthylés qui stimulent le récepteur TLR9 et permet l'activation intracellulaire des voies des MAP-kinases (Mitogen Activated Protein kinases) et du NFκB (nuclear factor κB)). L'interleukine 2 est une cytokine du système immunitaire, qui contribue à la réponse naturelle du corps à une infection microbienne en stimulant la prolifération lymphocytaire et la différenciation de la réponse des lymphocytes T. Le CpG ODN associé à l'IL2 pendant au moins 48h à 72h de culture permet de stimuler les cellules B de LLC pour les faire rentrer en division dans le cycle cellulaire et plus particulièrement au stade métaphase (pour l'obtention de caryotypes)³¹⁻³³. Il est possible d'obtenir *in vitro* des cellules de LLC en prolifération sous réserve de simuler les effets du microenvironnement tumoral. L'importance du microenvironnement dans la résistance thérapeutique est illustrée par une étude récente sur l'association Venetoclax + Ibrutinib décrivant le développement de résistance par les cellules leucémiques médiée par des facteurs extrinsèques du microenvironnement comme l'IL-10, CD40L et les agonistes du TLR9 (CPG-ODNs).³⁴

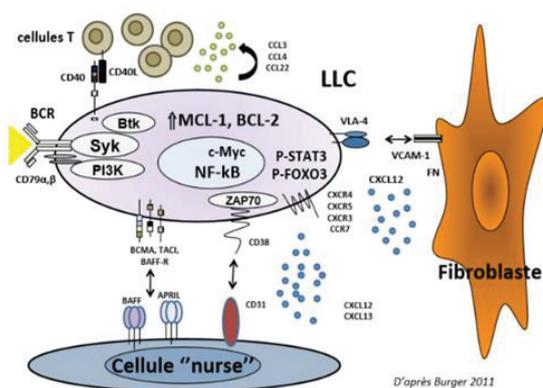


Figure 3 : Interactions moléculaires entre les LLC et les cellules du stroma dans les microenvironnements du tissu lymphoïde.

Le contact entre les cellules LLC, NLC, fibroblastes (HLF) et cellules T est établi et maintenu par les récepteurs de chimiokines et les molécules d'adhésion exprimées sur les cellules LLC. Les signaux médiés par ce micro-environnement tumoral, et l'activation du récepteur BCR permettent de promouvoir la survie et la prolifération de la cellule LLC.

1.1.2.2 L'activation du BCR

Le récepteur des cellules B (BCR) est une protéine transmembranaire réceptrice localisée à la surface de la membrane plasmique des lymphocytes B. Le récepteur des cellules B est formé du CD79 et d'une immunoglobuline. L'activation du BCR due à une mutation de la chaîne lourde des Immunoglobulines (IGHV) et/ou à une stimulation par un autoantigène, est également un facteur essentiel dans la pathogenèse de la LLC²⁸. La stimulation du BCR initie une cascade de phosphorylation et d'activation de molécules appartenant à différentes voies fortement interconnectées. Notamment, les PTKs Lyn, Btk et Syk qui vont ensuite phosphoryler PLC γ 2, qui va à son tour activer les voies PKC et calcium, aboutissant à la prolongation des voies de signalisation MEK/ERK, PI3K/AKT et activant des facteurs de transcription (NF- κ B et NFAT) nécessaires à la survie et à la prolifération des cellules de LLC. L'activation de la PI3K est également dépendante du BCR ainsi que du co-récepteur CD19. Cette voie influe en aval sur Akt, qui va phosphoryler des protéines impliquées dans le cycle cellulaire comme GSK3 (Glycogène Synthase Kinase 3), et également influencer sur le maintien de l'activation de NFAT.

1.1.2.3 Surexpression de BCL-2 et MCL-1

La caractéristique principale des cellules de LLC est une capacité réduite à subir une apoptose physiologique *in vitro*. De nombreuses altérations génétiques et épigénétiques (mutation des gènes *PTEN*, *TP53* et *NOTCH*, délétion de microARNs) affectent la survie des cellules de LLC et la réponse aux traitements. Au niveau moléculaire, la combinaison des altérations intrinsèques et des facteurs extracellulaires coopère pour favoriser la survie leucémique et conduit à une forte expression de protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2^{35,36}. Parmi celles-ci, MCL-1 (Myeloid Cell leukemia-1) joue un rôle majeur dans la physiopathologie de la LLC, où son expression est inversement corrélée à la réponse aux thérapies des patients^{33,34}. Une étude clinique de phase I sur le ciblage de MCL-1 dans la leucémie myéloïde chronique et le myélome multiple souligne l'importance de MCL-1 en cancérologie (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02979366>).

Il a été récemment montré que le microenvironnement tumoral modifie le métabolisme énergétique des cellules de LLC dans les niches médullaires.³⁷⁻³⁹ Une des principales caractéristiques des cellules cancéreuses est leur capacité à absorber avidement le glucose et à le convertir en lactate, même en présence d'oxygène suffisant («effet Warburg») mais il existe une grande hétérogénéité métabolique au sein des tumeurs.

1.2 Métabolisme énergétique :

1.2.1 Généralités sur le métabolisme énergétique.

L'étude du métabolisme énergétique consiste en l'étude des voies métaboliques qui fournissent l'énergie cellulaire (ATP, adénosine triphosphate), nécessaire à la survie et à la prolifération des cellules de mammifères. Les deux voies métaboliques principales sont la phosphorylation oxydative mitochondriale (OxPhos) et la glycolyse^{40,41}. L'utilisation de l'une ou l'autre de ces deux voies dépend de la demande énergétique de la cellule (état quiescent ou prolifératif), de l'apport nutritionnel et du microenvironnement dans lequel la cellule évolue (disponibilité en oxygène, etc...) (figure 4). Dans les années 1920, le prix Nobel Otto Warburg⁴², a montré que la majorité des cellules tumorales utilisent essentiellement la voie glycolytique (figures 4 et 5) pour métaboliser le glucose en lactate, pour produire leur énergie, indépendamment de la disponibilité en oxygène. Ces vingt dernières années ont permis d'identifier les mécanismes moléculaires qui conduisent à l'utilisation majoritaire de la glycolyse par les cellules tumorales. Les oncogènes c-Myc, Ras et la délétion des suppresseurs de tumeurs comme PTEN qui activent les voies de signalisation PI3K, Akt, HIF-1 (hypoxia-inducible Factor 1), régulent positivement l'expression des enzymes de la glycolyse, ce qui favorise l'augmentation du flux glycolytique et le maintien des niveaux d'ATP

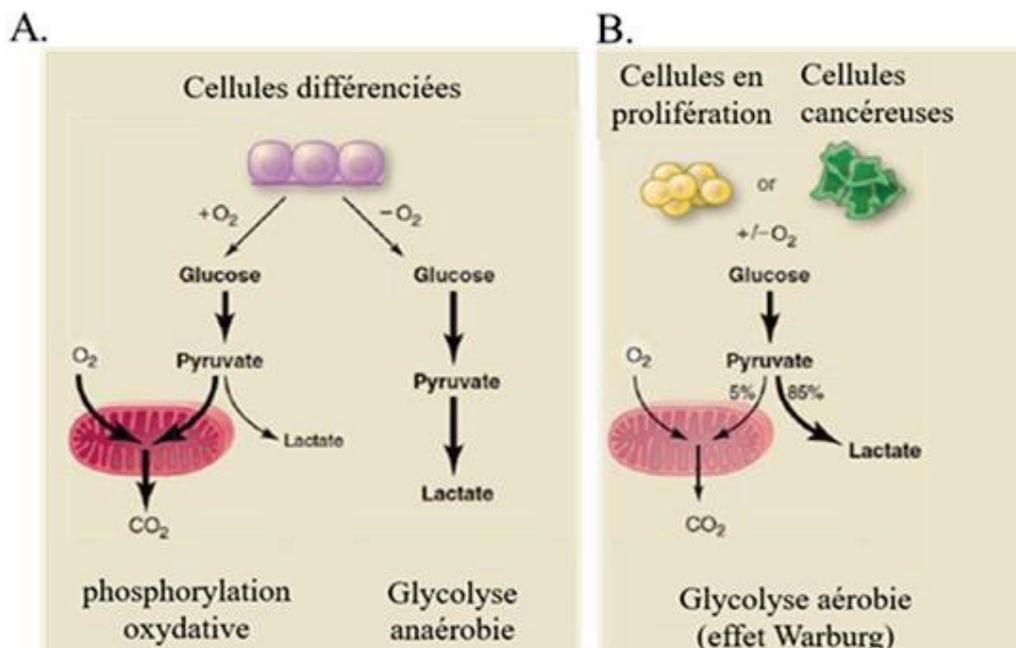


Figure 4 : Métabolisme énergétique des cellules normales et des cellules cancéreuses.

Dans une cellule différenciée, il y a deux voies de production d'énergie possible : la phosphorylation oxydative mitochondriale (OxPhos) et la voie de la glycolyse.

A. Dans le cas d'une cellule normale différenciée la glycolyse a lieu dans le cytoplasme et consomme une molécule de glucose et produit 2 molécules d'ATP. La phosphorylation oxydative se produit dans la mitochondrie utilise l'oxydation du glucose, la consommation d'oxygène et d'autres substrats pour produire 36 ATP.

B. Dans le cas des cellules normales à prolifération rapide ou des cellules tumorales en présence d'oxygène ou pas, la majorité des cellules tumorales choisissent la glycolyse aérobie (Effet Warburg) comme voie métabolique.

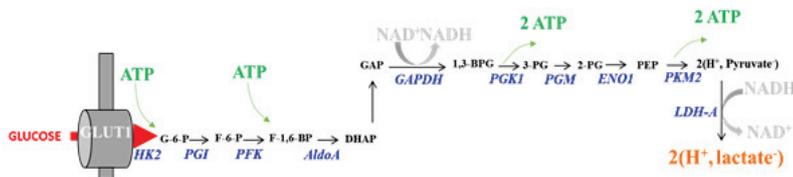


Figure 5 : Schéma simplifié de la glycolyse.

Le glucose est transporté dans la cellule par le transporteur de glucose GLUT1, où il va subir des réactions d'oxydation. Par des réactions d'oxydation du glucose qui mettent en jeu l'activité de dix enzymes glycolytiques, la glycolyse conduit à la production d'acide lactique (H^+ , lactate) et de deux ATP.

1.2.2 Métabolisme énergétique dans les hémopathies malignes B

Pour la première fois démontrée dans le contexte des lymphomes B Diffus à Grandes Cellules (LBDGC), l'identification d'empreintes métaboliques distinctes (glycolyse ou OxPhos), au sein de cette même entité tumorale a relancé le débat sur l'utilisation exclusive de la glycolyse par les cellules tumorales.^{43,44}

Depuis 2012, le nombre d'études démontrant l'existence de sous-groupes dépendants du métabolisme OxPhos n'a cessé d'augmenter (cancer du poumon, pancréas, leucémies myéloïdes aiguës et leucémies myéloïdes chroniques).⁴⁵⁻⁴⁸

Dans le contexte de la LLC il a été montré l'existence d'un changement métabolique (de la voie OxPhos à la voie glycolytique) lors d'un contact avec des cellules stromales, ce qui suggère une hétérogénéité métabolique dans la LLC induite par le microenvironnement tumoral.^{37,39}

Récemment il a été mis en évidence des caractéristiques de changement métabolique dans les cellules de LLC en co-culture avec des cellules stromales médullaires^{37,39}. Notre hypothèse de départ est que des changements métaboliques peuvent être opérés par les

cellules de LLC en contact avec des fibroblastes ganglionnaires. Face à l'importance des voies de signalisation du BCR et à la complexité des interactions cellulaires et moléculaires mises en jeu par le microenvironnement des cellules de LLC, la mise au point d'un modèle organoïde *ex-vivo* en 2D ou 3D reproduisant au mieux le microenvironnement de la niche de résistance des ganglions ou de la moelle osseuse apparaît essentielle pour identifier et valider de nouvelles cibles thérapeutiques dans des conditions se rapprochant au mieux des conditions physiopathologiques.

Nos objectifs étaient :

i/ De mettre au point une technique de co-culture *ex-vivo* de LLC en 2D et 3D pour mieux reproduire la niche tumorale des cellules B de LLC dans le ganglion.

ii/ D'étudier ce modèle de niche lymphatique en mesurant la viabilité, la prolifération, le métabolisme et la production des cytokines des cellules de LLC.

2 Matériels et Méthodes :

2.1 Patients

2.1.1 Critères d'inclusion

Il s'agit d'une étude clinique non-interventionnelle prospective ouverte monocentrique selon la loi du 9 août 2004 du code de la Santé Publique (2004 – 806). Cette étude porte sur 30 patients pour lesquels le diagnostic de LLC a été établi. Les cellules de LLC ont été obtenues à partir de prélèvements sanguins effectués sur des patients suivis en consultation régulière dans les Départements d'Hématologie et de Médecine Interne (Pr T.Cluzeau et Dr JM. Karsenti et Pr E. Rosenthal) du CHU de Nice.

Patients pour lesquels le diagnostic de LLC a été établi sur le plan cytologique et phénotypique (score de Matutes),

- Patients de plus de 18 ans,
- Patients ayant signé le formulaire de non opposition, (annexe N°4)
- Patients bénéficiant d'un régime de sécurité sociale,
- Patients non traités, pour lesquels certains des paramètres clinico-biologiques (bilan phénotypique, caryotype, facteurs pronostiques comme l'expression de CD38 et de ZAP, statut mutationnel) sont connus et pour lesquels un bilan biologique sanguin est prescrit dans le cadre du suivi normal de leur maladie.

2.1.2 Critères de non inclusion :

- Patients présentant une autre maladie hématologique susceptible d'interférer avec la LLC.
- Femme enceinte et population de malade vulnérable
- Patient sous curatelle

Considérant la complexité des expériences de co-culture, nous estimons que des résultats reproductibles sur les cellules de 30 patients permettront de mettre en évidence des différences significatives dans l'activation des voies intracellulaires de signalisation des cellules leucémiques et des cellules stromales. Nous avons déterminé le seuil de significativité au risque alpha de 5%.

2.2 Sources cellulaires

Les cellules leucémiques proviennent de prélèvements effectués auprès de patients suivis dans le département d'Hématologie et de Médecine Interne du CHU de Nice, après consentement éclairé, dans le cadre d'un protocole approuvé par le CCTIRS et la CNIL (Annexe 4). A partir

des prélèvements sanguins, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) sont isolées par gradient de densité (technique Ficoll-Hypaque) et congelées dans un mélange 90% SVF 10% DMSO à -150°C. A partir de sources commerciales, nous avons obtenu une lignée de fibroblastes médullaires HS5 (ATCC) et des fibroblastes primaires normaux de ganglion humain ou HLF (Human Lymphatic Fibroblasts, ScienceCell).

2.3 Techniques de culture cellulaire

Les cellules leucémiques sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Gibco) complété avec 10% de SVF, 1% de Pyruvate de Sodium et 1% de Pénicilline/Streptomycine. Les fibroblastes (HS5 et HLF) sont cultivés en milieu DMEM (Gibco) complété avec 10% de SVF et 1% de Pénicilline/Streptomycine.

Co-culture directe : Les fibroblastes sontensemencés à 10^5 cellules/ puits en plaque 24 puits dans 1mL de milieu spécifique, 24h plus tard, les cellules leucémiques sont déposées à 4.10^6 cellules/ puits dans 1mL de RPMI, pour un volume total de 2ml. La co-culture est maintenue pendant 48h. Les cellules leucémiques cultivées seules en contrôle sont dans un milieu constitué à 50% de RPMI et à 50% du milieu spécifique soit des fibroblastes (DMEM).

Stimulation des cellules de LLC : Les cellules de LLC ont été stimulés à J0 de co-culture avec du CpG ODN (ODN 2006, Invivogen) à 1,5µg/ml et de l'IL2 (Miltenyi Biotech) à 50ng/ml.

2.4 Microscopie

Microscopie optique

Les cultures cellulaires sont observées et photographiées avec un microscope digital à transmission EVOS (AMG).

Le microscope à champ large était un support inversé DMI6000 (Leica, Allemagne), utilisant les objectifs 20X NA sec 0,4 ou 40X NA sec 0,75. Les cubes utilisés étaient GFP (BP 470/40, 500, BP 525/50) et RFP (BP 546/12, 560, BP605 / 75). Les acquisitions ont été effectuées avec une caméra DFC360 FX (Leica, Allemagne).

2.5 Cytométrie en flux

2.5.1 Marquages intracellulaires

Pour réaliser les marquages cellulaires, un aliquot de 150µl de cellules en co-culture correspondant à 50000 cellules est marqué par un mélange d'anticorps de surface : CD45- V

500, CD20-V450, CD19-APCH7, CD3-APC, CD5-PC7 (BD Biosciences) incubés pendant 15 min dans le noir à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées avec 3mL de de cellwash (BD Sciences) fixées (kit Dako Intrastain, réactif A) puis perméabilisées (kit Dako Intrastain, réactif B)

On incube ensuite les cellules avec les anticorps dirigés contre les molécules intracellulaires Bcl2 et Ki-67 couplées respectivement au FITC et à la PE-cy5 et leurs contrôles isotypiques pendant 15 minutes puis lavées. L'analyse est effectuée sur un cytomètre FACSCanto II (BD BioSciences).

2.5.2 Viabilité cellulaire

Après 48h de co-culture, les cellules leucémiques sont récupérées, centrifugées puis lavées en Phosphate Buffered Saline (PBS). La mort cellulaire est évaluée par le Kit Annexin-V FITC PI (BD Pharmingen) (figure 6). L'analyse est effectuée sur un cytomètre FACS Canto II.

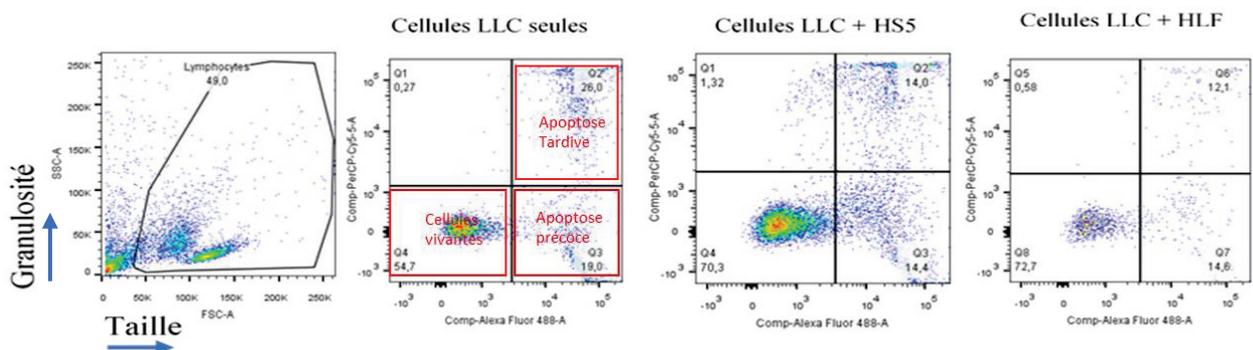


Figure n°6 : Technique de fenêtrage en cytométrie de flux : Stratégie de fenêtrage en cytométrie de flux (Facs BD Canto) pour l'analyse de la survie des cellules de LLC en Annexin/Pi.

2.6 Immunohistochimie

Pour étudier la distribution cellulaire au sein des sphéroïdes nous avons réalisés des coupes de (4 µm) de sphéroïdes inclus en paraffine puis colorées à l'HES. Ces coupes ont été traitées pour déparaffinisation, réhydratation et récupération d'antigène à l'aide de procédures standard (réactifs EnVision FLEX, Agilent, Dako). Nous avons ensuite réalisé des marquages avec un anticorps dirigé contre le KI67 (M3641, Agilent, Dako). L'analyse anatomopathologique a été réalisée par le Dr Lanteri au laboratoire d'Anatomo-Pathologie, Pr Michiels, CHU de Nice.

2.7 Western-Blot

Les cellules leucémiques sont centrifugées puis lysées dans un tampon RIPA (Tris 1M, NaCl 5M, Na déoxycholate 10%, Triton 10%, SDS 20%, inhibiteurs de phosphatases : Orthovanadate 1mM, NaF 5mM et NaPPI 20mM, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche)). Après une centrifugation de 15 minutes à 14 000 rpm à 4°C, les protéines sont récupérées et dosées par la méthode colorimétrique de Bradford. 30 à 50µg de protéines sont additionnées de tampon de reprise Laemmli (Na₂HPO₄ 40mM – SDS 3% – Glycérol 10% – Bleu de Bromophénol 0,01% – β-mercaptoéthanol 5%) puis dénaturées 5min à 95°C. Les protéines sont séparées sur gel de polyacrylamide (électrophorèse SDS-PAGE) puis transférées sur une membrane de PVDF (Millipore). La membrane est colorée au rouge Ponceau, découpée puis incubée 1h à température ambiante dans une solution saturante (Tris 10mM pH=7,4 – NaCl 150mM – EDTA 1mM – Tween 20 0,1% – BSA 3% – Gélatine 0,5%). Elle est ensuite incubée une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire. Après 3 lavages en tampon de lavage (Tris 10mM pH=7,6 – NaCl 150mM – Triton X-100 1%), la membrane est incubée 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la molécule HRP. Après 3 lavages, les protéines d'intérêt sont révélées par chimioluminescence (Enhanced ChemiLuminescence, Amersham).

2.8 Etude des cytokines

La mesure des cytokines produites dans les co-cultures des cellules de LLC et fibroblastes a été mesurée avec le Kit ProcartaPlex Multiplex Immunoassay (Thermo Fisher Scientific) : IL-1α, d'IL-1β, d'IL-6, de TNF-α et de GM-CSF. Un total de 50 µl de co-culture dans des conditions de culture différentes et chez deux patients différents a été analysé conformément aux instructions du fabricant. La concentration de chaque analyte a été obtenue en interpolant l'intensité de fluorescence sur une courbe standard de dilution à 7 points fournie par le fabricant.

2.9 Analyse des métabolites

Les cellules de LLC ont été cultivées seules ou en co-culture avec des fibroblastes HS5 ou HLF dans des conditions stimulées (CpG ODN+ IL2) dans 12 puits. Le milieu a été recueilli à partir des cellules après 48 heures de culture.

Les échantillons de milieu ont été analysés sur un analyseur biochimique de glucose et de lactate YSI 2900 (YSI 2950 Biochemistry Analyzer) (Yellow Springs Instruments). Les résultats ont été normalisés avec le nombre de cellules estimé par analyse facs. Des étalons de glucose et de lactate ont été analysés tous les cinq échantillons pour garantir l'étalonnage et la précision des instruments.

2.10 Test ATP

Pour évaluer d'où provient l'énergie des cellules de LLC, nous avons réalisé un test ATP mis au point par l'équipe du Dr Ricci ⁴⁹ (Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, INSERM U1065, Nice). Le principe repose sur les capacités de l'enzyme luciférase à convertir un composé appelé la luciférine en oxyluciferin, produit de lumière ou « luminescence » mesurable par un luminomètre. L'ATP a été mesurée en utilisant le kit Cell Titer Glo (Promega). Deux cent mille cellules ont été remises en suspension dans 80 µl de RPMI puis réparties dans une plaque de 96 puits. Les cellules ont ensuite été traitées en triplicates pendant une heure avec du PBS (témoin) ou de l'iodoacétate de sodium (I9148, Sigma-Aldrich) (100 µM) pour inhiber la glycolyse, ou une combinaison d'iodoacétate (100 µM) et d'oligomycine A (O4876, Sigma-Aldrich) (10 µg/ml) pour obtenir la quantité résiduelle d'ATP, chaque point a été réalisé en triplicate (figure 7). Un traitement de courte durée (1h) a été choisi pour éviter un changement métabolique lors de l'inhibition de la glycolyse et pour éviter la mort cellulaire lors de l'inhibition des deux voies métaboliques. Cent µl de mélange du réactif Glo du Kit Cell Titer ont ensuite été ajoutés à chaque puits pour un volume final de 200 µl. Les plaques ont été analysées pour la luminescence avec un Luminoscan (Berthold Technologies). Nous avons vérifié que les mesures d'ATP étaient dans la gamme linéaire de la détection. La différence entre la production totale d'ATP et l'ATP produit sous oligomycine permet d'estimer le pourcentage d'ATP Oxphos par rapport à la production totale d'ATP totale. L'ATP produit par la voie de la phosphorylation oxydative est représenté par le pourcentage d'ATP total produit par les cellules.

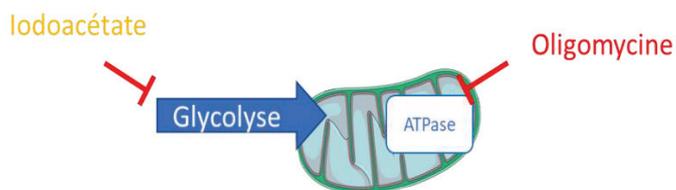


Figure n°7 : Les inhibiteurs métaboliques : *L'iodoacétate est un inhibiteur de la glycolyse et l'oligomycine inhibe l'ATPase*

2.11 PCR

Les ARN cellulaires sont purifiés à l'aide d'un kit d'extraction d'ARN (miRNeasy Mini Kit) selon les instructions du fournisseur (Qiagen). La concentration et la pureté des échantillons sont analysées au spectrophotomètre Nanodrop à 260 et 280nm. Les ARN sont rétrotranscrits à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Ambion®, Life Technologies). Des couples d'amorces spécifiques sont utilisés pour l'amplification PCR

analysée en temps réel par l'appareil StepOne (Applied Biosystems). Les résultats sont normalisés avec des gènes de ménage (*HPRT...*).

2.12 Analyse statistique

Les variables quantitatives sont exprimées par leur médiane (minimum - maximum) et les variables qualitatives par leurs fréquences absolue et relative (%). Pour comparer les mêmes cellules soumises à des conditions différentes d'expérience, le test des rangs signés de Wilcoxon a été utilisé. Pour comparer les patients selon leur statut génétique ou leurs caractéristiques démographiques, le test non paramétrique de Mann et Whitney et le test exact de Fisher étaient choisis en fonction du type de données. Le seuil de significativité était défini au risque alpha de 5%. L'analyse statistique a été réalisée avec Prism (version 6, GraphPad software - San Diego, CA, USA) et EasyMedStat (www.easymedstat.com – Neuilly-sur-Seine, France).

3 Résultats

3.1 Caractéristiques des patients

Nous avons inclus dans cette étude 30 patients dont les caractéristiques clinico-biologiques sont résumées dans le tableau 2. Nous avons répertorié pour chacun des patients leur âge, leur sexe, la date du diagnostic et celle du prélèvement, le score de Matutes, le stade de Binet, la lymphocytose au diagnostic ainsi que la cytogénétique.

Tableau 2 : Caractéristique des patients :

Numéro	Sexe	DDN	Age	DD	Réception	Matutes	Binet	Lymphocytose	CD38	ZAP70	Cytogénétique
1	H	26/05/1953	65	13/02/2004	20/03/2019	5	A	22000	NC	NC	Del 11q, Tri 12
2	F	22/04/1936	83	06/02/2019	12/02/2019	5	C	311000	NC	NC	NC
3	F	25/12/1944	74	30/09/2013	15/04/2019	5	A	7100	NC	NC	Tri 12
4	H	05/09/1935	83	24/11/2016	17/12/2018	5	A	12000	NC	NC	NC
5	F	21/06/1930	88	02/03/2005	20/12/2018	5	A	50000	Neg	Pos	monosomie X
6	H	28/05/1951	68	28/12/2018	20/12/2018	5	A	66000	NC	NC	monosomie 5 et 7
7	H	16/11/1944	74	12/10/2015	17/12/2019	5	A	9500	NC	NC	Del 11q
8	H	24/10/1937	81	02/05/2013	09/05/2019	5	A	23000	NC	NC	NC
9	F	23/06/1940	78	01/08/2011	10/05/2019	5	A	8704	NC	NC	Del 13q
10	H	11/03/1962	57	20/05/2019	20/05/2019	5	A	5300	NC	NC	Normal
11	F	18/02/1947	72	21/05/2019	21/05/2019	5	A	7820	Neg	Neg	Tri 12
12	F	01/02/1927	92	16/05/2019	03/06/2019	5	A	66000	NC	NC	Tri 12
13	H	30/08/1941	77	13/12/2010	03/06/2019	5	B	4200	NC	NC	NC
14	H	17/02/1940	79	12/06/2012	12/06/2019	5	A	18600	NC	NC	Normal
15	F	16/05/1945	74	04/08/2011	17/06/2019	5	A	11500	Neg	Neg	Normal
16	F	01/09/1936	82	16/06/2019	22/07/2019	5	A	7400	NC	NC	Normal
17	H	21/06/1944	75	11/01/2006	25/06/2019	5	A	10200	Neg	Neg	NC
18	F	11/09/1937	81	27/11/2015	25/06/2019	5	A	13400	NC	NC	Del13q
19	H	17/05/1930	89	07/08/2010	25/06/2019	4	A	500	Neg	Neg	Del 13q
20	F	04/05/1944	75	16/05/2012	16/07/2019	4	B	11200	Pos	Neg	Del 17p,delf6q
21	H	16/12/1956	62	26/01/2011	16/07/2019	5	A	6900	Neg	Neg	NC
22	H	05/07/1941	78	29/09/2010	18/07/2019	5	A	17800	Neg	Neg	t(14,18)
23	H	13/01/1946	73	23/07/2019	23/07/2019	5	A	25000	NC	NC	NC
24	H	01/09/1942	76	12/01/2016	25/07/2019	5	A	100940	NC	NC	Tri 12
25	F	01/03/1942	77	23/05/2019	29/07/2019	5	A	65000	NC	NC	Del 13q
26	H	13/02/1955	64	30/07/2019	30/07/2019	5	A	5000	NC	NC	Normal
27	F	13/06/1950	69	15/04/2019	05/08/2019	5	A	19000	NC	NC	NC
28	H	30/04/1948	71	08/11/2016	06/08/2019	4	A	6700	NC	NC	Normal
29	H	14/10/1936	82	21/08/2015	14/08/2019	5	A	9950	NC	NC	Normal
30	H	02/01/1950	69	13/08/2019	14/08/2019	5	A	30600	NC	NC	NC

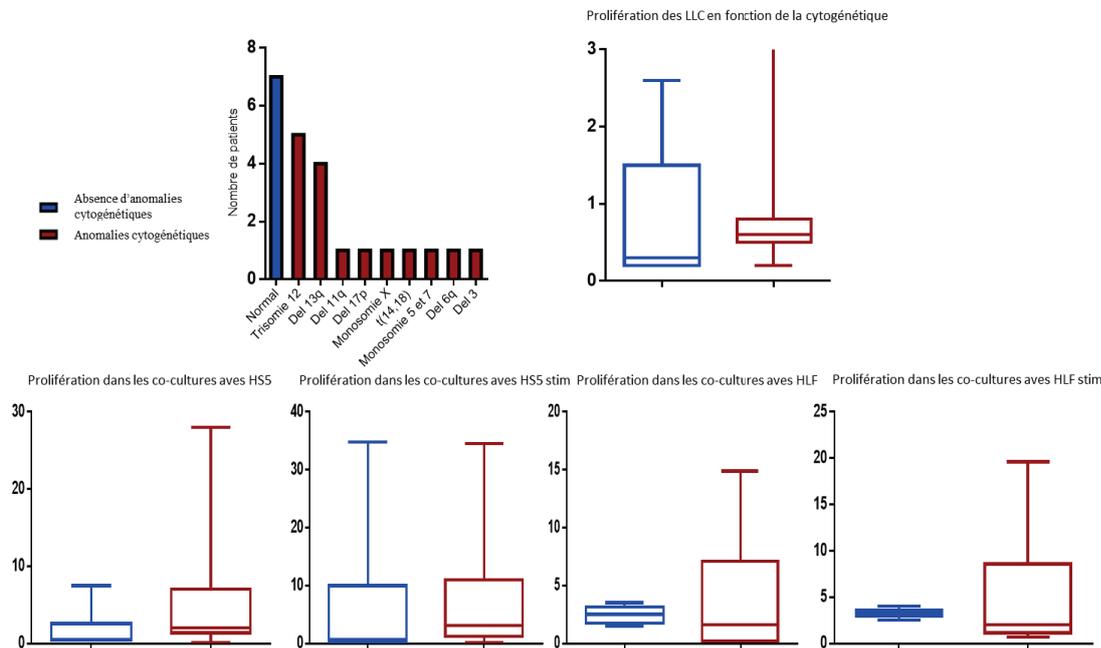


Tableau 2 : L'âge médian au diagnostic était de 71 ans (51-92), et étudiés à l'âge de 76 ans (57-92). Le délai de développement de la maladie était de 3,8 ans (0-15 ans). Les patients avaient un score de Matutes moyen évalué à 4,90 avec IC 95% (4,786-5,014). 27/30 patients (90%) avaient un stade de Binet A, 2/30 (7%) Binet B, 1/30 (3%) Binet C au diagnostic. Huit patients ont eu une évaluation du statut CD38/ Zap 70 avec 1/8 Zap 70+ et 1/8 CD38+. Vingt-et-un patients avaient un statut cytogénétique identifié. Sept (33%) ne présentaient pas d'anomalie génétique et 14 (67%) en présentaient au moins une, incluant : trisomie 12 (n=5/21), délétion 13q (n=4/21), délétion 11q (n=2/21) et délétion 17p (n=1/21), dont un patient présentant une double anomalie trisomie 12 et délétion 11q. Les autres anomalies cytogénétiques n'étaient pas caractéristiques de la LLC : monosomie X (n=1), monosomies 5 et 7 (n=1), translocation 14/18 (n=1), délétion 6q (n=1), délétion 3 (n=1).

3.2 Anomalies cytogénétiques et index de prolifération

Nous avons recherché l'effet des anomalies cytogénétiques sur la viabilité et la prolifération des cellules de LLC en co-culture avec des fibroblastes HS5 ou HLF avec ou sans stimulation.

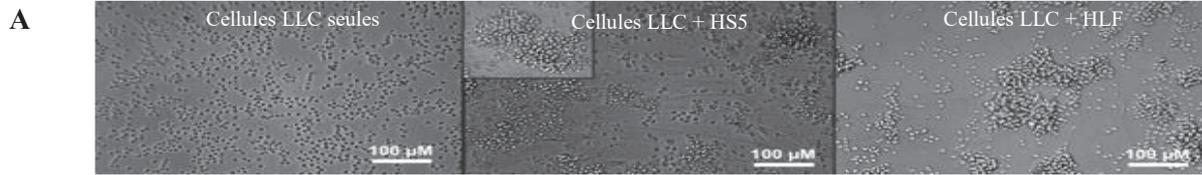
Les patients avec des anomalies cytogénétiques (n=14) avaient un index de prolifération (Ki67) plus élevé comparé au groupe sans anomalies cytogénétiques (n=7) (médiane = 0,6

versus 0,3). Nous avons obtenu des résultats non significatifs sur le plan statistique compte tenu du faible nombre de patients testés. L'index de prolifération était plus élevé dans le groupe avec anomalies cytogénétiques aussi bien avec une co-culture par HS5 à 48h (médiane = 1,7 versus 0,5), qu'une stimulation par CpG ODN IL2 (médiane =3,1 versus 0,3). En revanche pour la co-culture avec HLF l'index de prolifération à 48h était plus élevé dans le groupe sans anomalies cytogénétiques (médiane=2,25 versus 1,3) $p>0,05$ Test de Mann Whitney. La stimulation des cellules de LLC avec la co-culture HLF augmente aussi l'index de prolifération à 48h pour le groupe sans anomalies cytogénétiques (médiane=3,2 versus 2,2) $p>0,05$ Test de Mann Whitney. Dans le groupe avec anomalies cytogénétiques il y'avait des hyperlymphocytoses bien plus élevées que dans le groupe sans anomalies cytogénétiques (médiane=15600 vs 7400), et avec une proportion plus importante de femme (57,1 versus 42,9) $p=0,3$ test de Fisher.

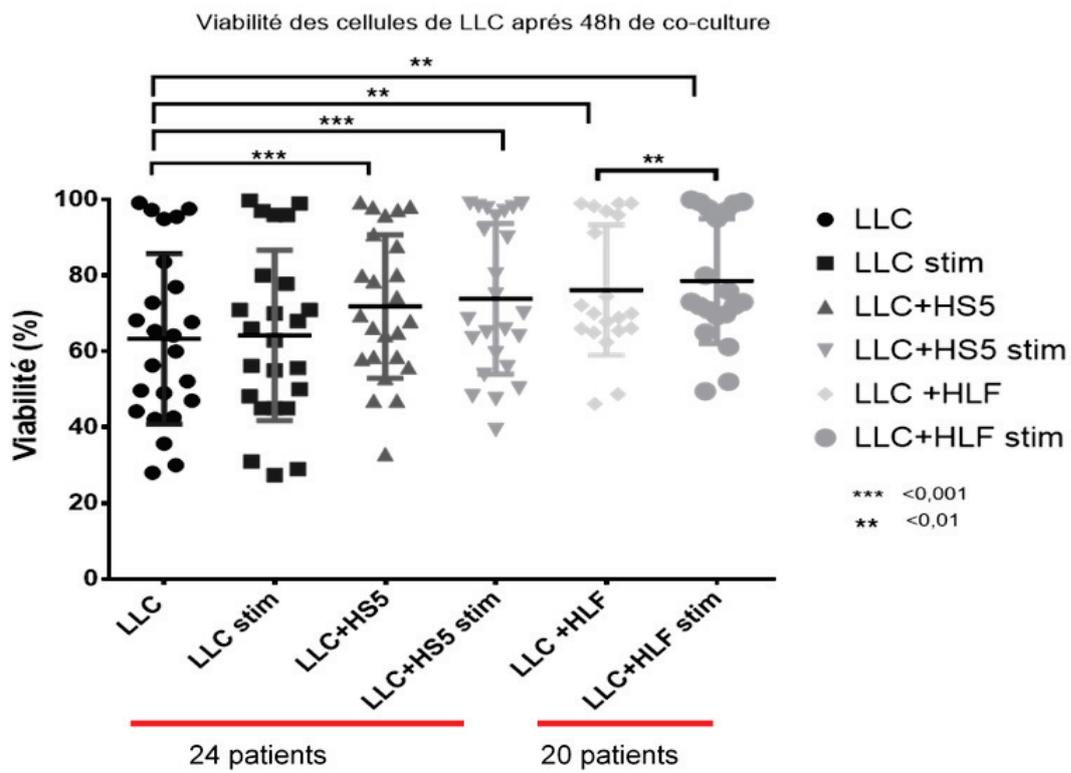
3.3 Co-culture des cellules de LLC avec des fibroblastes médullaires (HS5) et ganglionnaires (HLF) : mesure de la viabilité, de la prolifération et de la sécrétion des cytokines

Nous avons dans un premier temps mis en place un système de co-culture de LLC avec des fibroblastes HS5 qui est connu pour augmenter la viabilité des cellules de LLC. Puis dans un second temps nous avons étudié l'influence des fibroblastes ganglionnaire et médullaire avec et sans stimulation sur la viabilité et la prolifération des cellules de LLC ainsi que la production de cytokines.

3.3.1 Figure N°8 : La co-culture HLF+LLC augmente la viabilité la prolifération et la production des cytokines inflammatoires.



B



E Sécrétion des cytokines après 48h de co-culture dans la niche lymphatique

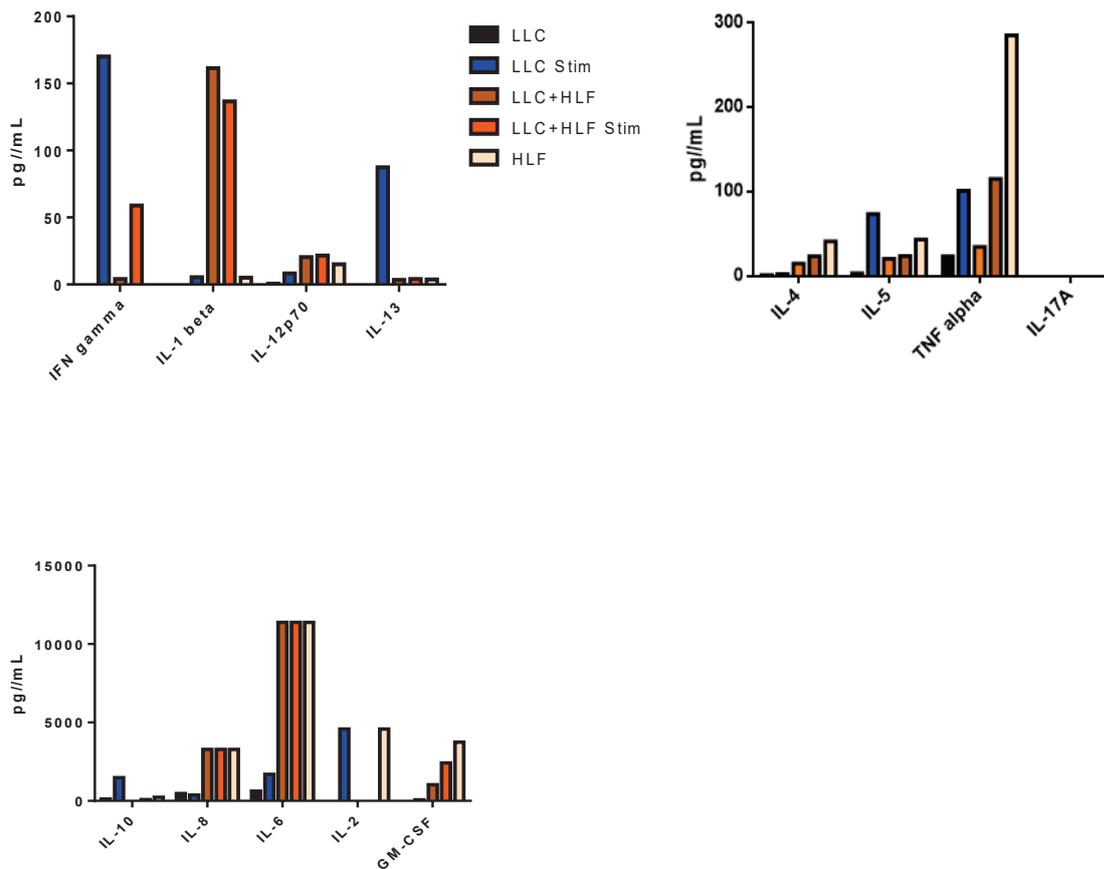


Figure n°8 : A- Les cellules de LLC en co-culture à 48h avec HS5 et HLF ont une tendance à se regrouper entres-elles. B- La viabilité des cellules de LLC est augmentée de manière significative entre LLC et LLC+HLF : $p = 0,0055$ entre LLC et LLC HLF stim $p=0,0017$, entre HLF et HLF stim avec une $p=0,0072$, entre LLC et HS5 : $p = 0,0006$ et entre LLC et LLC+ HS5 stim $p=0,0003$, LLC. C- La prolifération est augmentée de manière significative entre LLC et LLC+HLF $p=0,0181$, LLC et LLC + HLF stim $p=0,0017$ LLC+HLF et LLC+HLF stim $p=0,0008$. D- Mesure des cytokines en pg/mL dans les conditions de co-culture avec HS5 (niche médullaire) par la technique de microbeads procartaplex. La co-culture avec HS5 entraine une augmentation de la production de IL1 β , TNF α et de GMCSF. La stimulation des cellules de LLC entraine une augmentation de la sécrétion des cytokines d'IFN γ , IL1 β , TNF α . E-Mesure des cytokines en pg/mL dans les conditions de co-culture avec HLF par la technique de microbeads procartaplex. La co-culture avec HLF entraine une augmentation de la production de IL1 β , TNF α , GMCSF et IL6. La stimulation des cellules de LLC avec HLF entraine une augmentation de la sécrétion des cytokines d'IFN γ , IL1 β , TNF α , IL6, IL8, GMCSF.

3.4 Co-culture en 2D

Nous avons observé au microscope les co-cultures de LLC avec des fibroblastes médullaires HS5 et ganglionnaires HLF.

3.4.1 Figure N°9: Mise au point d'une technique en 2D de co-culture de LLC + fibroblastes

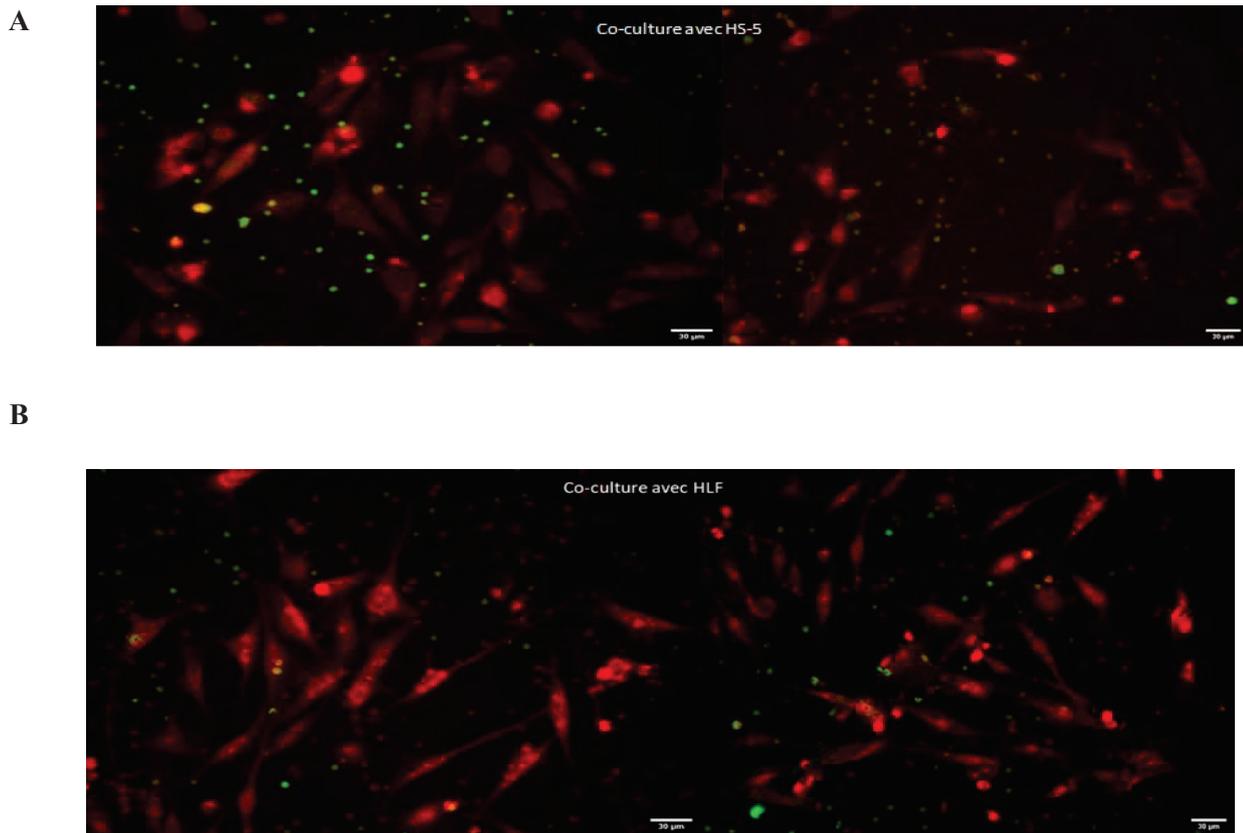


Figure n°9: A-Analyse en microscopie de la co-culture 2D avec des fibroblastes HS5 et stimulation des cellules de LLC par la combinaison CpG ODN + IL2. Cette co-culture a pour but de reproduire la niche médullaire. On observe que les cellules de LLC se trouvent essentiellement en périphérie des fibroblastes. B- Contrairement à l'image précédente les cellules de LLC en co-culture avec les fibroblastes HLF se trouvent principalement dans les fibroblastes donnant un aspect de fibroblastes « granuleux ». Résultats observés sur une dizaine de champs.

3.5 Co-culture en 3D : Formation du sphéroïde de LLC en co-culture avec des fibroblastes :

Nous avons formé des sphéroïdes à partir du système de co-culture en 2D à l'aide de collagène et d'agarose. Les sphéroïdes ont ensuite été analysés dans le service d'anatomopathologie avec une coloration HES et en immunohistochimie avec un marqueur caractéristique de l'entrée dans le cycle cellulaire (KI67).

3.5.1 Figure n°10 : Formation du sphéroïde de LLC et analyse en IHC

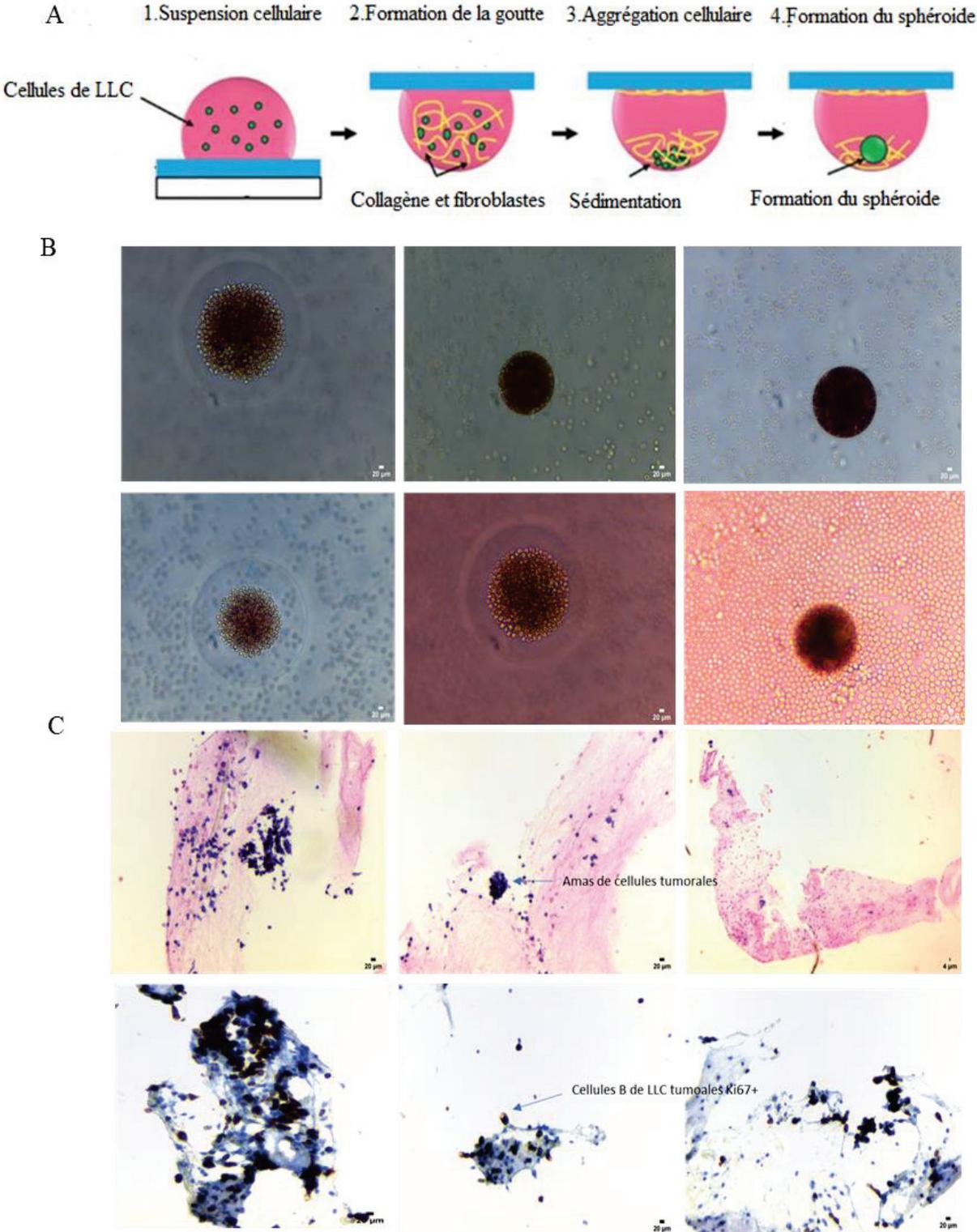


Figure n°10 : A-Schématisation de la technique de formation du sphéroïde : On dépose 20 μ L de 50000 cellules de LLC dans du RPMI dans un diamètre 100, formation du sphéroïde dans un délai de 1 à 3 jours. On dépose ensuite le sphéroïde dans un milieu contenant 100 μ L de collagène du milieu MEM et $1 \cdot 10^5$ de fibroblastes (HS5 ou HLF). B-A J1 on observera la formation des sphéroïdes d'environ 300 microns de densité différentes avec HS5 (rangée du haut) et HLF (rangée du bas). Aucun sphéroïde n'est obtenu dans un milieu ne contenant pas de fibroblastes. C- Coloration du sphéroïde en HES avec visualisation des sphéroïdes en coupes transversales (rangée du haut) et marquage en immunohistochimie avec KI67 positive à 90% (rangée du bas).

3.6 Activation des voies de signalisation et des protéines anti apoptotiques dans les cellules de LLC en co-culture avec les fibroblastes ganglionnaires HLF (contrôle HS5)

Nous avons ensuite comparé la production des voies de signalisation et des protéines anti-apoptotiques dans systèmes de co-culture avec HS5 et HLF

3.6.1 Figure n°11 : La niche lymphatique augmente les voies de signalisation et active NFkB qui augmente la production des protéines anti-apoptotiques

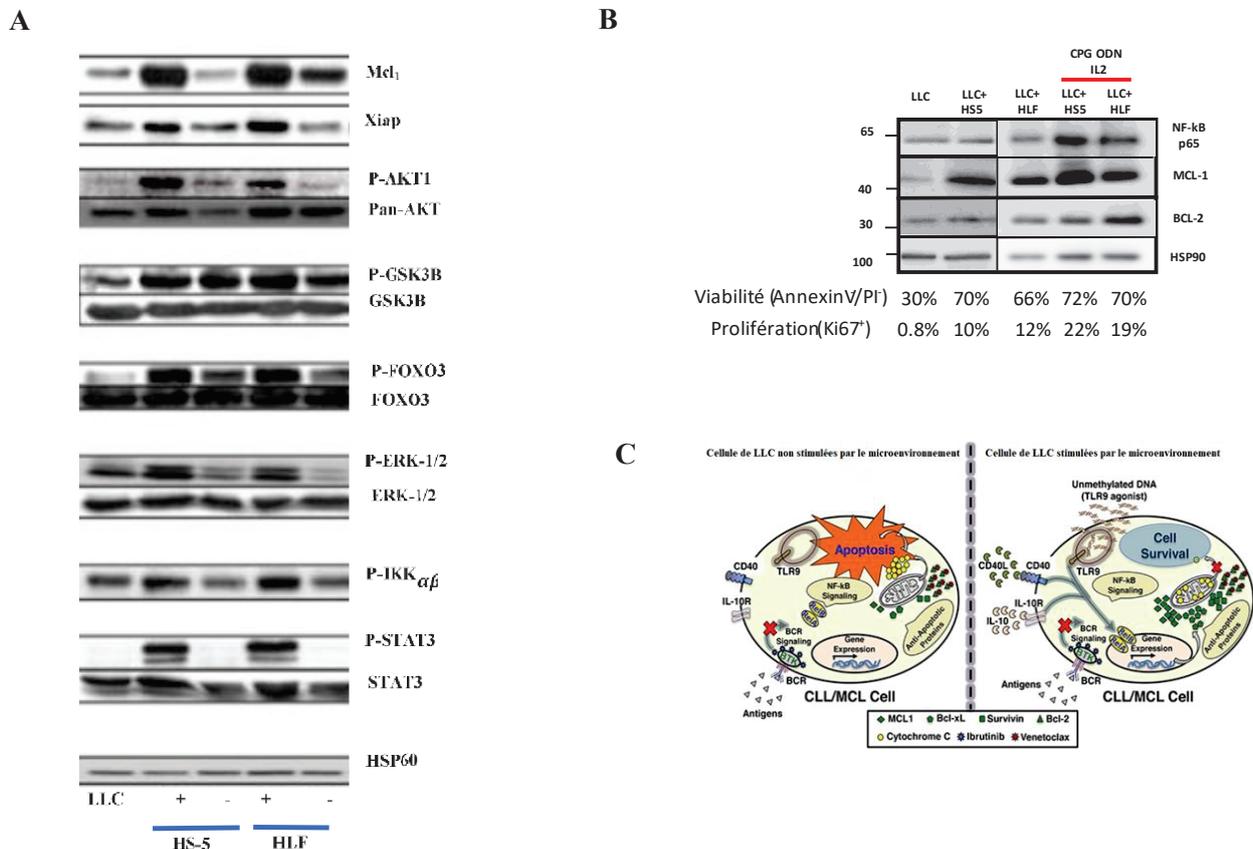


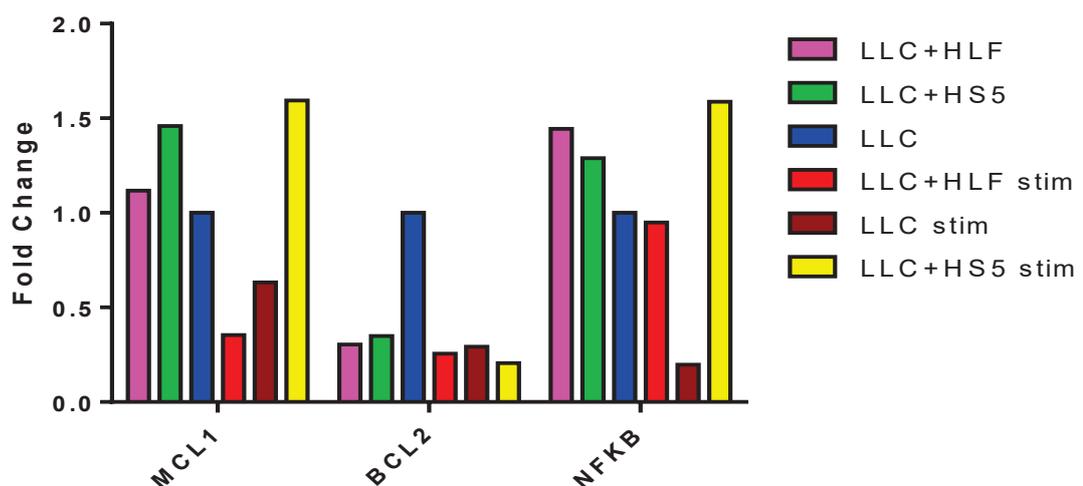
Figure n°11 : A- Activation des voies de signalisations dans la cellule LLC induite par la co-culture avec des fibroblastes ganglionnaires HLF (fibroblastes ganglionnaires HLF ou médullaires HS5). Les voies de signalisations activées sont ERK, AKT, NFKB et STAT3. B- Les cellules de LLC co-cultivées avec des fibroblastes augmentent la production de NFKB qui induit l'augmentation des protéines anti-apoptotiques : MCL1, BCL2. Quand ces co-cultures sont en plus stimulées par du CpG ODN + IL2 on observe une surproduction de ces protéines anti-apoptotiques avec *in fine* activation de la voie NFKB qui induit une augmentation de la viabilité et de la prolifération. C- Schématisation de l'effet anti-apoptotique des cellules du microenvironnement et de l'activation du BCR sur les cellules de LLC qui entraîne une perte de la cytotoxicité des traitements.

3.7 Différences d'expression géniques dans les cellules de LLC seules et en co-culture

Nous avons comparé les différences d'expression de *MCL1*, *BCL2* et *NFKB* dans les différents systèmes de co-culture

3.7.1 **Figure N°12** : Différences d'expression de *BCL2*, *MCL1*, *NFKB* dans les cellules de LLC après 48h de co-culture et de stimulation, chez deux patients différents en stade A de LLC.

A Expression des gènes : *MCL1*, *BCL2* et *NFKB*



B Expression des gènes : *MCL1*, *BCL2* et *NFKB*

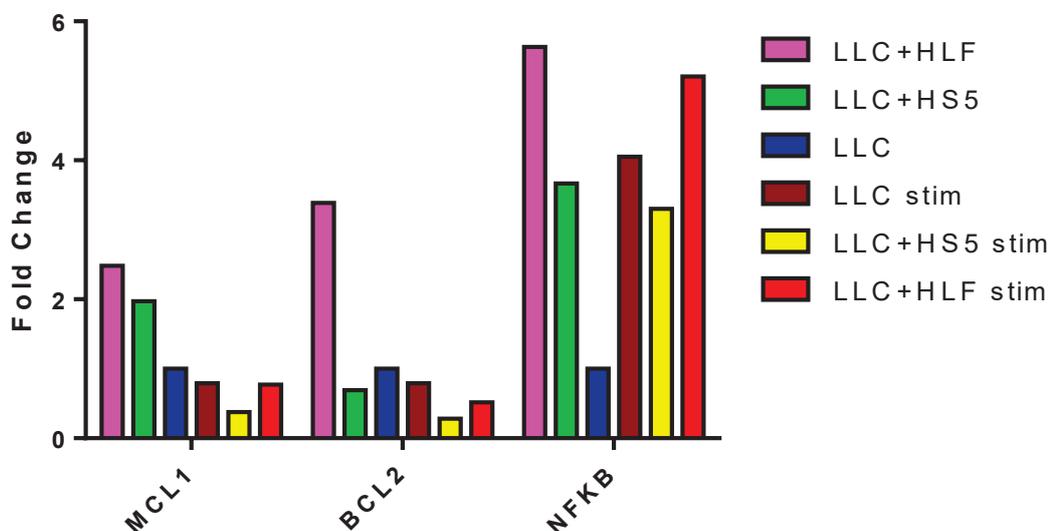


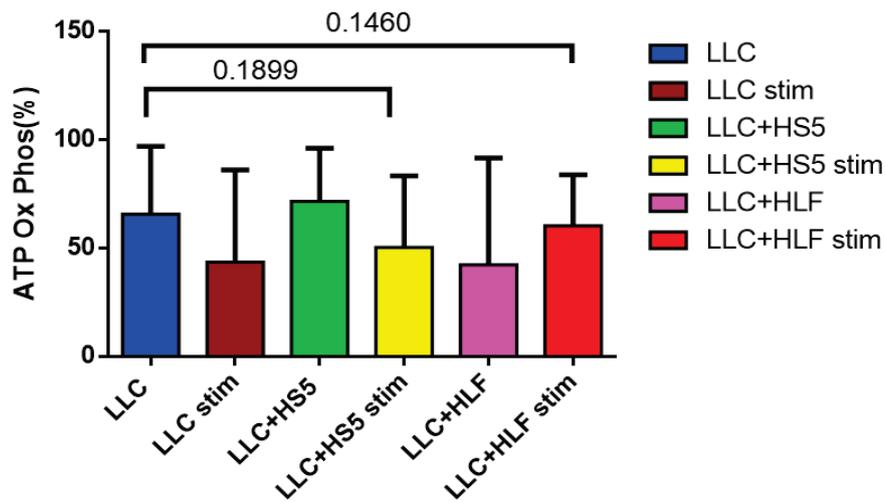
Figure n°12 : A-Pour le patient#1 : L'expression de *MCL1* est augmentée dans les conditions de co-culture avec HS5, HLF et LLC+HS5 stimulé, tandis que *BCL2* est diminuée. L'expression de *NFKB* est augmentée en condition de co-culture avec HS5, HLF et LLC+HS5 stimulé. B-Pour le patient#2 : L'expression de *MCL1* est augmentée dans les conditions de co-culture HS5 et HLF, l'expression de *BCL2* est augmentée en condition de co-culture avec HLF. Et *NFKB* est augmentée dans toutes les conditions par rapport à la condition de LLC seule

3.8 Profils métaboliques des cellules de LLC seules et en co-culture

Nous avons étudié le métabolisme énergétique des cellules de LLC dans les différentes conditions de co-culture stimulées ou non, ainsi que le niveau de production des métabolites (glucose, lactate).

3.8.1 Figure N°13 : Adaptation métabolique des cellules de LLC en co-culture avec HLF (contrôle HS5) chez 5 patients différents (en stade A)

A Mesure de l'ATP Ox-phos après 48h de co-culture



B

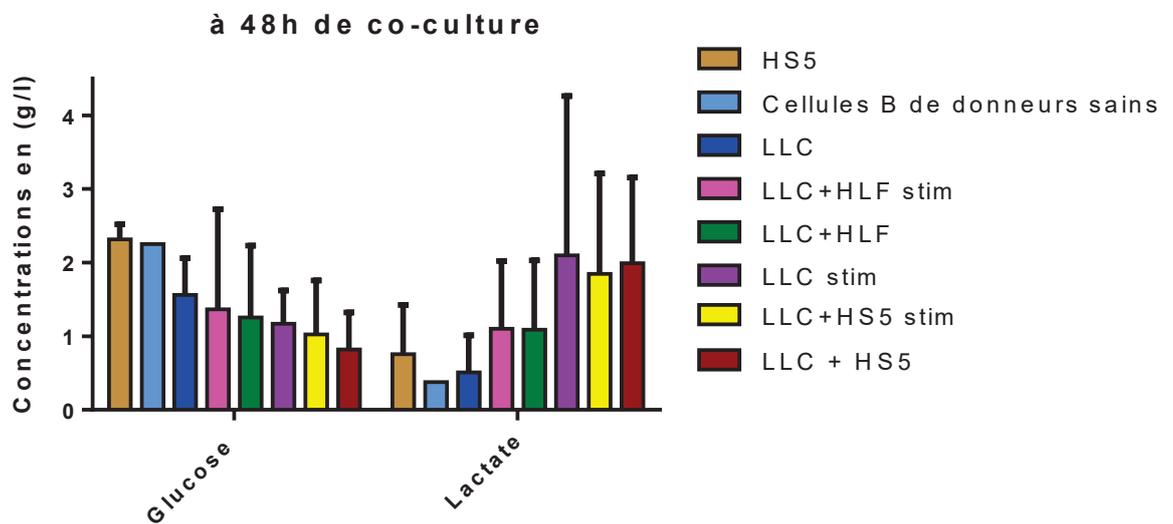


Figure n°13 : A- Ce graphique représente le pourcentage d'ATP issue de la phosphorylation oxydative dans le métabolisme des LLC dans différentes conditions chez 5 patients différents : A l'état normal la cellule de LLC utilise principalement de l'ATP issu de la phosphorylation oxydative. Lorsqu'elle est co-cultivée avec des fibroblastes médullaires (HS-5) la cellule de LLC a une tendance à augmenter l'apport d'ATP issue de la voie oxydative. La co-culture avec HLF semble utiliser un pourcentage de contribution d'ATP Oxphos plus bas. Les stimulations permettent à la cellule de LLC d'être plus glycolytiques excepté pour la co-culture avec HLF (tendances non significatives)

B- La cellule de LLC en culture seule consomme peu de glucose et produit peu de lactate. En présence de HS5 elles consomment deux fois plus de glucose et produisent deux fois plus de lactate. La co-culture avec HLF reproduit ce phénomène mais avec un effet atténué. Les stimulations des cellules de LLC en co-culture semblent augmenter la consommation de glucose et la production de lactate.

4 Discussion

De manière générale les cellules tumorales utilisent et détournent le microenvironnement qui les entourent pour assurer leur survie et leur prolifération³⁷. De même, pour se développer dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires, les cellules de LLC créent des niches propices à leur survie et à leur développement. La cellule de LLC quiescente dans le sang et bloquée en phase G0⁵⁰ meurt rapidement dès lors qu'elle est cultivée *in vitro*. On décrit ainsi trois niches tumorales : la niche vasculaire (sang), la niche médullaire (moelle osseuse) et la niche lymphatique (ganglion lymphatique).

Le microenvironnement des ganglions lymphatiques est situé dans une matrice extracellulaire à structure spatiale produite par des fibroblastes et une matrice stromale de cellules dendritiques et réticulaires folliculaires permettant la migration des cellules B, T et dendritiques^{51,52}. Cette structure permet un processus de migration dynamique facilitant la communication entre les cellules B et les zones d'activation des cellules T lors de réponses immunitaires acquises⁵³. Deux régions principales peuvent être distinguées histologiquement dans les ganglions lymphatiques : le cortex et la médullaire. Le cortex est divisé en deux parties : le paracortex (zone des cellules T) et la zone plus superficielle des cellules B, constituée de follicules primaires et de centres germinaux (après la rencontre d'un antigène). Les follicules des cellules B sont le site principal des réponses humorales, alors que le paracortex est le site où les lymphocytes circulants pénètrent dans les ganglions lymphatiques et où les cellules T interagissent avec les cellules dendritiques. Dans les cordons paracorticaux périphériques des ganglions lymphatiques se trouvent des régions enrichies en lymphocytes T qui sont frontalières avec des lymphocytes B et délimitées par des sinus lymphatiques. Les cordons sont pénétrés par des fibres réticulaires constituées de collagène de type 1 et de type 3, contenues dans les manchons des FRC (cellules fibroblastique réticulaires) formant un conduit. Au centre de chaque cordon se trouve une veinule endothéliale (VHE) entourée de couches concentriques de FRC. Le conduit FRC draine la lymphe dans le canal per veinulaire. A côté des modèles 2D et *in vivo*, la mise en place de modèles d'étude reproduisant en 3 dimensions la matrice extra cellulaire et les cellules, apparaît ainsi particulièrement importante. Les modèles animaux actuels pour étudier des interactions micro environnementales dans la LLC sont très limités. Seul un modèle en 3D reproduisant cette matrice avec un collagène pourrait aboutir à recréer ce micro-environnement.

Nous avons décrit un système de co-culture en 2D puis en 3D *ex vivo* permettant de reproduire la niche lymphatique *in vivo*. Peu de modèles cellulaires permettent de reproduire les conditions *in vivo*. C'est un modèle difficile à mettre en place compte tenu de la fragilité des cellules de LLC, et de la difficulté à obtenir des sphéroïdes à partir de cellules tumorales circulantes. Plusieurs auteurs ont décrits des systèmes de co-culture en 2D^{22,34,54-56}. (tableau 3). Le premier modèle *in vitro* de pseudo follicules de LLC mis au point par *Plander*³⁴ en 2009 était formé exclusivement de cellules primaires humaines (Bone marrow stem cells et LLC). L'ajout de cytokines (sCD40L, IL-2, IL-10, IL-4) entraînait la prolifération des cellules de LLC. Ces dernières surexprimaient des antigènes jouant un rôle important dans les interactions entre cellules T-B, tels que CD40, MHC II et les molécules d'adhérence. Par ailleurs, l'IL4 augmentait l'expression du facteur 4 régulateur de l'interféron et induisait un immunophénotypage spécifique pouvant impliquer une différenciation plasmocytaire. Trois ans plus tard, un autre modèle de microenvironnement ganglionnaire de LLC⁵⁶ est mis au point par transfection de deux lignées cellulaires de fibroblastes de souris avec CD40L ou CD31 humain. Ces trois systèmes de co-culture ont nettement amélioré la survie des cellules LLC et ont induit un changement du phénotype des LLC, caractérisé par une expression accrue de CD38, CD69, CD44 et ITGA4 (CD49d). A noter que ce phénotype était absent après la co-culture sur des fibroblastes de souris non transfectés. Contrairement aux cellules HMEC-1 non transfectées, celles stimulées par CD40L et CD31 ont induit l'expression de ZAP70 et une prolifération des cellules LLC. En 2014, *Purroy*⁵⁶ met au point une co-culture des cellules de LLC avec une lignée de cellules BMSC UE6E7T-2, et stimulées par du CD40L et des CpG ODN solubles pendant 24 à 48H qui augmente la viabilité et la prolifération des cellules de LLC. En 2017 *Primo et al*⁵⁵ ont trouvé que la combinaison CpG + IL2, HS5, sérum humain associés à des fractions plasmatiques et érythrocytaires de LLC représentaient les meilleures conditions de co-culture. De manière générale la combinaison CpG + IL2 a fourni de meilleurs résultats en termes de protection contre l'apoptose et de prolifération par rapport aux autres stimulations. L'incorporation de stimuli supplémentaires (BAFF, anti-BCR, sCD40L, HS5) à la combinaison CpG + IL2 a constamment amélioré la prolifération, mais au prix d'une apoptose accrue, à l'exception notable de l'utilisation concomitante de CpG + IL2 et HS5 (au ratio 1 : 100) qui a montré les meilleurs effets. En 2019 *Schleiss et al*²² a décidé d'optimiser ce système de co-culture en y ajoutant une stimulation par BCR. La combinaison d'anti-IgM avec [CD40L + IL-4 + IL-21] induit une prolifération de 41% des échantillons, allant jusqu'à 4 générations de cellules en prolifération à J6.

Nous avons créé dans un premier temps une niche lymphatique en 2D, en cultivant nos cellules de LLC à une concentration de 10^6 /ml dans un 24 puits sur des fibroblastes ganglionnaires ou médullaires cultivés la veille à une concentration de 10^5 / ml dans 1 ml de DMEM pendant 24h dans un 24 puits. A J0 de co-culture nous avons stimulé nos cellules avec du CpG ODN+ IL2. Nous avons choisi de ne pas utiliser le CD40L car il induit des modifications clonales non liées à la pathologie⁵⁷.

Dans notre modèle à 48h de co-culture les cellules de LLC avec des fibroblastes ont une viabilité et un KI67 significativement augmentés. La viabilité est due en partie à une augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques MCL1 et BCL2. Cette augmentation pourrait être théoriquement être expliquée par l'apparition de duplication (dup) du bras long du chromosome 1, très nombreuses dans les hémopathies lymphoïdes B et présentes dans la LLC qui entrainerait une augmentation de l'expression de *MCL1* (1q21). MCL1 est une protéine anti-apoptotique majoritairement augmentée par la stimulation du microenvironnement et plus précisément par les NLC⁵⁸. La prolifération est due à une augmentation des voies de signalisation qui augmente la voie NFkB induite par la stimulation du microenvironnement (augmentation de la prolifération par l'activation des signaux du microenvironnement induite par la voie du TLR9 liée à MYD88 amplifié par l'activation de l'IL2).⁵² La production des cytokines inflammatoire telles que : IL-6, IL-10 or TGF- β peut aussi participer à l'augmentation de la viabilité et de la prolifération.^{22,59}

Dans un deuxième temps, nous avons commencé à reproduire notre modèle 2D en 3D. L'atout majeur de la 3D est la possibilité de mettre en contact les cellules LLC avec leur fibroblastes dans un gel de collagène qui augmente leurs interactions et qui miment plus fidèlement ce qui se passe dans le ganglion^{52,60}. Les cellules ne sont plus déposées dans des puits en plastique mais sur un gel d'agarose, contenues dans du collagène dans lequel on ajoute les FRC. Le confinement des cellules tumorales rassemblées dans un plus petit volume en interaction avec des cellules fibroblastiques ganglionnaires nourricières leur permettent une augmentation de la prolifération comme en témoignent les colorations histochimiques de coupes de sphéroïdes 3D montrant une nette augmentation de marquage KI-67. Les fibroblastes ganglionnaires semblent agir comme une augmentation des molécules d'adhérence (ou leur activation) pour les cellules de LLC puisqu'elles permettent au bout de 24H de co-culture le rapprochement des cellules de LLC formant des sphéroïdes de densité variable et de morphologie différentes, (sphéroïdes non visibles dans les co-culture sans fibroblastes).

Nos principaux résultats montrent que la viabilité et la prolifération des cellules de LLC est augmentée dans notre modèle *ex-vivo* de ganglion associé à une modification de la production des cytokines et du métabolisme.

En effet il est connu que le microenvironnement tumoral agit en modifiant le métabolisme de base de la cellule. Le métabolisme énergétique des cellules prolifératives et tumorales est associé à une utilisation préférentielle des cellules de la voie de la glycolyse anaérobie même en présence d'oxygène⁴¹. Cette voie produit seulement 2 ATP comparée à la voie de la phosphorylation oxydative (2 ATP contre 38 pour la consommation d'une molécule de glucose) mais le turn over de production est beaucoup plus rapide et produit *in fine* plus d'ATP, ainsi que de nombreux intermédiaires pouvant être des substrats d'autres voies métaboliques et produire encore plus d'énergie. Nous avons caractérisé le métabolisme énergétique des cellules de LLC circulant dans le sang et des cellules LLC en co-culture avec des fibroblastes médullaires (niche médullaire) et fibroblastes ganglionnaires (niche ganglionnaire) pour évaluer l'impact du microenvironnement sur le métabolisme de ces cellules. A ce jour aucune étude n'a montré l'existence d'une hétérogénéité métabolique au sein des cellules de LLC dans la niche lymphatique.

Or nous savons qu'il existe une grande hétérogénéité métabolique au sein de plusieurs hémopathies malignes B tels que les leucémies aiguës myéloïdes et les lymphomes B diffus à grandes cellules. Toutes ces hémopathies malignes se caractérisent par un métabolisme énergétique très actif. La découverte d'une hétérogénéité de métabolisme au sein d'une pathologie tumorale peut être la cible de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des patients en échec thérapeutique. Nos principaux résultats ont montré que les LLC provenant du sang utilisent préférentiellement la phosphorylation oxydative mitochondriale plutôt que la glycolyse, pour produire leur énergie, un résultat en accord avec l'étude de Jitschin et al³⁹. Ces résultats concordent avec les données de la littérature selon lesquelles le lymphocyte B de LLC quiescent en phase G0/G1 du cycle cellulaire utilise un métabolisme majoritairement Oxphos. Même si le lymphocyte B est une cellule qui ne se divise pas ou très peu, il possède de nombreux processus actifs de transcription et de traduction, suggérant que ces lymphocytes sont métaboliquement actifs et nécessitent une production énergétique intense pour maintenir leur survie cellulaire. Il est important de noter que dans les ganglions lymphatiques de LLC les cellules B sont entourées d'un micro-environnement tumoral qui leur confère une capacité proliférative plus importante et très probablement un métabolisme énergétique plus actif. Nos résultats permettent de confirmer que la co-culture avec des fibroblastes médullaires

augmente le métabolisme de la voie de la phosphorylation oxydative quand les cellule de LLC sont en contact avec les cellules stromales de la moelle, ces résultats sont concordant avec Vangapandu³⁷ et avec Herishanu⁶¹ qui montrent que ces cellules sont associées à une signature moins proliférative et plus anti apoptotique dans la moelle osseuse. Nos résultats ne sont pas significatifs compte tenu du faible nombre de patients sur lesquels nous avons pu mener nos résultats, mais l'ensemble de nos données vont toutes dans le même sens. De plus nous montrons aussi que les cellules de LLC co-cultivées avec des HLF ont un métabolisme beaucoup moins Oxphos que les cellules de LLC seules. Ceci montre que les cellules de LLC dans la niche lymphatique ont une tendance à faire plus de glycolyse anaérobie pour produire de l'énergie. Ces résultats semblent cohérents avec la prolifération des lymphocytes B augmenté dans les adénopathies de LLC. Il est possible que la cellule de LLC tumorale utilise différents types de métabolisme en fonction de la niche dans laquelle elle se trouve. Il apparait alors tout à fait possible que le microenvironnement tumoral conditionne l'adaptation métabolique des cellules de LLC dans un environnement tumoral.

5 Conclusion et perspectives

Le microenvironnement tumoral joue un rôle prépondérant dans la physiopathologie de la LLC puisqu'il permet à la fois l'inhibition de l'apoptose et une augmentation de la prolifération des cellules de LLC. Il permet aussi une modification du métabolisme énergétique et une production de cytokines. Par ces phénomènes, le microenvironnement tumoral, favorise la création de niches spécifiques favorables au développement de la LLC.

Néanmoins, il nous reste de nombreux points à élucider notamment : mieux comprendre la nature des interactions cellulaires et moléculaires entre les cellules de LLC et les fibroblastes réticulaires, identifier l'ensemble des cytokines produites par ces interactions, analyser les voies de signalisation activées par l'interaction des fibroblastes et des cellules de LLC et déterminer sur une plus grande quantité de patients le métabolisme énergétique des cellules de LLC en co-culture avec les HLF. Pour cela il nous faudra améliorer notre système de co-culture en 3D en le rendant plus simple et plus rapide à établir afin de créer un modèle reproductible et personnalisé pour y tester de nouvelles thérapeutiques ou étudier l'apparition de résistances.

Tableau 3 : Revue de la littérature sur les différents modèles *ex-vivo* de LLC

Littérature	Modèles <i>ex-vivo</i>	Stimulation	CMF
<u>Plander et al 2009</u>	Les cellules de LLC étaient cultivées à dix millions de cellules dans 0,5mL de DMEM à 10% de FCS. Les cellules étaient co-cultivées avec dans plusieurs conditions : BMSCs (cellules de moelle osseuse), BMSCs et du sCD40, BMSCs, sCD40 et IL-4, BMSCs, sCD40L, IL-2 et IL-10, milieu seul, milieu et sCD40L, milieu sCD40L, et IL-4; et milieu sCD40L, IL-2, et IL-10. La co-culture a été faite pendant 84H	CD40L+IL2+ IL10 +IL4	Augmentation des marqueurs : Cd11C, CD18,CD44,CD49d,CD54, CD19,CD20,CD23,CD69. Diminution du SDF1R et du CD184. Augmentation de la viabilité et de la prolifération. Des divisions cellulaires ont été obtenues dans la condition BMSCs+IL10+IL2 et CD40L
<u>Hamilton et al 2012</u>	3 modèles de co-culture ont été mis en place : Transfection de 2 lignées cellulaires de fibroblastes embryonnaires de souris avec du CD40L ou CD31 humain incubé la veille est co-cultivé avec 2×10^6 /ml de PBMC de LLC Une lignée de HMEC à une concentration de 10^5 /ml (pour recréer le micro-environnement vasculaire) associé à des PBMC de patient atteint de LLC	CD40L + CD31	Expression accrue de CD38, CD69, CD44 et ITGA4 (CD49d) CD31 et Zap70 sur les fibroblastes transfectés. Tous les systèmes de co-culture ont empêché l'apoptose des cellules de la LLC avec des cellules HMEC-1, offrant ainsi une meilleure survie
<u>Purroy et al 2014</u>	La co-culture de LLC primaires : dans 5 conditions de culture différentes: en suspension, co-cultivée avec la lignée cellulaire BMSC UE6E7T-2, avec CD40L soluble, avec CpG ODN et avec la combinaison de tous les éléments: BMSC, CD40L et ODN CpG.	CD40L +CpG ODN	Les effets en termes de prolifération et de survie ont estimés à 24, 48 et 72 heures de culture. La prolifération observée par une augmentation de Ki-67, a été obtenu de manière significative après 48 heures dans des cellules CLL cultivées avec BMSC, CD40L et CpG ODN.
<u>Primo et al 2017</u>	Le but était de recréer un microenvironnement natif (MN) à l'aide de lignées cellulaires stromales HS5 stimulées par du CpG + IL2, associé à du sérum humain et à des fractions plasmatiques et érythrocytaires de LLC. Ils ont recréer un MN en poolant 5 donneurs sains différents (HD) et un autre pool de 5 patients atteints de LLC, (à partir de 11 échantillons de LLC cryoconservés, provenant de 5 échantillons de LLC IGHV non mutés (U-CLL), de 5 IGHV mutés (M-CLL) et d'un inconnu)	CpG + IL2 BAFF, anti-BCR, CD40L, HS5 Test de plusieurs stimulations : CD40L+CpG CD40L+IL21, CpG+IL2	Le kit Vybrant® CFDA SE Cell Tracer (Invitrogen) a été utilisé pour mesurer la prolifération cellulaire La stimulation par CPG et IL2 a donné les meilleurs résultats en terme de prolifération. L'addition du MN et de HS5 à la culture de LLC a augmenté la viabilité et la prolifération. La meilleur prolifération était obtenu par : CpG+IL2+HS5 (1:100) + sérum humain 10% +MN
<u>Schleiss et al 2019</u>	Les lymphocytes B de LLC sont stimulés à J0 par une IgM anti BCR, CD40L, IL4. IL21 est rajoutée 24h après la première stimulation. A J3 rajout du milieu et à J6 évaluation par CFSE. Les cellules témoins et les LLC ont été co-cultivées sur des fibroblastes (cellules 3T6) transfectés de manière stable avec un plasmide codant pour le CD40L humain (3T5-CD40L) ou avec une transfection factice (3T6). Les fibroblastes ont été pré-cultivés pendant une nuit dans des plaques à 48 puits (Dutscher, Brumath, France) à $5 \cdot 10^4$ cellules / puits. Au jour 1, les fibroblastes ont été irradiés aux rayons X (30 Gy) et repiqués toute la nuit. Au jour 2, des cellules B ont été marquées au CFSE (carboxyfluorescéine succinimidyle ester) (10^6 / ml) ont été ajoutées à la couche de fibroblastes (10 cellules CLL / 1 fibroblaste). Au jour 6 et après un marquage pat CD19, la prolifération des cellules B a été évaluée par cytométrie en flux.	Anti BCR IL-2, IL-4, IL-15, IL-21 et CD40 ligand	A 6 jours de co-culture, un marquage CFSE est réalisé pour évaluer la prolifération. L'activation par un anti-BCR n'augmente pas la prolifération quand la co-culture est dans un milieu soluble. La stimulation par IL4, IL21 et CD40L n'augmente pas non plus la prolifération. Les différentes combinaisons de cytokines, [CD40L + IL-4], [CD40L + IL-21] et [CD40L + IL-4 + IL-21] induisaient une faible prolifération (moins de 40%) des cellules de LLC. L'activation du gène BCR associée à [CD40L + IL-4] ou [CD40L + IL-21] permet une prolifération faible, l'association d'anti-IgM avec [CD40L + IL-4 + IL-21] induit une prolifération plus élevée En CMF après 6 jours de co-culture il y'avait expression plus faible de CD5, une augmentation de CD138 mais pas de CD38 et une absence d'expression d'IgG à la surface des cellules, par rapport à l'expression au jour 0 avant la stimulation.

6 Bibliographic

1. Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375–2390 (2016).
2. Hallek, M. & German CLL Study Group. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **19 Suppl 4**, iv51-53 (2008).
3. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* **17**, 779–790 (2016).
4. Hallek, M. Chronic lymphocytic leukemia: 2019 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am. J. Hematol.* (2019). doi:10.1002/ajh.25595
5. Brander, D., Islam, P. & Barrientos, J. C. Tailored Treatment Strategies for Chronic Lymphocytic Leukemia in a Rapidly Changing Era. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet.* **39**, 487–498 (2019).
6. Jain, N. *et al.* Approaches to Chronic Lymphocytic Leukemia Therapy in the Era of New Agents: The Conundrum of Many Options. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet.* **38**, 580–591 (2018).
7. Rai, K. R. & Jain, P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *Am. J. Hematol.* **91**, 330–340 (2016).
8. Binet, J. L. *et al.* A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* **48**, 198–206 (1981).
9. Crespo, M. *et al.* ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1764–1775 (2003).
10. Rossi, D. *et al.* Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **121**, 1403–1412 (2013).
11. Cramer, P. & Hallek, M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 38–47 (2011).
12. Hallek, M. *et al.* iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood* **131**, 2745–2760 (2018).
13. Byrd, J. C. Targeting CD20 takes the backseat in CLL. *Blood* **133**, 1003–1004 (2019).
14. Byrd, J. C. *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **369**, 32–42 (2013).
15. Byrd, J. C. *et al.* Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **371**, 213–223 (2014).
16. Ferrer, G. & Montserrat, E. Critical molecular pathways in CLL therapy. *Mol. Med. Camb. Mass* **24**, 9 (2018).
17. Brown, J. R. Relapsed CLL: sequencing, combinations, and novel agents. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2018**, 248–255 (2018).
18. Furman, R. R. *et al.* Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **370**, 2352–2354 (2014).

19. Bond, D. A. & Woyach, J. A. Targeting BTK in CLL: Beyond Ibrutinib. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* (2019). doi:10.1007/s11899-019-00512-0
20. Woyach, J. A. *et al.* Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N. Engl. J. Med.* **370**, 2286–2294 (2014).
21. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* **17**, 779–790 (2016).
22. Schleiss, C. *et al.* BCR-associated factors driving chronic lymphocytic leukemia cells proliferation *ex vivo*. *Sci. Rep.* **9**, 701 (2019).
23. 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).
24. Ciccone, M., Ferrajoli, A., Keating, M. J. & Calin, G. A. SnapShot: chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* **26**, 770-770.e1 (2014).
25. Ten Hacken, E., Guièze, R. & Wu, C. J. SnapShot: Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell* **32**, 716-716.e1 (2017).
26. Fabbri, G. & Dalla-Favera, R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 145–162 (2016).
27. Klein, U. & Dalla-Favera, R. New insights into the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Cancer Biol.* **20**, 377–383 (2010).
28. Kipps, T. J. *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Dis. Primer* **3**, 16096 (2017).
29. Rosenwald, A. *et al.* Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **194**, 1639–1647 (2001).
30. Jayappa, K. D. *et al.* Microenvironmental agonists generate *de novo* phenotypic resistance to combined ibrutinib plus venetoclax in CLL and MCL. *Blood Adv.* **1**, 933–946 (2017).
31. Heerema, N. A. *et al.* Stimulation of chronic lymphocytic leukemia cells with CpG oligodeoxynucleotide gives consistent karyotypic results among laboratories: a CLL Research Consortium (CRC) Study. *Cancer Genet. Cytogenet.* **203**, 134–140 (2010).
32. Crassini, K., Stevenson, W. S., Mulligan, S. P. & Best, O. G. Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **0**,
33. Decker, T., Bogner, C., Oelsner, M., Peschel, C. & Ringshausen, I. Antiapoptotic effect of interleukin-2 (IL-2) in B-CLL cells with low and high affinity IL-2 receptors. *Ann. Hematol.* **89**, 1125–1132 (2010).
34. Plander, M. *et al.* Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established *in vitro* model for pseudofollicles. *Leukemia* **23**, 2118–2128 (2009).
35. Bojarczuk, K. *et al.* BCR signaling inhibitors differ in their ability to overcome Mcl-1-mediated resistance of CLL B cells to ABT-199. *Blood* **127**, 3192–3201 (2016).
36. Choudhary, G. S. *et al.* MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies. *Cell Death Dis.* **6**, e1593 (2015).

37. Vangapandu, H. V. *et al.* The Stromal Microenvironment Modulates Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Neoplasia N. Y. N* **19**, 762–771 (2017).
38. Vangapandu, H. V. *et al.* Biological and metabolic effects of IACS-010759, an OxPhos inhibitor, on chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget* **9**, 24980–24991 (2018).
39. Jitschin, R. *et al.* Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **123**, 2663–2672 (2014).
40. Luengo, A., Gui, D. Y. & Vander Heiden, M. G. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem. Biol.* **24**, 1161–1180 (2017).
41. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
42. Xu, X. D. *et al.* Warburg effect or reverse Warburg effect? A review of cancer metabolism. *Oncol. Res. Treat.* **38**, 117–122 (2015).
43. Monti, S. *et al.* Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* **105**, 1851–1861 (2005).
44. Caro, P. *et al.* Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* **22**, 547–560 (2012).
45. Hensley, C. T. *et al.* Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. *Cell* **164**, 681–694 (2016).
46. Viale, A. *et al.* Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature* **514**, 628–632 (2014).
47. Farge, T. *et al.* Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov.* **7**, 716–735 (2017).
48. Kuntz, E. M. *et al.* Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat. Med.* **23**, 1234–1240 (2017).
49. Chiche, J. *et al.* GAPDH Expression Predicts the Response to R-CHOP, the Tumor Metabolic Status, and the Response of DLBCL Patients to Metabolic Inhibitors. *Cell Metab.* **29**, 1243-1257.e10 (2019).
50. Rogne, M. *et al.* Cytokinesis arrest and multiple centrosomes in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 2846–2855 (2018).
51. Swartz, M. A. The physiology of the lymphatic system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **50**, 3–20 (2001).
52. von Andrian, U. H. & Mempel, T. R. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 867–878 (2003).
53. Allen, C. D. C., Okada, T. & Cyster, J. G. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* **27**, 190–202 (2007).
54. Hamilton, E. *et al.* Mimicking the tumour microenvironment: three different co-culture systems induce a similar phenotype but distinct proliferative signals in primary chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* **158**, 589–599 (2012).

55. Primo, D. *et al.* A novel ex vivo high-throughput assay reveals antiproliferative effects of idelalisib and ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **9**, 26019–26031 (2018).
56. Purroy, N. *et al.* Co-culture of primary CLL cells with bone marrow mesenchymal cells, CD40 ligand and CpG ODN promotes proliferation of chemoresistant CLL cells phenotypically comparable to those proliferating in vivo. *Oncotarget* **6**, 7632–7643 (2014).
57. Buhmann, R., Nolte, A., Westhaus, D., Emmerich, B. & Hallek, M. CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells. *Blood* **93**, 1992–2002 (1999).
58. 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).
59. 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).
60. Dick, F. R. & Maca, R. D. The lymph node in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* **41**, 283–292 (1978).
61. Herishanu, Y. *et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117**, 563–574 (2011).

7 Annexes :

7.1 Annexe 1 : Score de Matutes

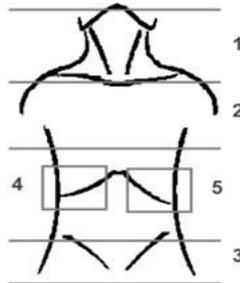
Score de Matutes

Cotation	1	0
CD5	+	-
CD23	+	-
Expression slg monotypique	faible	forte
FMC7	-	+
Expression de CD79b/CD22	faible	forte

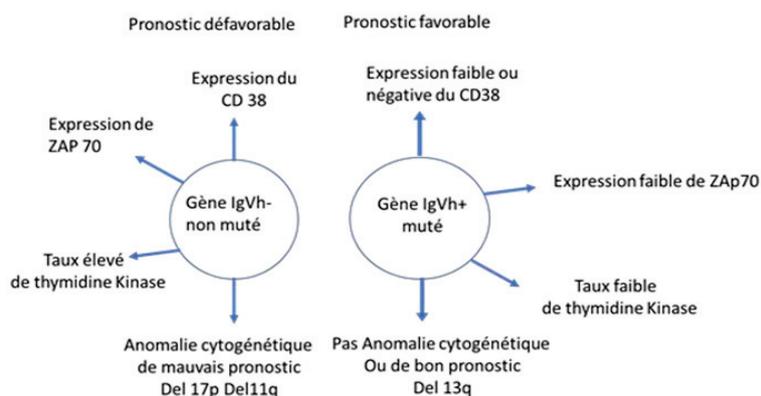
7.2 Annexe 2 : Classification de Binet

stade	Critères
stade A	Hb \geq 100 g/l et plaq \geq 100 x 10 ⁹ /l < 3 aires lymphoïdes atteintes
stade B	Hb \geq 100 g/l et plaq \geq 100 x 10 ⁹ /l \geq 3 aires lymphoïdes atteintes
stade C	Hb < 100 g/l et/ou plaq < 100 x 10 ⁹ /l quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes atteintes

définition des aires lymphoïdes



7.3 Annexe 3 : Pronostic de la LLC



7.4 Annexe 4 : Autorisation de la CNIL et consentement



Le Vice-Président délégué

Monsieur Stéphane SWEERTVAEGHER
DIRECTEUR ADJOINT
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
NICE
4, AVENUE REINE VICTORIA
BP 1179
06003 - NICE

A l'attention de Mme Cassandre LANDES

N/Réf. : EGY/VCS/ARI35458

Paris, le 11 JUIL. 2013

Objet : NOTIFICATION D'AUTORISATION

Document de la Commission et de l'Inspection CNIL DE NICE
15 JUIL. 2013
ARRIVÉ N° : 926

Décision DR-2013-343 autorisant le CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NICE à mettre en œuvre un traitement de données ayant pour finalité une étude réalisée au Centre Hospitalier Universitaire de Nice reposant sur une évaluation fonctionnelle et moléculaire du stroma tumoral dans la pathogénèse de la leucémie lymphoïde chronique. (Demande d'autorisation n° 913239)

Monsieur le Directeur,

Vous avez saisi notre Commission d'une demande d'autorisation relative à un traitement de données à caractère personnel ayant pour finalité :

ÉTUDE RÉALISÉE AU CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NICE REPOSANT SUR UNE ÉVALUATION FONCTIONNELLE ET MOLÉCULAIRE DU STROMA TUMORAL DANS LA PATHOGÉNÈSE DE LA LEUCÉMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE

Ce traitement relève de la procédure des articles 54 et suivants de la loi du 6 janvier 1978 modifiée.

Les services de notre Commission ont étudié les conditions définies dans le dossier de formalités préalables déposé à l'appui de cette demande et notamment celles relatives à l'exercice effectif des droits des participants à l'étude.

Après avoir examiné les catégories de données traitées et les destinataires, je vous rappelle conformément au 3^{ème} alinéa de l'article 55, la présentation des résultats du traitement de données peut, en aucun cas, permettre l'identification directe ou indirecte des personnes concernées.

En application des articles 15 et 69 de la loi précitée et de la délibération n° 2009-674 du 26 novembre 2009 portant délégation d'attributions de la Commission nationale de l'informatique et des libertés à son président et à son vice-président délégué, j'autorise la mise en œuvre de ce traitement.

Je vous prie d'agréer, Monsieur le Directeur, l'expression de mes salutations distinguées.



« Evaluation fonctionnelle et moléculaire du stroma tumoral dans la pathogenèse de la leucémie lymphoïde chronique »

Promoteur de l'étude : CHU de Nice - Département de la Recherche Clinique - 4, avenue Pasteur
Filière - BP 1179 - 06063 Nice Cedex 3 - Tél : 04 92 03 40 11 - Fax: 04 92 03 40 75

Investigateur coordonnateur : Service d'Hématologie Clinique Dr KARSENTI - Hôpital l'Archet
Tél : 04 92 03 38 41

Note d'information et Consentement

Madame, Mademoiselle, Monsieur,

Vous êtes sollicité pour une pathologie biomoléculaire. Dans le cadre de la prise en charge de votre pathologie au Centre Hospitalier Universitaire de Nice (CHU de Nice) un prélèvement sanguin étira un sérologisme sera nécessaire pour permettre le suivi de votre pathologie biomoléculaire. A l'occasion de ce cas-ci, nous souhaiterions conserver le matériel en excès issu de ces prélèvements et prélever 8 ml de sang supplémentaire. Ces prélèvements seront destinés à [L'ANR de recherche](#).

Nous vous proposons de participer à la création d'une banque d'échantillons biologiques à partir de ces prélèvements à des fins de recherche.

Vous pouvez vous opposer ou retirer votre participation à tout moment, sans que votre décision influence en quoi que ce soit la qualité des soins que vous recevrez, et sans aucune autre responsabilité.

Missions du Service de médecine interne

Une des missions du Service de médecine interne est d'archiver des échantillons biologiques cryoconservés dans un but de recherche clinique et fondamentale menée par des équipes du Centre Hospitalier Universitaire de Nice, du Centre Antoine Lacaze, de l'Université de Nice Sophia Antipolis, ou d'autres équipes de recherche institutionnelles. Ces travaux de recherche peuvent être réalisés éventuellement au sein d'autres laboratoires français ou étrangers après avis des collecteurs.

Les objectifs de ces différents travaux, présents ou futurs, sont :

- de définir des marqueurs biologiques permettant d'appréhender l'apparition de certaines maladies,
- d'identifier de nouvelles cibles biologiques pouvant conduire au développement de stratégies thérapeutiques nouvelles.

Pour ce faire, il sera notamment étudié des expériences sur les AEN vitales, les protéines et l'ADN génomique des cellules hématiques conservées dans les échantillons sanguins.

Bénéfices attendus

Il n'y a pas de bénéfice immédiat pour vous : l'utilisation de ces prélèvements n'aura pas de conséquences sur les soins immédiats qui vous sont prodigués.

Pour l'ensemble de la communauté, le bénéfice attendu est une meilleure compréhension des mécanismes biologiques responsables de l'apparition et du développement de certaines maladies. Cette meilleure connaissance devrait permettre une amélioration des pratiques thérapeutiques des [patients-malades](#) pour la même pathologie que vous. L'utilisation de ces prélèvements dans cette finalité n'aura pas de conséquences sur les soins immédiats qui vous seront prodigués.

Paraphe du patient : _____

Page 1 sur 3

Risques et contraintes

Il n'y a pas de contraintes supplémentaires dans la mesure où les échantillons biologiques seront prélevés lors d'une consultation réalisée dans le cadre du suivi de votre pathologie.

Déroulement

La participation à cette étude se réalisera par d'autres prélèvements et de modification du rythme de vos consultations médicales. Les prélèvements destinés à la recherche sont conservés dans un congélateur à -80°C situé dans le laboratoire INSERM U1065/CTM. Ce congélateur est placé sous la responsabilité de Dr. Marcell [Dujovne](#), directeur de recherche à l'INSERM U1065/CTM.

Médicaments administrés (Déclaration au CPP del Médicaments Y

Le laboratoire INSERM U1065/CTM a soumis cette constitution de collection d'échantillons biologiques à l'avis du Comité de Protection des Personnes Sud Méditerranée Y conformément à la loi 2004-809 du 6 août 2004 relative à la bioéthique. Toute mise en place d'une recherche biomédicale à partir d'échantillons biologiques congelés (dont les critères) fera l'objet d'une demande d'avis auprès du Comité de Protection des Personnes (CPP), vous serez bien sûr informé de cet avis.

2. Confidentialité des données

Pour réaliser ces recherches futures, il est en outre nécessaire de pouvoir disposer de données cliniques vous concernant. Comme vous le savez, collecter ces données dans votre dossier médical et gérer informatiquement le traitement automatisé des informations vous concernant a été autorisé par la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (loi 95-548 du 1 juillet 1994 et décret n° 95-612 du 09 mai 1995 complétés par la loi relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel du 6 août 2004, articles L.92 à L.94). Ces données médicales font partie des renseignements indispensables pour mener à bien ces travaux ; et enfin, les nouvelles connaissances sur les maladies sont produites grâce au rapprochement des résultats de la recherche scientifique avec des données cliniques des malades et de leur évolution.

Les données cliniques et biologiques vous concernant (primaires) sont de votre nature patrimoniale et de votre propriété. Les données cliniques, biologiques, de compléments (primaires) sont rendues strictement confidentielles par un codage sans lien avec votre nom et prénom.

Les données issues de ces différents dossiers se font sous la responsabilité des médecins par des personnes soumise au secret professionnel et collaborant à la constitution de cette banque. Vous avez le droit de retrait de participation ou d'opposition à l'utilisation de vos données médicales à des fins de recherche en respectant votre refus, sans conséquence sur la qualité des soins et la relation avec votre médecin.

Ces données subissent un traitement informatique. Vous pouvez être informé de la modification à tout moment à vos données soit directement soit indirectement par l'intermédiaire du médecin de votre choix (loi 95-548 du 1 juillet 1994 et décret n° 95-612 du 09 mai 1995 complétés par la loi relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel du 6 août 2004, articles L.92 à L.94).

Au terme du délai prévu par l'article R.2045, vous pouvez solliciter la destruction de ces données par l'intermédiaire du médecin responsable du Centre de Ressources Biologiques ou des autorités de santé.

Si je ne m'oppose pas à ce que des échantillons biologiques, qui m'ont été prélevés dans le cadre de ma prise en charge, soient conservés dans cette banque d'échantillons, que dois-je faire concrètement ?

Vous participez à la collection de cette banque est libre.

Conformément à l'article L.1211-2 du code de la santé publique (loi 2004-809 du 6 août 2004), [voir autorisation de l'ANR](#) Pour que :

- Des échantillons biologiques issus de tubes de sang et/ou sérologisme prélevés dans le cadre de votre prise en charge et non utilisés, soient conservés par congélation dans le cadre de la création de la banque d'échantillons,
- Ces échantillons biologiques soient utilisés dans le cadre de la recherche scientifique
- Que vos données cliniques et anatomopathologiques, après codage, soient mises à disposition des cliniciens et des chercheurs sous la responsabilité de Dr [Dujovne](#) responsable du Service de Médecine Interne.

Paraphe du patient : _____

Page 2 sur 3

Vous avez le droit de vous opposer ou de retirer votre consentement à tout moment, sans avoir à en expliquer les raisons et sans que votre décision influence en quoi que ce soit la qualité des soins que vous recevrez, et sans aucune autre responsabilité. Vous devez être en contact le Dr Karrenti, responsable de la mise en place de cette banque d'échantillons au 04 92 03 38 41. Les échantillons sanguins, et si vous le souhaitez, les données déjà obtenues seront alors détruits.

Vous participez à la collection de cette banque se fera sans lien à aucune indemnité.

Afin d'exprimer votre choix, nous vous demandons de bien vouloir lire, écouter, dater, et signer dans le cadre observé le consentement qui se trouve à la suite de cette note d'information. Vous avez la possibilité de demander un délai de réflexion et de poser toutes les questions relatives à cette démarche avant de prendre votre décision.

Quelle que soit votre décision, nous tenons à vous remercier de l'attention que vous avez portée à la lecture de ce document. Si vous souhaitez obtenir des informations complémentaires, vous pouvez contacter le Dr Karrenti responsable de la mise en place de la banque d'échantillons au 04 92 03 38 41.

PATIENT

Je m'oppose à l'utilisation de mes échantillons biologiques à des fins de recherche

Je consens à l'utilisation de mes échantillons biologiques à des fins de recherche

Nom : _____ Prénom : _____

Adresse complète : _____

Signature : _____ Date : ____/____/____

INVESTIGATEUR

Nom de l'investigateur (en majuscule) : _____

En signant ce formulaire, je confirme que j'ai expliqué l'étude aux modalités aux/à signant(s) concerné(s)

Signature : _____ Date : ____/____/____

Paraphe du patient : _____

Page 3 sur 3

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette École, de mes chers condisciples, je promets et je jure, au nom de l'Être Suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité, dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me sont confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses !

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

Résumé

Introduction :

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la plus fréquente des leucémies de l'adulte. Malgré un arsenal thérapeutique largement développé, de nombreuses résistances émergent et sont responsables de rechutes parfois précoces et graves. Ceci s'explique en partie par la persistance dans des niches de cellules leucémiques résistantes. Il n'existe pas à ce jour de modèle *ex-vivo* de ganglion lymphatique de LLC permettant d'étudier la pathologie avec son micro-environnement spécifique.

Nos objectifs étaient :

i/ De mettre au point une technique de co-culture *ex-vivo* de LLC en 2D puis en 3D pour mieux reproduire la niche tumorale des cellules B de LLC dans le ganglion.

ii/ D'étudier ce modèle de niche lymphatique en mesurant la viabilité, la prolifération, le métabolisme et la production des cytokines des cellules de LLC.

Matériel et méthodes :

Un modèle *ex-vivo* a été mis au point, à partir des co-cultures de LLC avec soit des fibroblastes médullaires (HS5) pour reproduire la niche médullaire soit des fibroblastes ganglionnaires (HLF) pour reproduire la niche lymphatique. Ces co-cultures en 2D ont été stimulées par du CpG ODN et IL2 pour reproduire les signaux du microenvironnement et tester la viabilité, la prolifération, la production de cytokines, l'expression des protéines et le métabolisme énergétique. Une co-culture en 3D a été réalisée en créant des sphéroïdes de LLC à partir de la co-culture 2D.

Résultats :

La viabilité des cellules de LLC est augmentée dans les co-cultures de LLC avec HLF et LLC avec HS5 ($p < 0,001$). La prolifération est augmentée dans les co-cultures de LLC avec HLF ($p < 0,001$). La co-culture avec HS5 ou HLF modifie la production des cytokines, de l'expression des protéines et le métabolisme. Nous avons pu produire des modèles *ex-vivo* en 3D associant cellules de LLC et fibroblastes, marqués par un Ki-67 positif en immunohistochimie.

Conclusion :

Les résultats déjà démontrés dans les niches médullaires se confirment dans un modèle ganglionnaire *ex-vivo* : la co-culture de LLC avec des fibroblastes ganglionnaires augmente leur survie et modifie leur production de cytokines et leur métabolisme. Un modèle 3D de co-culture est réalisable et présente une opportunité de simuler la niche lymphatique de LLC.