

**UNIVERSITE PARIS XIII – SORBONNE PARIS NORD**

**École doctorale Sciences, Technologies, Santé – Galilée**

---

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

---

**THESE DE DOCTORAT**

présentée par

**Jordan FERREIRA**

Laboratoire INSERM U1349-Université Sorbonne Paris Nord

« Signalisation, Microenvironnement et Hémopathies Lymphoïdes B »

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE-BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE**

Soutenue le Lundi 15 septembre 2025 devant le jury d'examen constitué de :

<b>Dr Emmanuel DONNADIEU</b>	(Université Paris-Saclay)	Président du jury
<b>Dr Delphine GARNIER</b>	(Sorbonne Université)	Rapporteur
<b>Dr Christophe LAMAZE</b>	(Sorbonne Université)	Rapporteur
<b>Dr Anthony LEMARIE</b>	(Université de Toulouse)	Examineur
<b>Dr Laura GARDANO</b>	(Université Sorbonne Paris Nord)	Directrice de thèse
<b>Pr Dominique LEDOUX</b>	(Université Sorbonne Paris Nord)	Co-directeur de thèse

## Remerciements

Cette thèse marque la fin d'un chapitre intense, parfois éprouvant, mais surtout extrêmement enrichissant. Si j'ai pu aller au bout de ce parcours, c'est grâce aux personnes qui m'ont entouré, soutenu et guidé. A vous tous, je souhaite dire un immense merci.

Tout d'abord, je remercie le **Dr Emmanuel Donnadieu** pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Un grand merci également au **Dr Christophe Lamaze** et au **Dr Delphine Garnier**, pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail et pour le temps et l'attention que vous avez consacrés à mon manuscrit.

Merci au **Dr Anthony Lemarié**, pour avoir suivi l'évolution de cette thèse avec bienveillance en tant que membre de mon comité de suivi, et pour avoir accepté de participer à son évaluation finale.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes directeurs de thèse, le **Pr Dominique Ledoux** et le **Dr Laura Gardano**. Travailler à vos côtés a été une véritable chance. Merci pour votre disponibilité, votre confiance, vos conseils toujours justes, et surtout pour votre humanité. Ces années à vos côtés resteront un moment fort de ma vie, autant sur le plan scientifique que personnel.

Je remercie également le **Dr Grégory Lazarian**, pour ses idées toujours stimulantes, son regard original, et pour m'avoir proposé pour le Prix JExL. Ton soutien et tes conseils m'ont beaucoup aidé — merci encore pour ta confiance.

Un mot tout particulier pour le **Dr Nadine Varin-Blank**, directrice du laboratoire, que je remercie pour m'avoir soutenu tout au long de ce projet. Merci pour ta confiance, pour les discussions riches et sincères, et pour m'avoir permis de m'épanouir dans ce cadre de travail.

Merci du fond du cœur à **Antonin, Laure et Stéphanie**. Vous avez été présents dans les bons comme les mauvais jours, avec vos mots, votre aide, vos sourires. Nos discussions et nos pauses café ont rendu le quotidien beaucoup plus doux.

Je n'oublierai jamais les anciens doctorants avec qui j'ai partagé tant de moments : **Imane, Koceila, Fériel, Souleymane**... Merci pour les conseils, les discussions, les rires.

**Fériel et Souleymane**, partager un bureau avec vous a été un vrai bonheur. Merci pour votre bonne humeur, vos blagues (plus ou moins bonnes), et votre énergie.

Aux doctorants actuels, **Marie**, **Hélène**, **Wema** et **Emeline**, vous êtes des personnes formidables. Merci pour votre bienveillance, votre écoute, nos échanges enrichissants. Je vous souhaite sincèrement le meilleur pour la suite de vos thèses et au-delà.

Un grand merci à **Lola**, que j'ai eu le plaisir d'encadrer pendant son M1 puis son M2, et qui s'apprête maintenant à entamer sa propre aventure doctorale. Merci pour ton aide précieuse, tout particulièrement sur la fin du projet — ta rigueur, ta curiosité et ton efficacité ont été d'un grand soutien. Mais surtout, merci pour ton humour décalé, ta légèreté et ta bonne humeur constante, qui ont apporté un vrai vent de fraîcheur au quotidien du labo. Je te lègue avec fierté mon titre autoproclamé de dessinateur de petits bonhommes — à toi d'assurer la relève !

Je remercie aussi tous les membres du labo, et plus particulièrement **Mélanie** et **Claudine**, pour leur gentillesse, leur patience et leurs conseils toujours utiles.

Enfin, je souhaite remercier ma maman, **Christine**, et ma sœur, **Adriana**, pour leur soutien inconditionnel, leur écoute et leurs encouragements, même quand elles ne comprenaient pas toujours ce que je faisais exactement au labo. Votre présence a compté plus que vous ne l'imaginez. Un immense merci à **Dassine**, ma copine, pour ta patience, ta gentillesse, ton humour et ton soutien au quotidien. Merci d'avoir été là dans les moments de doute comme dans les bons moments. Ton calme et ta bonne humeur m'ont souvent permis de garder le cap.

## Résumé

Cette thèse met en lumière les mécanismes par lesquels les cellules B de leucémie lymphoïde chronique (B-LLC) interagissent avec leur microenvironnement stromal et en modifient profondément les propriétés, à la fois sur les plans métabolique et mécanique. Dans un premier temps, il a été démontré que les cellules B-LLC induisent une reprogrammation métabolique active des cellules stromales, caractérisée par une augmentation de la glycolyse et de la production de lactate. Ce lactate est ensuite exploité par les cellules leucémiques pour alimenter leur métabolisme mitochondrial et soutenir leur signalisation de survie, illustrant un phénomène de type *Reverse Warburg Effect*. Dans un second axe, l'étude révèle la capacité des cellules B-LLC à altérer les propriétés mécaniques du stroma via la modulation de la voie de signalisation Hippo, en particulier de son effecteur YAP. La régulation de YAP entraîne des réorganisations du cytosquelette, des structures d'adhésion et des marqueurs liés à la plasticité cellulaire. Ces changements, bien qu'ils n'affectent pas directement la survie leucémique à court terme, pourraient favoriser la mobilité et la dissémination des cellules, contribuant à l'établissement de niches permissives et mécaniquement relâchées.

## Abstract

This thesis highlights the mechanisms by which chronic lymphocytic leukemia B cells (B-CLL) interact with their stromal microenvironment and profoundly reshape its properties, both metabolically and mechanically. First, it was demonstrated that B-CLL cells actively induce metabolic reprogramming in stromal cells, notably enhancing glycolysis and lactate production. This lactate is then exploited by the leukemic cells to fuel their mitochondrial metabolism and support survival signaling, illustrating a process akin to the *Reverse Warburg Effect*. Secondly, the study reveals the ability of B-CLL cells to alter the mechanical properties of the stroma by modulating the Hippo signaling pathway, particularly through its effector YAP. YAP regulation leads to cytoskeletal rearrangements, reorganization of adhesion structures, and modulation of markers involved in cellular plasticity. While these changes do not directly impact leukemic cell survival in the short term, they may promote cell motility and dissemination, contributing to the formation of permissive and mechanically relaxed niches.

# Table des matières

<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
I. LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL : UN ACTEUR DYNAMIQUE DE LA PROGRESSION TUMORALE .....	13
A. <i>Définition et composition du microenvironnement tumoral (TME)</i> .....	13
i. La composante stromale.....	15
ii. La composante immunitaire.....	17
iii. La composante non cellulaire.....	19
B. <i>Mécanismes de communications cellulaires</i> .....	20
i. Facteurs solubles.....	21
ii. Contacts cellulaires directs.....	22
C. <i>La dynamique du TME en lien avec la progression tumorale</i> .....	24
II. METABOLISME CELLULAIRE ET ADAPTATION TUMORALE .....	26
A. <i>Rappels des voies métaboliques dans une cellule humaine saine</i> .....	26
i. Glycolyse (Voie Embden-Meyerhof-Parnas).....	27
ii. Cycle de Krebs.....	29
iii. La Chaîne respiratoire mitochondriale .....	31
iv. Autres voies métaboliques .....	34
B. <i>Effet Warburg</i> .....	36
i. Découverte et définition.....	36
ii. Facteurs responsables.....	36
iii. Conséquences métaboliques.....	37
C. <i>Adaptation métabolique dans le microenvironnement tumoral (TME)</i> .....	38
i. Hypoxie.....	38
ii. Stress oxydatif et espèce réactives de l'oxygène.....	39
iii. Compétition métabolique et disponibilité des nutriments .....	40
III. MORPHOLOGIE CELLULAIRE ET MECANO-SENSIBILITE .....	42
A. <i>Une architecture cellulaire dictée par le cytosquelette</i> .....	42
i. Découverte et définition.....	42
ii. Constituants du cytosquelette.....	43
iii. Dérégulation dans les cancers .....	47
B. <i>Notions de mécano-sensibilité</i> .....	49
i. La détection des signaux mécaniques .....	50
ii. La transduction mécanique .....	52
iii. Le rôle du cytosquelette .....	53
C. <i>Molécules d'adhésion et leurs fonctions mécaniques</i> .....	55
i. Les intégrines.....	55
ii. Les cadhérines.....	56
iii. Les sélectines .....	56
iv. Les CAMs de la superfamille des Immunoglobulines.....	56
IV. LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO (YAP/TAZ).....	58
A. <i>De la Drosophile aux mammifères</i> .....	58
i. Les kinases et adaptateurs de la voie.....	60
ii. Les effecteurs finaux de la voie : YAP/TAZ.....	62
iii. Signaux régulateurs en amont de la voie Hippo .....	65
iv. Régulation de YAP/TAZ indépendant de Hippo/LATS.....	68
A. <b>MECANO-TRANSDUCTION</b> .....	68
B. <b>FACTEURS SOLUBLES</b> .....	70
C. <b>LE STRESS CELLULAIRE</b> .....	71
B. <i>Hippo et Cancers</i> .....	73
i. Implication dans la tumorigenèse et la résistance aux traitements .....	73
ii. Rôles dans le microenvironnement tumoral.....	74

V.	LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE (LLC) .....	77
A.	<i>Présentation générale</i> .....	77
B.	<i>Caractéristiques des cellules B de LLC</i> .....	80
i.	La voie du récepteur des cellules B (BCR) .....	80
ii.	La voie PI3K-Akt-mTOR .....	82
iii.	Les facteurs de transcription NF-kB et NFAT .....	82
iv.	La voie Wnt/ $\beta$ -caténine .....	83
C.	<i>Le microenvironnement tumoral de la LLC</i> .....	86
i.	Composition du TME.....	87
A.	LES CELLULES IMMUNITAIRES .....	87
B.	LES CELLULES STROMALES .....	88
i.	<i>Les Nurse-Like Cells (NLC)</i> .....	88
ii.	<i>Les Fibroblastic Reticular Cells (FRC)</i> .....	89
iii.	<i>Les Mesenchymal Stromal Cells (MSC)</i> .....	91
ii.	Niche médullaire et ganglionnaire .....	92
D.	<i>Un modèle d'étude de la reprogrammation stromale</i> .....	94
i.	Des lignées pour mimer le stroma LLC .....	94
ii.	Un dialogue entre HS-5 et B-LLC .....	95
iii.	Education des cellules stromales.....	96
	<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>98</b>
	<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>99</b>
	CULTURE CELLULAIRE .....	99
	LIGNEE HS-5 STABLES (pLKO, shYAP, YAP 5SA).....	101
	TRI MAGNETIQUE .....	101
	DETECTION DE LA FORME ACTIVE DE RHOA PAR PULL-DOWN.....	102
	FRACTIONNEMENT CYTOPLASMIQUE ET NUCLEAIRE .....	103
	WESTERN BLOT ET ANALYSE DENSITOMETRIQUE .....	103
	QRT-PCR .....	106
	IMMUNOFLOUORESCENCE .....	107
	CYTOMETRIE EN FLUX.....	108
	SYSTEME RAPPORTEUR HIPPO (HIP/HOP) .....	110
	ANALYSES STATISTIQUES.....	111
	<b>RESULTATS.....</b>	<b>112</b>
I.	REPROGRAMMATION METABOLIQUE (REVERSE WARBURG EFFECT) DES CELLULES STROMALES PAR LES CELLULES B-LLC.....	112
II.	ETUDE DE LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO DANS LES CELLULES STROMALES EN COCULTURE AVEC LES B-LLC .....	152
A.	<i>Modifications morphologiques des HS5 en coculture</i> .....	152
B.	<i>Activation de la voie HIPPO dans les cellules stromales en coculture</i> .....	156
C.	<i>Modulation de l'expression de YAP dans des lignées stables HS5</i> .....	158
D.	<i>Rôle de YAP sur la morphologie des cellules stromales HS-5</i> .....	160
E.	<i>Implication de YAP (stromal) dans la viabilité et l'adhésion des B-LLC</i> .....	162
F.	<i>Rôle de YAP et de la coculture dans l'expression des protéines d'adhésion par les cellules HS-5 transgénique</i> .....	164
G.	<i>Modulation des complexes d'adhésion focaux dans les lignées HS-5 transgéniques</i> .....	166
H.	<i>Modulation de la fibronectine dans les cellules HS-5 transgéniques</i> .....	168
I.	<i>Modulation des caténines dans les lignées HS-5 transgéniques</i> .....	169
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>172</b>
	AXE 1 - REPROGRAMMATION METABOLIQUE (REVERSE WARBURG EFFECT) DES CELLULES STROMALES PAR LES CELLULES B-LLC.....	173

AXE 2 - ROLE DE YAP STROMAL DANS LA MODULATION DU MICROENVIRONNEMENT DES CELLULES B-LLC. 175

**CONCLUSION..... 182**

**BIBLIOGRAPHIE..... 183**

**ANNEXES ..... 234**

## Liste des abréviations

+TIPs	Microtubule plus-end/positive-end tracking proteins
3PG	3-phosphoglycérate
4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
ABCG2	ATP-binding cassette super-family G member 2
ACC	Acétyl-CoA Carboxylase
ADP	Adénosine Di Phosphate
AKT	Protéine kinase B
AMOT	Angiomotin
AMOTL2	Angiomotin-like protein 2
AMP	Adénosine Mono Phosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANGPTL4	Angiopoïtine like 4
ANKRD1	Ankyrin Repeat Domain 1
AP-1	Activator Protein 1
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
AREG	Amphiregulin
Arg-1	Arginase-1
ARN	Acide Ribonucléique
Arp2/3	Actin Related Protein 2/3
ATP	Adénosine Tri Phosphate
AXL	Gène codant la Tyrosine-protein kinase receptor AXL
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BAFF	B-cell activating factor
BAFF-R	B-cell activating factor Receptor
BAG3	BCL2-Associated Athanogene 3
BAX	Bcl-2-like protein 4
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCR	Récepteur des cellules B
BIRC5	baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 (survivine)
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
BTK	Bruton's Tyrosine Kinase
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
c-Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
CAFs	Fibroblastes associés aux cancers
CAMs	Molécules d'adhésion cellulaire
CCL	C-C Motif Chemokine Ligand
CD	Cluster de différenciation
CDKN1A	Gène codant la cyclin-dependent kinase inhibitor 1
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CK1	Casein Kinase 1

CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CO2	Dioxyde de Carbone
CoA	Co-enzyme A
COL1A1	Gène codant le collagène de type 1
CSF1	colony stimulating factor 1
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
CYR61	Cysteine-rich angiogenic inducer 61
DAG	diacylglycerol
DCs	Cellules Dendritiques
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
diap1	Drosophila inhibitor of apoptosis protein-1
EB1	End-binding proteins
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Transition Epithélio-Mesenchymateuse
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FADH2	Flavin Adenine Dinucleotide (forme réduite)
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAP	Fibroblast Activation Protein
FAS	Fatty Acid Synthase
Fe <sup>2+</sup>	Ion ferreux
FGF	Fibroblast Growth Factor
FN1	Gène codant la Fibronectine
FOXO	Forkhead Gox Class O
FoxP3	Forkhead box P3
FRC	Cellules réticulaires fibroblastiques
FZD	Frizzled receptors
G6PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GAP	GTPase activating proteins
GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitors
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factors
Glc-6-P	Glucose-6-Phosphate
GLUT	Transporteurs de glucose
GPCRs	Récepteurs couplés aux protéines G
GPx	Glutathion Peroxydase
GSK3 $\beta$	Glycogen synthase kinase-3 beta
GTP	Guanosine Triphosphate
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
HK	Hexokinase
HLA	Human Leukocyte Antigen

Hpo	Kinase Hippo
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule-1
Ig	Immunoglobuline
IGHV	Gènes des Immunoglobulines
IKK $\beta$	Protéine kinase IKK beta
IL	Interleukine
IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate
I $\kappa$ B $\alpha$	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
JAK	Janus Kinase
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LAM	Leucémie Aigüe Myéloïde
LATS	Large Tumor Suppressor kinases
LCK	Gène codant la Tyrosin-protein kinase Lck
LDHA	Lactate déhydrogénase A
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LIMK	LIM Kinase
LINC	Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
lncRNA	Long non-coding RNA
LOX	Lysyl-oxydase
LPA	Acide lysophosphatidique
LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6
LT $\alpha/\beta$	Lymphotoxine
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MBL	Lymphocytose B monoclonale
MCL1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MCT	Transporteurs monocarboxylates
MDSCs	Cellules Myéloïdes Suppressives
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
miRNA	Micro ribonucleic acid
MLC2	Myosin Light Chain 2
MLCK	Myosin light-chain kinase
MLCP	Myosin light-chain phosphatase
mmHg	millimètre de Mercure
MMPs	Métalloprotéinases
MOB1	Mps One Binder kinase activator-like 1
MSCs	Cellules souches/stromales mésenchymateuses
MST	Mammalian Sterile 20-like kinase
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MYPT1	Myosin Phosphatase Target Subunit 1
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (forme oxydée)

NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (forme réduite)
NADP+	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (forme oxydée)
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NEMO	NF- $\kappa$ B Essential Modulator
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
NKG2D	natural killer group 2D
NKs	Cellules Natural Killer
NLCs	Nurse-Like Cells
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NO	Oxyde nitrique
NOX	NADPH oxydases
NSCLC	Cancer du poumon non à petites cellules
PCP	Planar Cell Polarity
PD-1	programmed cell death 1
PDAC	Carcinome canalaire pancréatique
PDGFR- $\beta$	Récepteur bêta du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PFK-1	Phosphofructokinase-1
PFKFB3	Gène codant la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
PGAM1	Phosphoglycerate Mutase 1
PGC-1 $\alpha$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha
PGK	Phosphoglycérate Kinase
Pi	Phosphate inorganique
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
Piezo1	Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PK	Pyruvate Kinase
PKM2	Pyruvate Kinase M2
PLC $\gamma$ 2	Phospholipase C gamma 2
PP1	Protein Phosphatase 1
PPAR $\gamma$	Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PyrDH	Pyruvate Dehydrogenase
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma kinase
RASSF	Ras-Association Domain Family
ROCK	Rho-associated kinase
ROR	RAR-related orphan receptors
ROS	Espèces Réactives de l'Oxygène
RUNX	Runt-related transcription factor

S1P	Sphingosine 1-phosphophate
S6K1	S6 Kinase 1
SARAH	Domaine Sav-RASSF-Hpo
Sav	Protéine adaptatrice Salvador
SCF	Stem Cell Factor
Sd	Facteur de transcription Scalloped
SDF-1 / CXCL12	Stromal Cell-Derived Factor 1
SERPINE1	Gène codant la serpin family E member 1
SLC1A5	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5
SOD	Superoxyde dismutase
SOX	SRY-related HMG-box
SREBP-1	Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T-ALL	Leucémie aiguë lymphoblastique T
TAMs	Macrophages Associés aux Tumeurs
TAZ	Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif
TCF/LEF	T cell factor/lymphoid enhancer factor family
TEAD	TEA Domain family member
Tfh	Cellules T auxiliaires folliculaires
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TGF- $\beta$ RI/II	Récepteurs du TGF- $\beta$
Th	Lymphocytes T helper
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLR	Toll-Like Receptor
TME	MicroEnvironnement Tumoral
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
TNT	Tunneling Nanotubes
TRPV4	Transient receptor potential vanilloide 4
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA-4	Very late antigen-4
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP-family verprolin-homologous protein
Wts	Kinase Warts
YAP	Yes-Associated Protein
YES1	Gène codant la Tyrosine-protein kinase Yes
Yki	Coactivateur transcriptionnel Yorkie
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein of 70 kDa
$\alpha$ -SMA	Actine alpha du muscle lisse
$\beta$ -TRCP	Beta-transducin repeat-containing protein

# Introduction

## I. Le microenvironnement tumoral : un acteur dynamique de la progression tumorale

### A. Définition et composition du microenvironnement tumoral (TME)

Depuis plusieurs décennies, les tumeurs sont considérées comme des « organes parasites », dotés d'une complexité comparable, voire supérieure, à celle des tissus sains. Pour mieux comprendre la biologie tumorale, les standards établis au début des années 2000 — notamment ceux compilés par Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg — ont évolué. Leur publication fondatrice, *Hallmarks of Cancer* (2000), identifie six caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses, telles qu'elles étaient alors comprises : croissance illimitée, échappement à l'apoptose, autosuffisance vis-à-vis des facteurs de croissance, résistance aux signaux inhibiteurs, induction de l'angiogenèse et acquisition d'un phénotype invasif et métastatique<sup>1</sup>.

Cependant, les progrès technologiques et l'accumulation de données scientifiques ont conduit à une vision plus nuancée du cancer, ne se limitant plus à la cellule tumorale elle-même. En 2011, Hanahan et Weinberg proposent une mise à jour de leur modèle, intégrant le rôle déterminant des cellules non tumorales présentes dans le microenvironnement tumoral<sup>1</sup>. Ce microenvironnement tumoral (ou *tumor microenvironment*, TME) désigne l'ensemble des composantes non cancéreuses — à la fois cellulaires (fibroblastes, cellules immunitaires, cellules endothéliales, etc.) et non cellulaires (matrice extracellulaire, cytokines, facteurs de croissance...) — qui interagissent de manière dynamique avec les cellules tumorales. Longtemps négligé au profit de l'étude des cellules malignes, le TME est aujourd'hui reconnu comme un acteur central de la progression tumorale. Il favorise la survie, la croissance, l'invasion et la dissémination des cellules cancéreuses<sup>2</sup>. Ces dernières sont capables de remodeler leur environnement afin de créer un contexte à la fois immunosuppresseur et pro-inflammatoire, favorable à leur développement<sup>3,4</sup>.

Les cancers peuvent être classés en deux grandes catégories : les tumeurs solides, qu'elles soient primaires ou métastatiques, et les tumeurs liquides. Les tumeurs solides se développent dans des organes ou des tissus spécifiques (par exemple le sein, le poumon ou le côlon), et forment des masses compactes de cellules cancéreuses<sup>5</sup>. En revanche, les tumeurs liquides, aussi appelées hémopathies malignes, regroupent des cancers du sang comme les

leucémies, les lymphomes ou les myélomes, caractérisés par une prolifération maligne de cellules dans le sang, la moelle osseuse ou les tissus lymphoïdes, sans formation de masse solide<sup>6</sup>.

Cette distinction implique des différences majeures dans la nature du microenvironnement tumoral. Dans les tumeurs solides, le TME est spatialement structuré autour de la masse tumorale et comprend un réseau complexe de cellules stromales, immunitaires, vasculaires et de matrice extracellulaire, qui interagissent physiquement et biochimiquement avec les cellules cancéreuses. Ce microenvironnement local est souvent caractérisé par une hypoxie, une acidification, une augmentation de la pression interstitielle et un remodelage de la matrice extracellulaire, qui favorisent l'invasion et la résistance aux traitements<sup>7</sup>. À l'inverse, dans les cancers liquides, les cellules tumorales évoluent dans des environnements circulants ou lymphoïdes, et le microenvironnement se compose principalement de cellules stromales de la moelle osseuse, de cellules immunitaires, de cytokines et de facteurs solubles. L'interaction est donc moins structurée spatialement, mais repose sur des signaux moléculaires permissifs et des niches spécifiques qui soutiennent la survie, la prolifération et l'échappement immunitaire des cellules tumorales circulantes<sup>8</sup>. Par conséquent, bien que le concept de microenvironnement tumoral soit pertinent dans les deux types de cancers, sa composition, son organisation et son rôle dans la progression tumorale peuvent varier en conséquence. Le TME peut être subdivisé en trois grandes composantes : stromale, immunitaire et non cellulaire<sup>9</sup>. Les différents constituants de ces composantes sont illustrés dans la figure 1 et seront détaillés dans les sections suivantes.

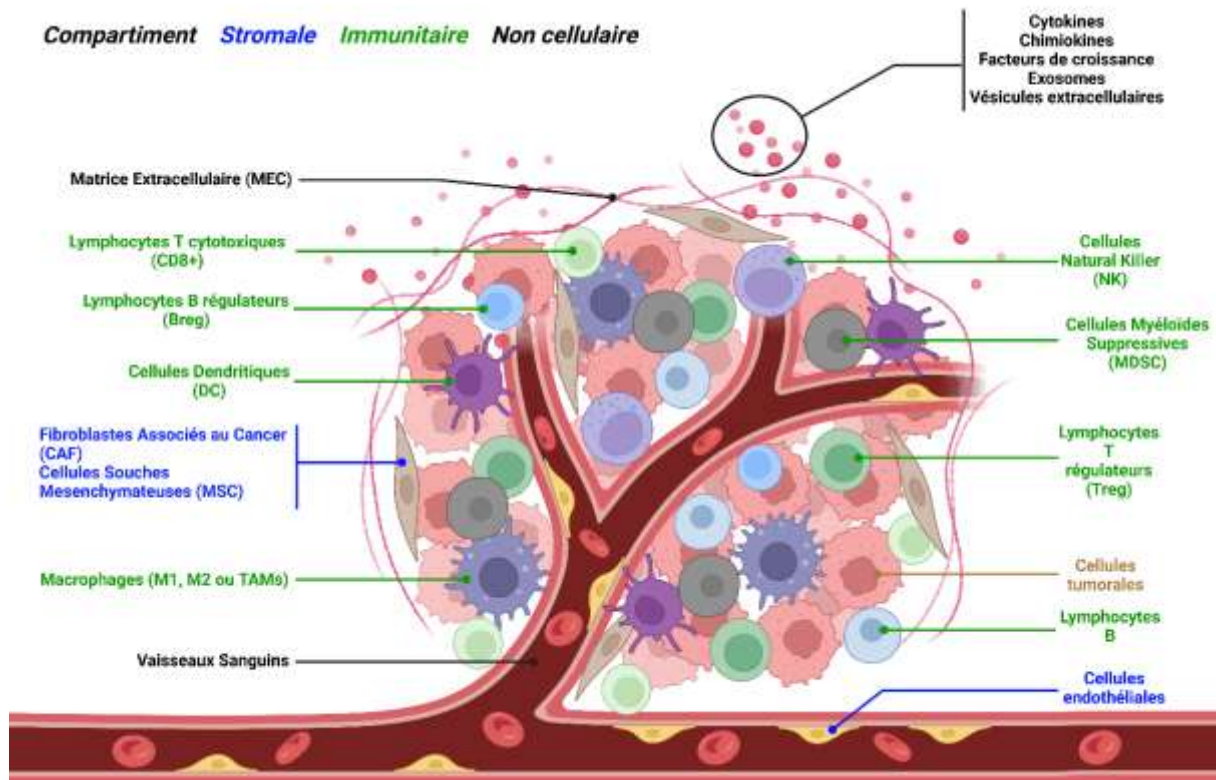


Figure 1 : Représentation schématique du Microenvironnement Tumoral (TME). Les cellules tumorales résident dans un environnement complexe que l'on peut subdiviser en trois compartiments : Stromale (en bleu), Immunitaire (en vert) et Non cellulaire (en noir). L'ensemble des acteurs du microenvironnement influence les interactions avec les cellules cancéreuses, grâce à des facteurs solubles ou à des contacts cellulaires directs. Figure réalisée avec BioRender.com.

### i. La composante stromale

La composante stromale regroupe différents types cellulaires non tumoraux, parmi lesquels les cellules souches mésenchymateuses (MSCs), les fibroblastes associés au cancer (CAFs) et les cellules endothéliales. Ces cellules sont impliquées dans le remodelage tissulaire, la sécrétion de cytokines, la régulation de l'angiogenèse et la protection des cellules tumorales contre le stress environnemental ou les traitements<sup>10</sup>.

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs), sont des cellules multipotentes retrouvées dans plusieurs tissus (moelle osseuse, tissu adipeux, cordon ombilical) capables de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes ou adipocytes<sup>11,12,13,14</sup>. Dans le contexte tumoral, elles sont attirées vers les sites de tumeur par des signaux chimiotactiques comme SDF-1/CXCL12. Une fois recrutées, elles participent activement à l'architecture pro-tumorigène du TME. La sécrétion de cytokines telles que l'IL-6 et TGF- $\beta$ , par le biais d'une activation de la

protéine STAT3 par exemple, va favoriser la prolifération, l'angiogenèse et faciliter la dissémination métastatique<sup>15,16</sup>. En parallèle, leur potentiel immunosuppresseur est souvent exploité par les cellules tumorales pour échapper à l'immunosurveillance. Par ailleurs, leur recrutement par chimiotaxie (SDF-1/CXCL12) et leur rôle dans la structuration du stroma sont très étudiés dans les tumeurs solides comme les carcinomes. Dans les cancers liquides (ex : leucémies), les MSCs de la moelle osseuse jouent un rôle clé dans les niches protectrices, mais elles ne forment pas un stroma organisé autour d'une masse – leur rôle est plus diffus, soluble et contextuel<sup>17</sup>. Elles sont identifiables par les marqueurs CD73, CD90, CD105 et l'absence de CD45 et CD34.

Les Fibroblastes Associés au Cancer (CAFs) constituent une population hétérogène de fibroblastes, dérivants des MSCs et des fibroblastes résidents, activés par les cellules tumorales. Véritables architectes du stroma tumoral, ils remodelent activement la matrice extracellulaire (MEC), favorisant l'invasion, la migration et la croissance tumorale via la sécrétion de facteurs pro-tumoraux (IL-6, TGF- $\beta$ ), pro-angiogéniques (VEGF, IL-8) et de métalloprotéinases (MMPs)<sup>18</sup>. De plus, Les CAFs participent également à l'immuno-évasion en recrutant des cellules immunosuppressives comme les Tregs et en inhibant les cellules T cytotoxiques. Les CAFs sont notamment caractérisées par l'expression de marqueurs tels que l'actine alpha du muscle lisse ( $\alpha$ -SMA), la Fibroblast Activation Protein (FAP) et le récepteur bêta du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR- $\beta$ )<sup>19,20,21</sup>.

Il est important de noter que les CAFs sont majoritairement décrits dans les cancers solides où plusieurs sous types ont été mis en évidence<sup>22,23</sup>. Bien que souvent relégués au second plan au profit des MSCs, certains travaux récents soulignent néanmoins la présence et le rôle potentiellement fonctionnel des CAFs dans certaines hémopathies malignes. Elles y présentent des propriétés analogues à celles décrites dans les tumeurs solides, notamment en matière de remodelage du microenvironnement tumoral et de soutien à la progression leucémique<sup>24</sup>.

Les cellules endothéliales tapissent les vaisseaux sanguins et jouent un rôle fondamental dans l'angiogenèse tumorale. Sous l'effet de signaux pro-angiogéniques (ex. VEGF, FGF) émis par les cellules tumorales, les CAFs et les MSCs, elles prolifèrent et forment de nouveaux vaisseaux qui nourrissent la tumeur. Cette néoangiogenèse est souvent anarchique : absence de structuration hiérarchique, irrégularité morphologique des néovaisseaux, perméabilité excessive et fonctionnalité déficiente de ces derniers. Cela favorise l'hypoxie, la perméabilité vasculaire et la dissémination métastatique. De plus, les cellules endothéliales peuvent subir des modifications phénotypiques, adoptant un profil pro-inflammatoire qui favorise l'invasion

tumorale<sup>25</sup>. Pour autant, l'angiogenèse désorganisée est un phénomène caractéristique des tumeurs solides. Dans les cancers liquides, il n'y a généralement pas de processus de néoangiogenèse tumorale localisée, puisque les cellules circulent librement dans le sang ou la lymphe. Toutefois, certains lymphomes ou leucémies agressives peuvent moduler l'angiogenèse de la moelle osseuse, mais ce rôle reste secondaire et beaucoup moins structuré<sup>26</sup>. Ainsi, la composante stromale constitue une des pierres angulaires dans le développement tumoral et l'immuno-modulation de la composante immunitaire du TME.

## ii. La composante immunitaire

La composante immunitaire regroupe, comme son nom l'indique, une multitude de types cellulaires en lien avec le système immunitaire. On y retrouve les macrophages associés aux tumeurs (TAMs), les lymphocytes T (cytotoxiques ou régulateurs) et B, les cellules dendritiques (DCs) et les cellules Natural Killer (NKs).

Les macrophages sont des cellules immunitaires issues des monocytes circulants, jouant un rôle clé dans l'immunité innée, la phagocytose, la présentation d'antigènes et la régulation des réponses inflammatoires. Leur capacité à adopter différents états fonctionnels selon les signaux du microenvironnement est appelée polarisation. Cette capacité de polarisation est caractérisée par deux phénotypes : M1 (anti-tumoraux) et M2 (pro-tumoraux). Les Macrophages Associés aux Tumeurs (TAMs) sont des macrophages infiltrant le microenvironnement tumoral, souvent orientés vers un phénotype M2 pro-tumoral. Ils sont caractéristiques des tumeurs solides et proviennent majoritairement de la différenciation de monocytes recrutés par des chimiokines tumorales. Ils sécrètent des cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- $\beta$ ), stimulent l'angiogenèse (via VEGF) et favorisent l'évasion immunitaire<sup>27</sup>. Ils sont caractérisés par l'expressions des marqueurs CD68, CD163 et CD206<sup>28</sup>. Dans les cancers liquides, les macrophages de la moelle peuvent jouer un rôle de niche protectrice, mais ils ne forment pas un réseau TAMs structuré comme dans les carcinomes<sup>29,30</sup>.

Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) sont essentiels à l'immunité antitumorale. Ils reconnaissent des antigènes tumoraux via le CMH de classe I, induisant l'apoptose des cellules cancéreuses. Leur rôle cytotoxique provient notamment de la libération de granzyme et perforine<sup>31</sup>. Les lymphocytes T régulateurs (Treg, CD4+CD25+FoxP3+) maintiennent la tolérance immunitaire et limitent les réactions auto-immunes. Dans un contexte tumoral, ils répriment la prolifération et la cytotoxicité des cellules T CD8+ et des cellules NK, notamment par la sécrétion de cytokines immunosuppressives comme TGF- $\beta$  et IL-10<sup>32,33</sup>.

Les lymphocytes B, bien que traditionnellement associés à la production d'anticorps, ont également un rôle ambivalent dans le cancer. D'une part, ils participent à la présentation d'antigènes aux cellules T et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. D'autre part, certaines sous-populations comme les B régulateurs (Bregs) peuvent favoriser l'échappement tumoral via IL-10 et TGF- $\beta$ , en favorisant la différenciation des Tregs et en supprimant les réponses effectrices<sup>34,35,36</sup>.

Les cellules dendritiques (DCs), pourtant essentielles à la présentation antigénique et à l'activation des lymphocytes T, adoptent souvent un phénotype tolérant/immature dans le TME, exprimant faiblement les molécules CD80 et CD86, ce qui compromet leur efficacité<sup>37</sup>. Cela peut conduire à une expansion des Tregs et favoriser la tolérance tumorale.

Les cellules Natural Killer (NKs), caractérisées par le CD56 et le CD16, assurent une réponse cytotoxique rapide contre les cellules tumorales indépendamment du CMH. Elles utilisent des récepteurs activateurs comme NKG2D pour détecter des cellules stressées ou transformées<sup>38,39</sup>. Néanmoins, leur activité est souvent inhibée dans les tumeurs par les Tregs, qui suppriment leur fonction par contact cellulaire direct et cytokines immunosuppressives. De plus, la présence de ligands inhibiteurs tels que HLA-E et PD-L1, présent dans le TME, contribuent à l'inhibition de leur activité cytotoxique<sup>40,41</sup>.

Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) représentent une population hétérogène de cellules dérivées de la lignée myéloïde, fréquemment enrichie dans le microenvironnement tumoral. Elles se distinguent par leur capacité à inhiber les réponses immunitaires adaptatives et innées, notamment via la suppression des lymphocytes T et NK. Deux sous-types principaux se distinguent : les M-MDSCs (monocytoïdes) et les PMN-MDSCs (polynucléaires), caractérisés respectivement par les marqueurs CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low/-</sup> et CD11b<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>. Les MDSCs exercent leurs fonctions immunosuppressives par la production d'arginase-1, d'oxyde nitrique (NO), et de ROS, ainsi que par l'expression de PD-L1<sup>42,43</sup>. Elles contribuent également à la tolérance tumorale, participant à la prolifération des cellules T régulatrices (Tregs) et en induisant l'angiogenèse, favorisant ainsi la croissance tumorale<sup>44,45,46</sup>. Leur accumulation est corrélée à un mauvais pronostic dans plusieurs types de cancers, soulignant leur rôle central dans l'évasion immunitaire et la promotion de l'angiogenèse. Pour autant, dans les hémopathies, leur rôle est moins bien caractérisé, mais certaines études récentes suggèrent leur implication dans la suppression immunitaire (ex. dans le myélome ou la LLC), bien que ce rôle soit encore émergent<sup>47</sup>.

Si certaines cellules immunitaires participent à la destruction des cellules cancéreuses (comme les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK), d'autres, sous l'influence des signaux tumoraux, peuvent acquérir des fonctions immunosuppressives qui favorisent l'échappement immunitaire et la progression tumorale (comme les TAMs et les cellules T régulatrices)<sup>48,49</sup>.

Dans un TME, les cellules cancéreuses, stromales et immunitaires interagissent de manière dynamique au sein d'un microenvironnement en perpétuelle évolution, qu'il soit spatialement structuré — comme dans les tumeurs solides — ou plus diffus et circulant — comme dans les hémopathies malignes. L'existence d'un système aussi complexe que le TME, tant dans sa réalisation que sa compréhension, nécessite cependant la présence de d'éléments non cellulaire pour assurer les différents échanges entre les composantes stromales, immunitaire et les cellules cancéreuses.

### iii. La composante non cellulaire

Dans les tumeurs solides, la matrice extracellulaire (MEC) constitue un réseau tridimensionnel structuré de macromolécules (collagènes, glycoprotéines, protéoglycanes) jouant un rôle à la fois mécanique et biochimique dans la progression tumorale. Dans ce contexte, elle joue un rôle fondamental non seulement comme échafaudage structural mais aussi comme acteur dynamique influençant la progression tumorale, l'angiogenèse, la migration cellulaire et l'immuno-modulation. Durant la tumorigenèse, la composition, la structure et la rigidité de la MEC sont profondément remaniées, favorisant un microenvironnement tumoral pro-oncogénique. Des protéines comme les collagènes fibrillaires, la fibronectine ou la ténascine-C sont surexprimées et modifient les signaux biochimiques et mécaniques reçus par les cellules cancéreuses. Cette rigidification de la MEC accroît l'invasivité tumorale via l'activation de voies de signalisation telles que YAP/TAZ et FAK. La MEC influence aussi les interactions cellule-tumeur avec les cellules immunitaires et stromales. Elle participe à l'exclusion des lymphocytes T du centre tumoral et favorise un phénotype immunosuppresseur, contribuant ainsi à l'échec des réponses immunitaires<sup>50,51,52,53</sup>. De plus, la MEC façonne les niches des cellules souches cancéreuses, soutenant leur plasticité, et leur capacité d'auto-renouvellement. Les cellules du microenvironnement tumoral sécrètent en continu des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. Ces molécules, souvent stockées ou régulées par des composants de la matrice extracellulaire (comme les protéoglycanes, association d'un GlycosAminoGlycane et d'une protéine), favorisent une inflammation chronique, une immunosuppression locale et la néoangiogenèse<sup>54,55</sup>. En parallèle, le remodelage dynamique de la MEC, par l'action d'enzymes

comme les métalloprotéinases (MMPs) ou la lysyl-oxydase (LOX), libère des signaux bioactifs et restructure l'architecture tissulaire, renforçant ainsi la permissivité tumorale<sup>56,57,58</sup>.

Dans les hémopathies malignes, la composante non cellulaire du microenvironnement tumoral ne repose pas sur une matrice extracellulaire tridimensionnelle structurée comme dans les tumeurs solides. Elle repose davantage sur une signalisation paracrine orchestrée par des médiateurs solubles (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance), produits par les cellules stromales, endothéliales, immunitaires et tumorales. Parmi ces éléments figurent les cytokines (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ), les chimiokines (CXCL12/SDF-1, CCL2), les facteurs de croissance (VEGF, SCF, TGF- $\beta$ ) et les exosomes ou vésicules extracellulaires, qui participent activement à la protection des cellules tumorales, à leur prolifération, à leur quiescence, et à l'échappement immunitaire<sup>59</sup>. Dans la moelle osseuse, ces composants non cellulaires jouent un rôle central dans la formation des niches hématopoïétiques détournées par les cellules tumorales, leur conférant une résistance aux traitements et un avantage sélectif. Les interactions moléculaires, souvent médiées par les axes CXCL12–CXCR4 et VLA-4–VCAM-1, permettent l'ancrage des cellules malignes au sein du stroma médullaire et leur protection contre les signaux pro-apoptotiques<sup>8</sup>. De plus, les vésicules extracellulaires libérées par les cellules leucémiques transportent des ARN non codants, des protéines et des lipides capables de remodeler à distance l'environnement local et systémique, favorisant la progression tumorale<sup>60</sup>. Ainsi, bien que moins architecturée que dans les cancers solides, la composante non cellulaire du TME dans les cancers liquides constitue un réseau d'interactions fonctionnelles essentiel, assurant la communication intercellulaire, le contrôle de l'immunité, et la maintenance des niches leucémiques.

## B. Mécanismes de communications cellulaires

Le dialogue entre les cellules tumorales et leur microenvironnement repose sur une diversité de mécanismes de communication, incluant à la fois des signaux solubles (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance) et, dans certaines conditions, des interactions physiques par contact direct<sup>61,62</sup>. Ces échanges dynamiques participent à la création d'un environnement permissif, favorisant l'évasion immunitaire, la résistance aux traitements et la progression tumorale<sup>63,64</sup>. Que ce soit dans les tumeurs solides, via le remodelage du stroma et l'angiogenèse, ou dans les cancers liquides, via la création des niches hématopoïétiques, les cellules malignes adaptent leur environnement à leurs besoins. Ces mécanismes font l'objet d'études approfondies, parfois en interaction, mais il est intéressant de noter que la signalisation par facteurs soluble apparaît comme légèrement plus étudiée en termes de volume de

publications. Cela s'explique en partie grâce à sa simplicité expérimentale et son applicabilité à divers modèles biologiques<sup>65</sup>.

### i. Facteurs solubles

Dans le TME, les cellules cancéreuses et les cellules des autres composantes dialoguent en grande partie via des facteurs solubles, contribuant à la progression tumorale, à l'immunosuppression et à la résistance aux traitements. Ce principe s'applique aussi bien aux tumeurs solides qu'aux cancers liquides comme les leucémies, les lymphomes et les myélomes, bien que leur microenvironnement réside principalement dans la moelle osseuse ou les organes lymphoïdes secondaires<sup>59</sup>. Les cytokines sont des médiateurs clés dans ce réseau de communication. Par exemple, l'IL-6, produite par les cellules tumorales de certains carcinomes et les CAFs, favorise la prolifération tumorale et l'échappement immunitaire via l'activation de la voie JAK/STAT3<sup>66</sup>. Ce mécanisme est aussi observé dans le myélome multiple, où l'IL-6 soutient la croissance et la survie des plasmocytes tumoraux<sup>67</sup>. L'IL-10, quant à elle, est une cytokine immunosuppressive sécrétée par les MDSCs, contribuant à l'inhibition des lymphocytes T effecteurs dans le TME de certains mélanome<sup>68</sup>. Ce mécanisme est également observé dans les hémopathies malignes, comme le myélome multiple, où l'IL-10 dérivée des MDSCs module la fonction des lymphocytes T pour favoriser l'évasion immunitaire<sup>69</sup>.

Les chimiokines, telles que CXCL12 (SDF-1), jouent un rôle dans l'attraction des cellules immunitaires régulatrices et des cellules souches tumorales via son récepteur CXCR4, favorisant la formation de niches favorables à la tumeur<sup>70</sup>. Le couple CXCL12/CXCR4 est essentiel dans l'homing, la survie et la dissémination des cellules tumorales, ainsi que dans la structuration du microenvironnement tumoral dans de nombreux cancers solides (sein, poumon, glioblastome, etc). Ce couple est aussi crucial dans les leucémies, notamment pour l'ancrage des cellules leucémiques dans la niche médullaire, où elles échappent aux traitements<sup>8</sup>. La chimiokine CCL2, produite par les TAMs, recrute d'autres cellules immunosuppressives comme les monocytes et renforce l'inflammation chronique pro-tumorale. Ce mécanisme est également observé dans la moelle osseuse des patients atteints de myélome ou de leucémie aiguë myéloïde<sup>71</sup>.

Les facteurs de croissance sont également omniprésents dans le TME. Le VEGF (vascular endothelial growth factor), sécrété par les cellules tumorales et stromales, induit l'angiogenèse tumorale en stimulant la prolifération et la migration des cellules endothéliales dans de nombreux cancers solide (sein, rein, poumons, etc)<sup>72</sup>. Dans les cancers liquides, le VEGF est

impliqué dans la néoangiogenèse médullaire et favorise un microenvironnement propice à la prolifération tumorale, notamment dans la LAM et le myélome multiple<sup>73</sup>. Le TGF- $\beta$  est un facteur multifonctionnel qui promeut la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), la fibrose du stroma et la suppression des lymphocytes T cytotoxiques. De nombreuses études ont mis en lumière ce rôle dans des pathologies telles que les carcinomes épidermoïdes, le cancer colorectal ou encore du pancréas<sup>74</sup>. Ce facteur est également produit par les cellules de la LLC, participant à la protection des cellules tumorales contre le système immunitaire<sup>75</sup>.

Enfin, les vésicules extracellulaires (exosomes et microvésicules) sont des vecteurs majeurs de la communication intercellulaire. Les exosomes dérivés des cellules tumorales contiennent des protéines, des ARN non codants (miRNA, lncRNA), et des lipides qui peuvent remodeler le TME. Par exemple, des exosomes enrichis en miR-21 sont capables d'induire une polarisation M2 des macrophages, favorisant ainsi un environnement immunosuppresseur et pro-tumoral dans certains mélanomes et gliomes<sup>76</sup>. Dans les cancers liquides, les exosomes issus de cellules leucémiques ou myélomateuses modulent également leur environnement, en transférant des facteurs pro-survie, en favorisant la résistance aux médicaments et en reprogrammant les cellules stromales<sup>77,78</sup>.

## ii. Contacts cellulaires directs

Outre les signaux solubles, la communication dans le TME repose aussi sur des interactions directes entre cellules, essentielles pour coordonner la réponse tumorale et la réorganisation du stroma. Ces interactions s'appuient sur plusieurs mécanismes structuraux et moléculaires, dont certains sont également observés dans les cancers liquides, bien que le contexte spatial y soit différent.

Les jonctions adhérentes, majoritairement médiées par les cadhérines, permettent la cohésion cellulaire dans les tissus épithéliaux. L'expression aberrante de E-cadhérine ou son remplacement par N-cadhérine lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un marqueur d'agressivité tumorale et de capacité d'invasion accrue dans les tumeurs solides<sup>79</sup>. En revanche, ce mécanisme est peu impliqué dans les hémopathies malignes, où les cellules tumorales circulantes ne forment pas de structures épithéliales.

Les jonctions serrées, constituées de protéines telles que les claudines et occludines, régulent la perméabilité paracellulaire. Leur dysrégulation a été associée à la dissémination

tumorale dans plusieurs cancers solides, comme le sein ou le pancréas<sup>80</sup>, mais elles sont rarement pertinentes dans les hémopathies.

Les synapses immunologiques sont des contacts structurés entre cellules immunitaires (comme les lymphocytes T) et cellules présentatrices d'antigènes. Dans le TME, leur altération, notamment par l'expression de molécules immunosuppressives telles que PD-L1 ou Galectine-9, conduit à une anergie des cellules T<sup>81</sup>. Ce mécanisme est crucial également dans les leucémies et lymphomes, où les synapses sont directement perturbées dans les ganglions ou la moelle osseuse tumorale<sup>82</sup>.

Les gap junctions, formés par des connexines (par ex. Connexine 43), permettent le transfert direct de petites molécules entre cellules. Leur rôle est ambivalent : elles peuvent, selon le contexte, propager des signaux pro-tumoraux ou restaurer une homéostasie cellulaire<sup>83</sup>. Dans les cancers liquides, des connexines comme la Connexine 43 sont exprimées dans le microenvironnement médullaire, facilitant des échanges entre cellules leucémiques et stromales, influençant la progression tumorale et la chimiorésistance<sup>84</sup>.

Enfin, les contacts par nanotubes membranaires (Tunneling Nanotubes, TNTs) ont été identifiés comme un moyen de transfert intercellulaire de mitochondries, de facteurs pro-survie ou même de matériel génétique. Ce mécanisme est présent dans les cancers solides (notamment glioblastome et pancréas), mais aussi dans les leucémies aiguës et chroniques, où les TNTs relient les cellules tumorales entre elles ou aux cellules du stroma médullaire, favorisant la survie et la résistance aux traitements<sup>85,86</sup>.

Comme nous venons de le voir, le microenvironnement tumoral ne constitue pas un simple cadre passif entourant les cellules cancéreuses. Constitué de pléthore d'acteurs cellulaires et non cellulaires, le TME représente une entité hautement dynamique qui évolue en étroite interdépendance avec la tumeur. De fait, il participe activement à toutes les étapes de la tumorigenèse, de l'initiation à la dissémination métastatique<sup>87</sup>. Cette dynamique repose sur des interactions bidirectionnelles entre les cellules tumorales et les divers composants du TME, qui sont progressivement remodelés au cours du développement tumoral.

## C. La dynamique du TME en lien avec la progression tumorale

Durant la progression tumorale, les cellules cancéreuses modifient et rééduquent le microenvironnement à leur profit par le biais de signaux biochimiques (cytokines, chimiokines, exosomes), favorisant ainsi l'expansion d'un TME pro-tumoral. Par exemple, les fibroblastes associés au cancer (CAF) acquièrent un phénotype activé qui soutient la croissance tumorale via la sécrétion de facteurs proangiogéniques (VEGF), de métalloprotéinases matricielles (MMPs) facilitant l'invasion, ou encore de cytokines immunosuppressives telles que TGF- $\beta$  et IL-6<sup>88,89</sup>. De même, les TAMs, initialement de type M1 anti-tumoraux, adoptent un phénotype M2 sous l'effet des signaux tumoraux, contribuant à l'échappement immunitaire et à la promotion de l'angiogenèse<sup>90</sup>.

Ce remodelage progressif du TME reflète une plasticité fonctionnelle qui s'inscrit dans une co-évolution entre cellules cancéreuses et leur niche. En réponse aux stress environnementaux — tels que l'hypoxie, l'acidose ou les contraintes mécaniques — les cellules tumorales adaptent leur phénotype, ce qui se manifeste par des transitions épithélio-mésenchymateuses (EMT), un renforcement de la capacité migratoire et invasive, ainsi qu'une augmentation de la tolérance aux agents thérapeutiques<sup>91</sup>. Ces adaptations sont souvent accompagnées de modifications concomitantes du TME, telles que l'activation de nouveaux CAF, le recrutement de cellules immunosuppressives ou l'altération de la composition de la MEC<sup>92</sup>.

Un concept central de cette dynamique est celui de reprogrammation du TME par les cellules tumorales. Cette reprogrammation repose sur l'exploitation par les cellules cancéreuses de mécanismes de communication cellulaire, notamment via des exosomes qui transportent des microARN, des protéines et des métabolites capables de modifier le comportement des cellules stromales ou immunitaires à distance<sup>93</sup>. À titre d'exemple, certains exosomes tumoraux induisent une différenciation des monocytes en macrophages de type M2, ou favorisent la transformation de fibroblastes en CAF pro-invasifs<sup>94</sup>. Cette reprogrammation permet à la tumeur de créer un microenvironnement sur mesure, propice à sa survie et à son expansion.

Le TME joue également un rôle déterminant dans la résistance aux traitements. Plusieurs mécanismes ont été décrits, incluant la séquestration des agents thérapeutiques par la matrice extracellulaire, la protection physique conférée par des niches cellulaires

spécialisées (ex. niches périvasculaires), ou encore la modulation de la réponse immunitaire antitumorale. Par exemple, les CAF peuvent induire une résistance à la chimiothérapie par sécrétion d'IL-6 ou de facteurs anti-apoptotiques<sup>95</sup>, tandis que les TAM contribuent à la résistance à l'immunothérapie en exprimant des ligands inhibiteurs tels que PD-L1<sup>96</sup>.

Parmi les mécanismes évoqués, tous sont applicables aux cancers solides mais pas nécessairement aux cancers liquides. Les hémopathies malignes ont un microenvironnement distinct, situé dans des niches hématopoïétiques (moelle osseuse, ganglions, rate). Il n'y a pas de CAF au sens histologique classique, l'EMT ne concerne pas les cellules hématopoïétiques et la MEC est moins bien structurée que dans les tumeurs solides. Dans les cancers liquides tels que les leucémies, les lymphomes ou le myélome multiple, le rôle du microenvironnement tumoral prend la forme particulière de la niche hématopoïétique médullaire, un espace spécialisé initialement destiné au maintien de l'hématopoïèse normale. Cette niche est progressivement détournée et remodelée par les cellules tumorales pour soutenir leur propre expansion. Des signaux solubles tels que l'IL-6, le TGF- $\beta$  et CXCL12, ainsi que des exosomes tumoraux enrichis en miARNs ou facteurs pro-survie, participent à la reprogrammation des cellules stromales, favorisant la survie, la prolifération et la résistance des cellules tumorales<sup>97,98</sup>. Dans un contexte de stress hypoxique chronique, les cellules tumorales adaptent leur métabolisme et intensifient la libération d'exosomes, renforçant les propriétés immunosuppressives et pro-angiogéniques du TME<sup>99</sup>. De plus, le recrutement de macrophages M2-like et la formation de niches protectrices contribuent à l'évasion immunitaire et à la résistance aux chimiothérapies, par exemple en réduisant l'accès des agents aux cellules tumorales ou en inhibant l'apoptose via des voies de survie spécifiques<sup>100</sup>. Pour résumer, les principes de reprogrammation et de communication via cytokines, exosomes, ou stress environnemental sont valables pour les cancers liquides, mais les acteurs (CAF, MEC, EMT) varient en nature et fonction dans le contexte hématopoïétique.

Ainsi, dans les hémopathies malignes comme dans les tumeurs solides, la progression tumorale est indissociable d'un remodelage dynamique du microenvironnement, orchestré par des mécanismes d'adaptation et de communication cellulaire complexes. En effet, le microenvironnement tumoral s'impose comme un acteur dynamique, capable d'évoluer, de s'adapter et de soutenir activement la progression cancéreuse à travers des mécanismes complexes de communication, de reprogrammation cellulaire et de plasticité phénotypique.

Parmi les leviers essentiels de cette adaptation conjointe entre cellules tumorales et cellules du stroma, la modulation du métabolisme cellulaire occupe une place centrale. En réponse aux contraintes du TME — hypoxie, stress oxydatif, carence en nutriments — les cellules cancéreuses activent des voies métaboliques alternatives leur conférant un avantage sélectif. Ce remodelage métabolique ne touche pas uniquement les cellules tumorales : fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales et lymphocytes infiltrants adoptent eux aussi des profils métaboliques spécifiques, façonnés par les signaux tumoraux. Il en résulte un paysage métabolique hétérogène mais cohérent, orienté vers le soutien de la croissance tumorale et l'échappement immunitaire.

Comprendre cette synergie métabolique nécessite de revenir aux bases mêmes du métabolisme cellulaire. Le chapitre suivant proposera donc un rappel des grandes voies métaboliques — glycolyse, cycle de Krebs, phosphorylation oxydative — avant d'explorer la manière dont ces circuits fondamentaux sont reconfigurés dans le contexte tumoral.

## II. Métabolisme cellulaire et adaptation tumorale

### A. Rappels des voies métaboliques dans une cellule humaine saine

Au cours du XIX<sup>e</sup> siècle, les travaux de Louis Pasteur sur la fermentation alcoolique ont mis en lumière les capacités métaboliques des microorganismes. Une trentaine d'années plus tard, les chimistes Eduard et Hans Buchner ont mis en évidence le rôle fondamental des enzymes—des biocatalyseurs accélérant les réactions biochimiques—dans ce processus. Ces découvertes, parmi d'autres, ont progressivement permis de construire la définition contemporaine du métabolisme.

Le métabolisme désigne l'ensemble des réactions chimiques se déroulant au sein de l'organisme. Il comprend le métabolisme énergétique, qui regroupe les différentes voies et réactions permettant de produire l'énergie indispensable aux fonctionnements des cellules. On peut distinguer trois fonctions majeures du métabolisme : produire de l'énergie pour soutenir les processus cellulaires (prolifération, division, etc.), transformer les nutriments en éléments de base pour fabriquer des macromolécules essentielles (protéines, lipides, glucides et acides nucléiques), et enfin, recycler et éliminer les déchets issus de ces transformations.

Les réactions métaboliques se répartissent en deux grandes catégories : l'anabolisme et le catabolisme. L'anabolisme désigne l'ensemble des réactions de biosynthèse, par lesquelles

des composés complexes (comme les protéines, les lipides ou les acides nucléiques) sont élaborés à partir de précurseurs simples, avec consommation d'énergie. À l'inverse, le catabolisme regroupe les réactions de dégradation de molécules complexes en composés plus simples, accompagnées d'une libération d'énergie.

L'ensemble des réactions métaboliques a été organisé en réseaux appelés voies métaboliques, interconnectés entre elles. Au sein d'une voie métabolique, un substrat chimique A est transformé, via une succession d'étapes enzymatiques (et d'intermédiaires réactionnels), en un produit final B. L'étude du métabolisme a atteint son apogée jusqu'au milieu du XX<sup>e</sup> siècle, période durant laquelle les principales voies métaboliques ont été élucidées : la Glycolyse (par G. Embden, O. Meyerhof et J.K. Parnas), le cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs, par H.A. Krebs), la chaîne respiratoire mitochondriale (par H. Kalckar, F. Lipmann, A. Lehninger, P. Mitchell, entre autres), la Biosynthèse des Acides Gras ( par S. J. Wakil, F. Lynen, entre autres) et l'oxydation des acides gras (par F. Lynen).

### i. Glycolyse (Voie Embden-Meyerhof-Parnas)

La glycolyse, ou voie Embden-Meyerhof-Parnas, constitue l'un des piliers du métabolisme énergétique cellulaire. Véritable cas d'école enseigné aux étudiants du supérieur, elle a par ailleurs grandement contribué à éveiller mon intérêt pour la biochimie dans son ensemble. Cette voie permet la conversion d'une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate, générant un gain net de deux ATP et deux NADH. Ce processus se déroule en dix étapes enzymatiques, regroupées en deux phases : la phase d'investissement en énergie et la phase de gain énergétique (Figure 2)<sup>101</sup>.

Lors de la première phase, le glucose est phosphorylé successivement par l'Hexokinase (HK) et la Phosphofructokinase-1 (PFK-1), réactions irréversibles et fortement régulées, produisant le Fructose-1,6-Bisphosphate. Ce dernier est clivé en deux Trioses Phosphates par l'Aldolase. Dans la seconde phase, ces Trioses sont convertis en Pyruvate, accompagnés par la production d'ATP via des réactions catalysées par la Phosphoglycérate Kinase (PGK) et la Pyruvate Kinase (PK)<sup>102</sup>. L'ensemble du processus peut s'opérer en l'absence d'oxygène, ce qui en fait une voie métabolique cruciale dans des conditions anaérobies, comme dans les tissus hypoxiques ou chez certains microorganismes<sup>103</sup>.

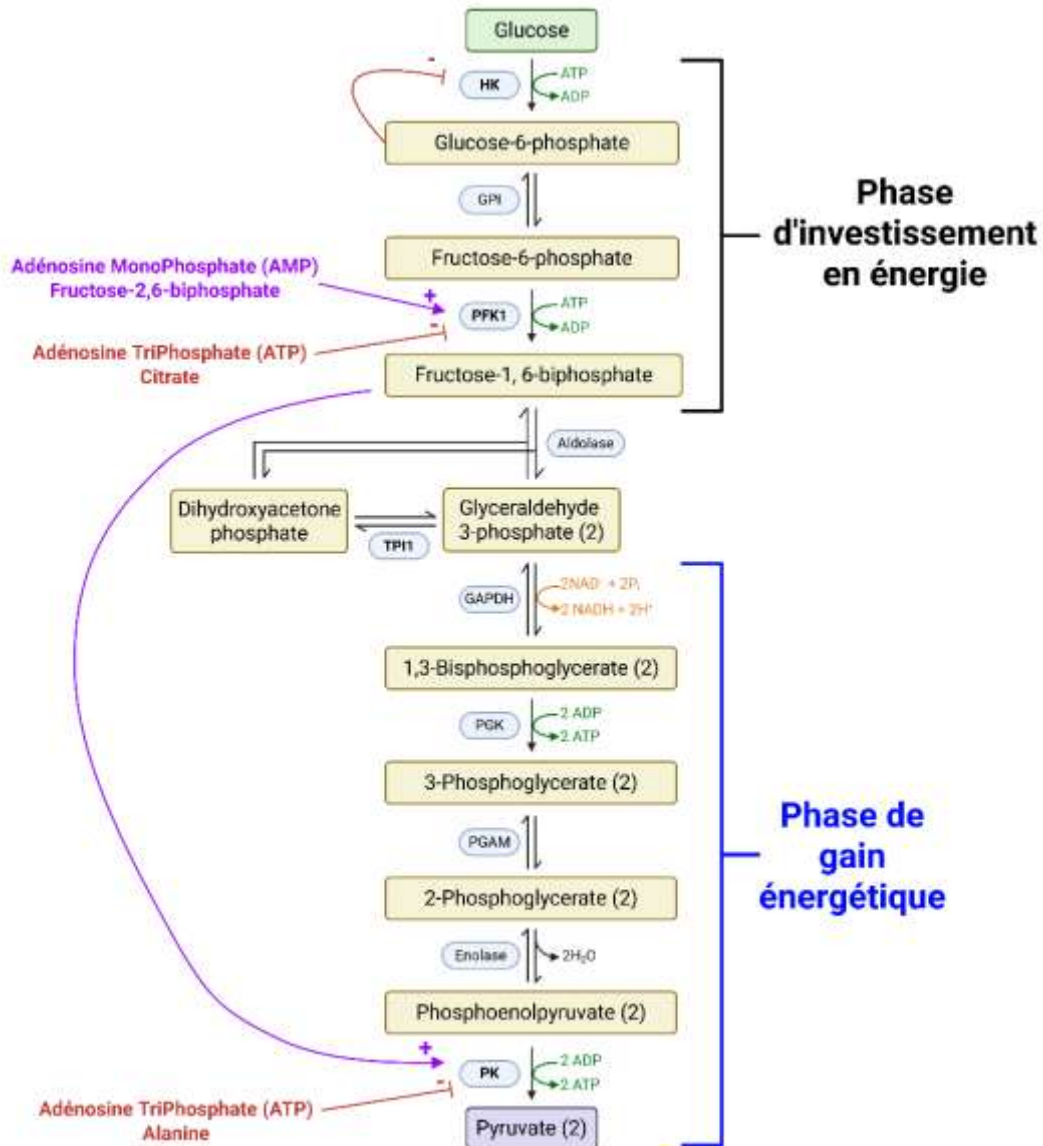


Figure 2 : **Représentation schématique de la voie de la Glycolyse.** La voie de la glycolyse est constituée d'une succession d'étape enzymatiques que l'on peut répartir selon deux phases : investissement et gain d'énergie. A partir d'une molécule de Glucose, cette voie assure la production de deux molécules de Pyruvate et génère un gain net de deux molécules d'ATP et deux molécules de NADH. Certaines des enzymes impliquées, telles que l'Hexokinase (HK), la Phosphofructokinase-1 (PFK-1) et la Pyruvate Kinase (PK), font l'objet de point régulation majeurs (positives en violet, négatives en rouge). Figure réalisée avec BioRender.com.

Il est important de noter que trois enzymes catalysent des étapes hautement exergoniques – qui libèrent de l'énergie – et constituent des points de régulation majeurs : l'hexokinase, la phosphofructokinase-1 (PFK-1), et la pyruvate kinase. La régulation allostérique joue un rôle central dans le contrôle de la glycolyse.

L'hexokinase (HK) est soumise à une rétro-inhibition par son produit, le glucose-6-phosphate (Glc-6-P).

La PFK-1, souvent considérée comme l'étape limitante de la voie, est activée par l'Adénosine MonoPhosphate (AMP) et le fructose-2,6-bisphosphate, indicateurs d'un faible état énergétique. La PFK-1 est inhibée par l'Adénosine Tri Phosphate (ATP) et le citrate, témoignant d'une charge énergétique suffisante<sup>102</sup>.

De manière assez élégante, la pyruvate kinase (PK) est activée par le fructose-1,6-bisphosphate par un effet feedforward et inhibée par l'ATP et l'alanine<sup>102</sup>. L'effet feedforward, que l'on peut traduire par une activation anticipatrice, est un mécanisme de régulation métabolique préparant la cellule à un flux métabolique accru. Contrairement à la rétro-inhibition (feedback), où le produit final inhibe une étape antérieure, ici c'est un intermédiaire précoce (fructose-1,6-bisphosphate) qui stimule une étape ultérieure (action de la PK).

Ces mécanismes de contrôles permettent une bonne synchronisation des différentes étapes de la voie pour éviter les accumulations d'intermédiaires. Ainsi, la régulation de la Glycolyse permet une adaptation fine aux besoins métaboliques de la cellule, en modulant l'entrée et le flux de glucose à travers la voie. Au-delà de son implication dans la production d'ATP, la glycolyse assure un rôle biosynthétique essentiel, fournissant des intermédiaires pour la synthèse des acides aminés, des nucléotides et des lipides via des voies dérivées comme la voie des pentoses phosphates<sup>104</sup>.

## ii. Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique), localisé dans la matrice mitochondriale, est une voie métabolique centrale dans le catabolisme énergétique aérobie. Le point de départ de cette succession de réaction est la molécule d'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA (molécule à 3 Carbones) peut être synthétiser à l'issu de la  $\beta$ -oxydation, une autre voie métabolique qui sera abordée ultérieurement. Il peut également être produit par la dégradation d'acides aminés ou à l'issu de la glycolyse via la molécule de Pyruvate (molécule à 4 Carbones) sous l'action de la Pyruvate Dehydrogenase (PyrDH). Le détail de cette voie est illustré dans la figure 3 et ses différentes étapes seront discuté dans les paragraphes suivant.

Ce cycle commence par la condensation de l'acétyl-CoA avec l'oxaloacétate pour former le citrate via une enzyme nommée Citrate Synthase. Le citrate est ensuite isomérisé en isocitrate (via l'aconitase), puis décarboxylé en  $\alpha$ -cétoglutarate, une étape régulée par

l'isocitrate déshydrogénase, libérant du CO<sub>2</sub> et réduisant du NAD<sup>+</sup> en NADH. L' $\alpha$ -cétoglutarate est à son tour converti en succinyl-CoA par l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase, avec production de CO<sub>2</sub> et de NADH. La transformation du succinyl-CoA en succinate libère un GTP (ou ATP), suivie d'une réoxydation progressive via le fumarate et le malate, ramenant enfin à l'oxaloacétate<sup>105,106</sup>.

Le cycle de Krebs fournit des équivalents réduits (NADH, FADH<sub>2</sub>) qui alimentent la chaîne respiratoire pour la production d'ATP, jouant ainsi un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique des cellules eucaryotes. Il constitue aussi une plateforme pour la biosynthèse d'acides aminés, de bases azotées et de porphyrines. La régulation du cycle repose sur trois enzymes clés : la citrate synthase, l'isocitrate déshydrogénase, et l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase, toutes soumises à une régulation allostérique par des indicateurs énergétiques.

Le NADH et l'ATP agissent comme inhibiteurs, signalant un excès énergétique, tandis que l'ADP, le Ca<sup>2+</sup> et le NAD<sup>+</sup> activent ces enzymes, traduisant un besoin énergétique accru<sup>107,108</sup>.

Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que ce cycle s'intègre dans un réseau métabolique global. De par la nature et la provenance diverse des molécules qu'il utilise pour fonctionner, le cycle de Krebs est souvent comparé à un carrefour bioénergétique et biosynthétique. Ainsi, cela souligne le caractère versatile des cellules pour adapter les voies métaboliques à leur disposition en fonction des conditions physiologiques comme l'hypoxie, la croissance cellulaire rapide et la disponibilité en nutriments.

Ainsi, les produits réduits issus du cycle de Krebs, en particulier le NADH et le FADH<sub>2</sub>, sont des acteurs essentiels pour la suite de ce carrefour bioénergétique. En effet, ces coenzymes transportent les électrons vers la chaîne respiratoire mitochondriale, où leur réoxydation permet la synthèse massive d'ATP par le biais du couplage chimiosmotique. Cette étape terminale, localisée dans la membrane interne mitochondriale, assure l'essentiel de la production énergétique cellulaire et matérialise le lien fonctionnel entre le catabolisme intermédiaire et la phosphorylation oxydative.

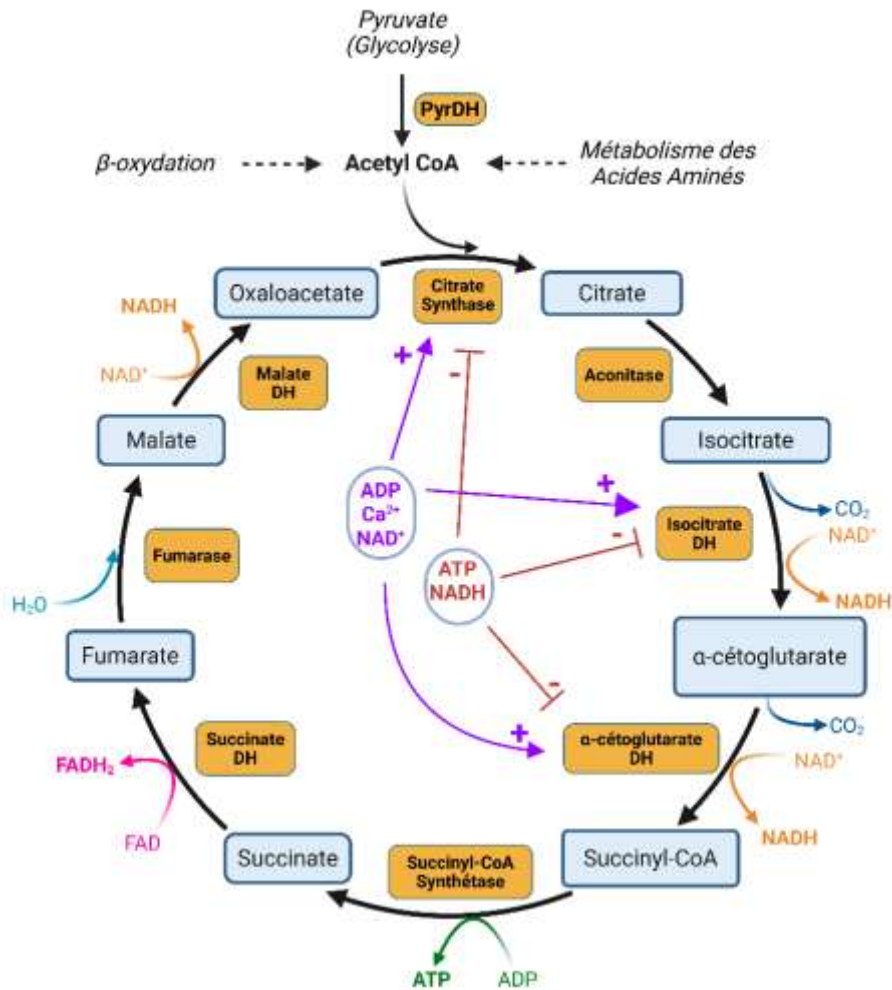


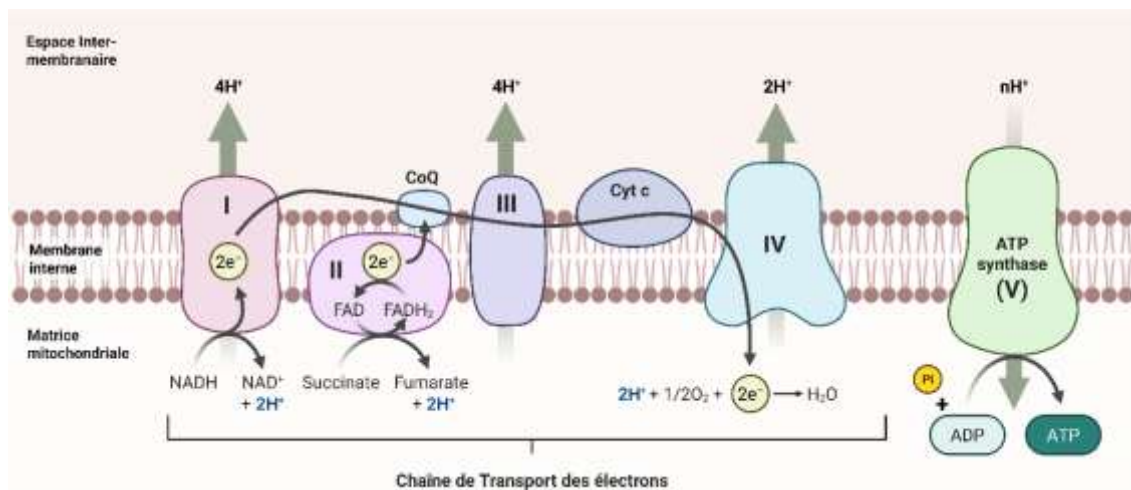
Figure 3 : **Représentation schématique du cycle de Krebs.** Cette voie métabolique permet à la cellule de générer de l'énergie sous forme d'ATP mais également des équivalents réduits ( $\text{NADH}$  et  $\text{FADH}_2$ ) qui seront utilisés dans la chaîne respiratoire. De nombreux indicateurs énergétiques intracellulaire peuvent réguler cette voie de manière positive ( $\text{ADP}$ ,  $\text{NAD}^+$ ) ou négative ( $\text{ATP}$ ,  $\text{NADH}$ ). Figure réalisée avec BioRender.com.

### iii. La Chaîne respiratoire mitochondriale

En présence d'oxygène, ou aérobie, les cellules tendent à oxyder complètement le glucose dans les mitochondries via un processus de Phosphorylation Oxydative pour maximiser le rendement énergétique. La chaîne respiratoire mitochondriale, ou chaîne de transport d'électrons, constitue la dernière étape du catabolisme énergétique aérobie. Localisée dans la membrane interne mitochondriale, elle est composée de cinq complexes protéiques numérotés I à V (Figure 4). Les électrons issus du  $\text{NADH}$  et du  $\text{FADH}_2$ , produits notamment par le cycle de Krebs, sont transférés séquentiellement à travers les complexes I ( $\text{NADH}$  déshydrogénase), II (succinate déshydrogénase), III (complexe cytochrome  $\text{bc}_1$ ) et IV (cytochrome c oxydase),

avant de réduire l'oxygène moléculaire en eau. Ce transfert s'accompagne d'un pompage de protons vers l'espace intermembranaire, générant un gradient électrochimique — ou force proton-motrice — utilisé par le complexe V (ATP synthase) pour phosphoryler l'ADP en ATP<sup>109,110</sup>.

Cette phosphorylation oxydative représente la principale source d'énergie chimique pour les cellules eucaryotes. La chaîne respiratoire mitochondriale est finement régulée pour assurer un équilibre entre production d'ATP, prévention du stress oxydatif et adaptation aux besoins métaboliques cellulaires. Cette régulation repose sur plusieurs niveaux de contrôle, allant de la disponibilité en substrats à des mécanismes allostériques, transcriptionnels et post-traductionnels.



*Figure 4 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette voie métabolique permet à la cellule de convertir l'énergie chimique des coenzymes réduits (NADH et FADH<sub>2</sub>) en ATP, forme universelle de l'énergie cellulaire. Le transfert d'électrons assuré successivement par les complexes I à IV assurent la réduction de l'oxygène moléculaire en eau (H<sub>2</sub>O). Le complexe V utilise le gradient électrochimique (créer par le pompage de protons H<sup>+</sup> depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire) pour produire de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi). Ce processus est appelé Phosphorylation Oxydative. Figure réalisée avec BioRender.com.*

Le facteur limitant principal est la disponibilité en NADH, ADP, O<sub>2</sub> et phosphate inorganique (Pi). Le rapport ADP/ATP constitue un signal clé : une augmentation de l'ADP stimule l'activité de l'ATP synthase (complexe V), ce qui intensifie le flux de protons à travers la membrane interne et accélère la chaîne respiratoire en amont<sup>111</sup>. Certains complexes sont

soumis à des modulations allostériques. Par exemple, le complexe IV (cytochrome c oxydase) est inhibé par l'ATP lorsque la demande énergétique est faible, permettant d'éviter une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)<sup>112</sup>. Le complexe I peut également être modulé par le rapport NADH/NAD<sup>+</sup>, influençant le taux de transfert d'électrons. Des modifications post-traductionnelles, notamment des phosphorylations spécifiques de sous-unités, modulent l'activité des complexes. Par exemple, la phosphorylation du cytochrome c peut diminuer le flux électronique et réguler l'entrée dans l'apoptose mitochondrie-dépendante, agissant comme un régulateur à la croisée du métabolisme et de la signalisation cellulaire<sup>113</sup>. À long terme, la régulation passe aussi par l'expression des gènes mitochondriaux et nucléaires codant pour les complexes respiratoires, en réponse à des signaux comme l'AMPK, le rapport NAD<sup>+</sup>/NADH ou le stress oxydatif. Ces signaux activent des facteurs tels que PGC-1 $\alpha$ , qui stimulent la biogenèse mitochondriale et l'adaptation métabolique<sup>110</sup>.

Par ailleurs, un déséquilibre dans la chaîne respiratoire peut mener à une surproduction de ROS, ce qui rend son activité dépendante de mécanismes antioxydants et de boucles de rétrocontrôle métabolique<sup>114</sup>. Bien que la chaîne respiratoire mitochondriale soit principalement dédiée à la production d'ATP via la phosphorylation oxydative, elle est aussi la principale source endogène de ROS dans la cellule. Au cours du transfert des électrons le long des complexes I à IV, une petite proportion (environ 0,1 à 2 %) d'électrons peut fuir prématurément vers l'oxygène moléculaire, formant l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Cette génération est particulièrement marquée au niveau des complexes I et III, où l'instabilité des intermédiaires redox favorise le transfert univalent vers l'oxygène<sup>109,110</sup>. Le superoxyde est ensuite converti en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par la superoxyde dismutase (SOD) mitochondriale. Bien que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> soit moins réactif, il peut, en présence de métaux de transition (Fe<sup>2+</sup>), engendrer des radicaux hydroxyles (•OH) extrêmement toxiques par la réaction de Fenton. Ces ROS peuvent endommager l'ADN mitochondrial, les lipides membranaires et les protéines enzymatiques, favorisant des processus pathologiques comme l'apoptose, la neurodégénérescence ou le vieillissement cellulaire<sup>113</sup>. Cependant, à faible dose, les ROS ne sont pas délétères : ils participent à une signalisation mitochondriale adaptative dite « mitohormétique », régulant l'expression de gènes antioxydants, la biogenèse mitochondriale et l'adaptation au stress<sup>114</sup>. La balance entre la production de ROS et leur élimination par des systèmes antioxydants (SOD, glutathion peroxydase, catalase) est donc essentielle au maintien de l'homéostasie cellulaire.

#### iv. Autres voies métaboliques

Les précédentes voies métaboliques abordées ne constituent en réalité qu'une fraction de l'ensemble des voies métaboliques présente au sein de nos cellules. En effet, au travers des exemples déjà abordés, nous pouvons constater que l'intrication des différentes voies métabolique rend la compréhension du métabolisme cellulaire relativement délicat et complexe. Cependant, il existe de nombreuses autres voies métaboliques, qui sont fortement lié à celles que nous venons de voir. En conditions physiologiques, selon les besoins et types cellulaires, il existe des voies métaboliques capable d'alimenter ou puiser dans les voies déjà abordées. Parmi celles-ci, on peut retrouver le métabolisme des Acides Gras, du Glycogène ou encore la voie des pentoses phosphates.

Le métabolisme des acides gras repose sur deux processus complémentaires : la biosynthèse, qui est anabolique, et la  $\beta$ -oxydation, qui est catabolique. Ensemble, ces voies permettent le stockage et la libération d'énergie, en fonction des besoins physiologiques de la cellule. La biosynthèse des acides gras consiste en la création de chaînes carbonées saturées à partir d'unités d'acétyl-CoA, forme activée de l'acide acétique possédant 2 atomes de Carbone. Cette biosynthèse se déroule principalement dans le cytosol, tandis que la  $\beta$ -oxydation dégrade ces acides gras dans les mitochondries pour produire de l'ATP. La biosynthèse débute par la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA via l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), une étape irréversible et limitante. Ce malonyl-CoA est ensuite utilisé par la Fatty Acid Synthase (FAS), un complexe enzymatique multifonctionnel, qui procède à une série de réactions répétitives—condensation, réduction, déshydratation, puis réduction—prolongeant la chaîne acylée de deux carbones à chaque cycle jusqu'à formation de l'acide palmitique (16 Carbones)<sup>115</sup>. Le contrôle de cette voie est assuré par un réseau finement régulé de mécanismes transcriptionnels (SREBP-1 régule FAS et ACC), post-traductionnelle (phosphorylation inhibitrice d'ACC par l'AMPK), allostériques (Citrate active ACC) et hormonaux<sup>115</sup>. Ce système de régulation dynamique permet à la cellule d'adapter la biosynthèse des acides gras selon les états nutritionnels et énergétiques. Toutefois, lorsque les besoins énergétiques deviennent primordiaux, comme en période de jeûne ou d'effort prolongé, la cellule active la voie complémentaire du métabolisme lipidique : la  $\beta$ -oxydation mitochondriale<sup>116,117</sup>.

L'oxydation des acides gras, ou  $\beta$ -oxydation (aussi appelée cycle de Lynen), est un processus mitochondrial clé dans lequel les acides gras à longue chaîne sont convertis en acétyl-CoA, après leur activation en acyl-CoA dans le cytoplasme et leur transport vers la matrice

mitochondriale via la navette carnitine<sup>118,119</sup>. Contrairement à ceux-ci, les acides gras à chaîne courte peuvent traverser librement la membrane mitochondriale. Une fois dans la matrice, la  $\beta$ -oxydation s'enclenche sous forme d'acyl-CoA et consiste en quatre réactions enzymatiques cycliques : déshydrogénation (acyl-CoA déshydrogénase), hydratation (énoyl-CoA hydratase), nouvelle déshydrogénation (3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase) et thiolase (thiolase), générant à chaque cycle un acétyl-CoA et un acyl-CoA raccourci<sup>120,121</sup>. L'acétyl-CoA alimente ensuite le cycle de Krebs, et les coenzymes NADH et FADH<sub>2</sub> produits participent à la chaîne respiratoire pour la synthèse d'ATP. Ce mécanisme est particulièrement vital dans les organes à forte demande énergétique comme le foie, le cœur et les muscles, surtout en période de jeûne ou d'effort prolongé (quand le glucose est rare).

Le glycogène est une forme de stockage du glucose, mobilisé par un processus nommé Glycogénolyse. Lors de ce processus, le glycogène est catalysé par la Glycogène phosphorylase pour alimenter rapidement la Glycolyse. Cela survient principalement dans le foie et le muscle. La synthèse du Glycogène, appelée Glycogénèse, est initiée par la Glycogène Synthase et est régulée par des signaux hormonaux (Insuline et Glucagon) et des phosphatases (PP1) en fonction des besoins énergétiques<sup>122,123</sup>.

La voie des pentoses phosphates, dérivée du glucose-6-phosphate, se divise en deux branches : une branche oxydative, qui produit du NADPH essentiel à la synthèse des lipides et à la défense contre le stress oxydatif, et une branche non oxydative, fournissant des riboses-5-phosphate pour la biosynthèse des nucléotides. Sa régulation repose sur l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), enzyme limitante contrôlée par le rapport NADP<sup>+</sup>/NADPH et le statut oxydatif de la cellule<sup>124,125</sup>.

Après avoir exploré certaines voies métaboliques des cellules saines, il apparaît que l'équilibre entre glycolyse, cycle de Krebs et phosphorylation oxydative constitue un système finement régulé, optimisé pour maximiser la production d'énergie. Toutefois, certaines cellules, notamment tumorales, s'affranchissent de ce modèle en adoptant une stratégie métabolique alternative connue sous le nom d'effet Warburg, révélant une reprogrammation profonde de leur physiologie énergétique.

## B. Effet Warburg

### i. Découverte et définition

L'effet Warburg doit son nom au biochimiste et prix Nobel Otto Warburg, qui, au début du XX<sup>e</sup> siècle, observa une anomalie surprenante dans le métabolisme des cellules tumorales. Alors que la majorité des cellules saines utilisent la phosphorylation oxydative mitochondriale pour produire de l'ATP en présence d'oxygène, Warburg démontra que les cellules cancéreuses, même en condition aérobie, privilégient une conversion incomplète du glucose en lactate par glycolyse. Ce phénomène, connu sous le nom de glycolyse aérobie, constitue le fondement de ce qu'on appelle aujourd'hui l'effet Warburg<sup>126</sup>. Suite à ces observations, Warburg en déduisit que cette reprogrammation métabolique pouvait être la cause du cancer lui-même. Cette hypothèse est aujourd'hui remise en question. Pour autant, ce que l'on nomme aujourd'hui effet Warburg demeure un marqueur robuste du phénotype tumoral. Loin d'être une simple défaillance mitochondriale, cette adaptation reflète une stratégie métabolique précise qui répond aux exigences énergétiques et biosynthétiques des cellules tumorales.

### ii. Facteurs responsables

L'instauration de l'effet Warburg repose sur une reconfiguration orchestrée de la machinerie métabolique, gouvernée par des enzymes clés, des cascades de signalisation oncogénique et des facteurs de transcription spécifiques. Le glucose entre dans la cellule via les transporteurs GLUT, en particulier GLUT1, dont l'expression est augmentée dans de nombreux cancers. Ce glucose est ensuite métabolisé par des enzymes sur-régulées comme l'hexokinase 2 (HK2), la phosphofructokinase (PFK), et la pyruvate kinase M2 (PKM2), cette dernière étant régulée de manière allostérique et transcriptionnelle pour favoriser l'accumulation d'intermédiaires glycolytiques<sup>127</sup>. Les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR, souvent activées par des mutations oncogéniques, stimulent simultanément l'absorption de glucose, la biosynthèse des lipides et la production d'ATP glycolytique<sup>128</sup>. Le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha), stabilisé en condition hypoxique ou par activation oncogénique, déclenche un programme glycolytique complet même en présence d'oxygène, favorisant la transcription de gènes tels que LDHA et PGK1<sup>129</sup>. Par ailleurs, MYC, un proto-oncogène classique, agit en synergie avec HIF-1 $\alpha$  pour amplifier cette reprogrammation métabolique en augmentant la transcription des enzymes glycolytiques et des transporteurs de glucose<sup>130</sup>.

### iii. Conséquences métaboliques

Les cellules tumorales tirent plusieurs bénéfices fonctionnels de cette stratégie métabolique aberrante. D'une part, bien que moins efficace en termes de rendement ATP par molécule de glucose, la glycolyse aérobie est extrêmement rapide et permet la production d'énergie à un rythme suffisant pour soutenir une prolifération cellulaire intense. D'autre part, elle libère des intermédiaires glycolytiques clés utilisés comme précurseurs pour la biosynthèse : le glucose-6-phosphate (G6P) alimente la voie des pentoses phosphates pour générer du NADPH et des riboses nécessaires à la synthèse des acides nucléiques ; le 3-phosphoglycérate (3PG) et le pyruvate servent à produire des acides aminés non essentiels comme la sérine, la glycine et l'alanine ; enfin, le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) est converti en glycérol-3-phosphate, un composant essentiel des lipides membranaires<sup>126,128,130</sup>.

Un autre avantage stratégique de l'effet Warburg réside dans la production accrue de lactate, un métabolite qui doit être rapidement évacué pour éviter une acidose intracellulaire délétère. Chez les cellules non tumorales, la production de lactate en conditions aérobie représente de façon générale une fraction mineure du glucose consommé (<10-20%). En revanche, cela peut représenter jusqu'à 85 % de la consommation de glucose dans certains types tumoraux<sup>131,132,133</sup>. Une autre façon de se représenter ces différences serait de s'intéresser aux concentrations molaires du glucose et du lactate. En conditions normoxiques, les cellules saines privilégient la phosphorylation oxydative mitochondriale, utilisant efficacement le glucose pour produire de l'ATP tout en générant peu de lactate ; leur consommation de glucose se situe généralement entre 1 et 2 mM, avec une production de lactate inférieure à 1 mM, sauf en cas d'activité métabolique intense comme l'exercice musculaire<sup>134,135</sup>. A l'inverse, les cellules tumorales, soumises à l'effet Warburg, convertissent massivement le glucose en lactate. Dans ces conditions, elles peuvent consommer jusqu'à 10-13 mM de glucose et produire une quantité équivalente de lactate, illustrant une conversion quasi complète du glucose en lactate<sup>136,137</sup>. Bien évidemment, ces valeurs sont données ici à titre indicatif. La littérature sur le sujet décrit une variabilité importante dans les concentrations de glucose consommé et de lactate produit entre les différents types cellulaires, aussi bien normaux que tumoraux.

Les flux de lactate par la cellule sont notamment assurés par les transporteurs monocarboxylates (MCTs), en particulier les isoformes MCT1 et MCT4, qui assurent respectivement l'import et l'export du lactate couplé au transport de protons. MCT4, régulé par HIF-1 $\alpha$  et fortement exprimé dans les cellules tumorales hypoxiques, est spécialisé dans

l'export du lactate produit par la glycolyse, contribuant ainsi à l'acidification du microenvironnement extracellulaire<sup>138,139,140</sup>. Ce phénomène d'acidose favorise l'échappement à la surveillance immunitaire, la dégradation de la matrice extracellulaire et la migration cellulaire, éléments clés du potentiel invasif et métastatique des cellules cancéreuses. En parallèle, MCT1 permet l'import du lactate dans d'autres cellules du microenvironnement tumoral, comme les cellules stromales ou les cellules tumorales mieux oxygénées, où il peut être réutilisé comme source de carbone pour la respiration mitochondriale. Cette coopération métabolique, parfois appelée "symbiose métabolique", permet une exploitation optimale des ressources énergétiques au sein de la tumeur<sup>141,142</sup>. Ainsi, les MCTs ne sont pas de simples canaux d'échange, mais des acteurs essentiels de la plasticité métabolique tumorale.

Les ajustements métaboliques conférés par l'effet Warburg ne représentent qu'une facette de la stratégie d'adaptation des cellules tumorales. En réalité, leur survie et leur expansion reposent sur une interaction constante avec un microenvironnement aux contraintes extrêmes, qui façonne à son tour de nouvelles vulnérabilités et réponses métaboliques. C'est dans ce contexte que s'inscrivent les transformations plus globales de l'écosystème tumoral que nous allons à présent explorer.

## C. Adaptation métabolique dans le microenvironnement tumoral (TME)

### i. Hypoxie

Dans un tissu sain, l'oxygène est délivré de manière homogène par un réseau vasculaire fonctionnel et bien organisé. Cette situation, appelée normoxie, se caractérise par une pression partielle en oxygène ( $pO_2$ ) avoisinant 40 mmHg (soit environ 5 à 6% d'oxygène en termes de concentration gazeuse) dans les tissus périphériques (contre 21% dans l'air ambiant à pression atmosphérique), permettant aux cellules de maintenir une respiration mitochondriale efficace, fondée sur la phosphorylation oxydative. Ce mode de production énergétique favorise un métabolisme équilibré, assure la production de radicaux libres contrôlés et soutient des fonctions physiologiques telles que la prolifération, la différenciation et la réponse immunitaire<sup>143,144</sup>.

Cependant, dans le microenvironnement tumoral (TME), la croissance rapide des cellules cancéreuses, combinée à une vascularisation anarchique, altère la perfusion en oxygène. L'angiogenèse, bien qu'amplifiée par la sécrétion de VEGF et d'autres facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales et stromales, produit des vaisseaux immatures, fuyants et inefficaces. Ce déséquilibre entre demande en oxygène et apport vasculaire induit un état

d'hypoxie, défini comme une baisse critique de la pO<sub>2</sub> en dessous de 10 mmHg (soit environ 1,3% d'oxygène en termes de concentration gazeuse), parfois même jusqu'à 0.1 mmHg (soit environ 0,01%) dans les zones centrales des tumeurs solides<sup>145</sup>.

L'hypoxie déclenche une réponse transcriptionnelle adaptative pilotée principalement par les facteurs induits par l'hypoxie (HIFs), notamment HIF-1 $\alpha$ . Stabilisé en l'absence d'oxygène, HIF-1 $\alpha$  migre vers le noyau, où il active des gènes impliqués dans la glycolyse, l'angiogenèse (VEGF, ANGPTL4), la survie cellulaire (BNIP3), l'autophagie, ainsi que l'expression de points de contrôle immunitaires tels que PD-L1<sup>146,147</sup>.

Les cellules tumorales peuvent favoriser la glycolyse pour produire rapidement de l'ATP, même en présence d'oxygène (effet Warburg). En cas de privation d'oxygène (hypoxie), elles accentuent également cette reprogrammation glycolytique pour maintenir leur survie. Cette glycolyse hypoxique s'accompagne d'une acidification du TME, en partie médié par l'accumulation de lactate, ce qui favorise l'invasion, la plasticité phénotypique, et la résistance aux traitements<sup>148,149</sup>.

Les cellules stromales, notamment les CAFs et les cellules endothéliales, répondent également à l'hypoxie en remodelant la matrice extracellulaire et en favorisant une angiogenèse aberrante. Sous hypoxie, les CAFs expriment des facteurs tels que LOX (lysyl oxydase) et TGF- $\beta$ , contribuant à la rigidification du stroma, ce qui entrave encore plus la perfusion<sup>150,151</sup>.

Les cellules immunitaires infiltrées sont profondément rééduquées par l'environnement hypoxique. Les macrophages tumoraux (TAMs) adoptent un phénotype M2 pro-tumoral (surexpression du marqueur CD206), sous l'influence de HIF-1 $\alpha$ . Cela va par ailleurs augmenter leurs niveaux d'expression de cytokines anti-inflammatoire (IL-10) et d'enzymes inhibant les fonctions immunitaires antitumorales (Arg-1). Les lymphocytes T cytotoxiques voient leur fonction altérée par le manque de glucose et par l'expression accrue de PD-L1 sur les cellules tumorales et myéloïdes. De plus, les cellules T régulatrices (Tregs) sont favorisées par l'hypoxie, consolidant un état immunosuppresseur dans le TME<sup>152,153</sup>.

## ii. Stress oxydatif et espèce réactives de l'oxygène

L'hypoxie, en plus de remodeler le métabolisme et les fonctions immunitaires, génère un stress oxydatif intense dans le TME. Ce stress résulte d'un déséquilibre entre la production et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species), telles que le superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et le radical hydroxyle ( $\bullet$ OH). Ces

molécules sont générées majoritairement par la chaîne de transport mitochondrial lors de la respiration cellulaire, mais aussi via les enzymes telles que les NADPH oxydases (NOX), la xanthine oxydase, et la peroxydase myéloïde<sup>154,155</sup>.

Dans un contexte hypoxique, la production de ROS est paradoxalement accrue, notamment lors des phases de réoxygénation intermittente, fréquentes dans les tumeurs mal vascularisées. Cette surproduction de ROS entraîne des dommages oxydatifs sur les lipides, les protéines et l'ADN, contribuant à l'instabilité génomique des cellules tumorales et à leur hétérogénéité clonale<sup>156,157</sup>. Dans le même temps, les cellules cancéreuses adaptent leurs défenses antioxydantes en up-régulant les enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et les transporteurs liés au glutathion, leur permettant de survivre à des conditions pro-oxydantes délétères pour des cellules normales<sup>158</sup>.

Les cellules stromales, en particulier les fibroblastes, et les cellules endothéliales contribuent aussi à cette dynamique oxydative. Sous hypoxie, les fibroblastes tumoraux augmentent leur production de ROS, favorisant la rigidification du stroma via l'activation de la lysyl oxydase et la production de collagène oxydé. Les ROS modulent également la perméabilité vasculaire et contribuent à la sénescence endothéliale, exacerbant la mauvaise perfusion du tissu tumoral<sup>159</sup>.

En ce qui concerne les cellules immunitaires, le rôle des ROS est ambivalent. À faible dose, les ROS participent à la signalisation et à l'activation des cellules T et des macrophages. Toutefois, en excès, ils provoquent une immunosuppression : réduction de la prolifération des lymphocytes T, induction de l'expression de PD-1, inactivation de l'IL-2, et promotion du recrutement des cellules T régulatrices (Tregs). De plus, les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) utilisent les ROS comme arme de suppression immunitaire, inhibant l'activation des lymphocytes effecteurs<sup>157,159</sup>.

Ainsi, le stress oxydatif, intimement lié à l'hypoxie, n'est pas seulement un sous-produit métabolique toxique : il s'agit d'un acteur central de la reprogrammation tumorale et de l'immunosuppression.

### iii. Compétition métabolique et disponibilité des nutriments

Dans un tissu sain, les cellules disposent d'un accès relativement stable et régulé à des nutriments essentiels tels que le glucose, la glutamine, les acides gras ou les acides aminés. Ces

ressources énergétiques soutiennent des fonctions cellulaires essentielles, comme la prolifération contrôlée, la réponse immunitaire et la réparation tissulaire. Cependant, dans le microenvironnement tumoral, ces conditions sont profondément altérées par la combinaison de l'hypoxie, du stress oxydatif et d'une vascularisation inefficace. Il en résulte un milieu appauvri en nutriments, où la forte demande métabolique des cellules tumorales crée une compétition « féroce » avec les cellules immunitaires et stromales voisines<sup>160,161</sup>.

Les cellules cancéreuses, en adoptant un métabolisme glycolytique même en présence d'oxygène (effet Warburg), consomment massivement le glucose disponible pour générer de l'ATP rapidement, au détriment des lymphocytes T et NK qui dépendent également du glucose pour maintenir leurs fonctions effectrices. Cette compétition métabolique entraîne une anergie - ou épuisement fonctionnel - de ces cellules immunitaires, réduisant leur capacité à exercer une surveillance antitumorale efficace<sup>149,153</sup>.

De même, les cellules tumorales sont souvent dépendantes de la glutamine, un acide aminé clé utilisé à la fois comme substrat énergétique dans le cycle de Krebs et comme source d'azote pour la synthèse des nucléotides. Cette dépendance exacerbée prive les cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes T activés, cellules dendritiques) d'un substrat critique pour leur activation et leur prolifération<sup>162</sup>.

Enfin, les cellules stromales, en particulier les CAFs, contribuent également à cette compétition. Elles peuvent soit consommer activement certains nutriments via des voies glycolytiques ou lipolytiques, soit produire des métabolites secondaires comme le lactate, dans le cadre d'une symbiose métabolique au bénéfice des cellules tumorales<sup>163,164</sup>.

Cette dynamique compétitive transforme le TME en un écosystème métabolique hostile aux cellules non tumorales, freinant la réponse immunitaire et favorisant la sélection de clones tumoraux capables de tolérer des conditions extrêmes de privation. Elle illustre à quel point la dérégulation des voies métaboliques constitue une signature majeure des cancers avancés, en contraste marqué avec les mécanismes métaboliques bien ordonnés des tissus sains.

Comme nous venons de le voir, le microenvironnement tumoral est une structure très dynamique dans lequel les pressions environnementales et les contraintes énergétique influencent directement le comportement des acteurs en présence. De plus, la communication entre les cellules tumorales et leur microenvironnement est décrit comme l'un des éléments clés dans de nombreux cancers. A cet effet, il est important de souligner une évidence : les cellules n'évoluent pas de manière isolée. Elles s'organisent, se « sentent » et répondent aux signaux

environnants. L'adaptation métabolique des cellules tumorales, influencée par des phénomènes tels que l'effet Warburg, l'hypoxie et le stress oxydatif, ne peut être pleinement comprise sans tenir compte du microenvironnement physique dans lequel ces cellules évoluent. La rigidité de la matrice extracellulaire, les forces mécaniques exercées sur les cellules, ainsi que leurs interactions avec les cellules voisines, contribuent à façonner leur comportement métabolique et phénotypique<sup>165,166,167</sup>. Ces contraintes mécaniques peuvent activer des voies de mécano-sensibilité, modifiant la morphologie cellulaire, l'organisation du cytosquelette, et la dynamique des points d'adhésion<sup>168</sup>. Il est donc essentiel, pour mieux comprendre la plasticité des cellules cancéreuses, d'explorer comment ces stimuli mécaniques influencent leur morphologie, leur motilité et leurs interactions. C'est ce que nous aborderons dans le chapitre suivant, en nous intéressant à l'architecture cellulaire, aux mécanismes de mécano-sensibilité et aux contacts intercellulaires. A cet effet, nous prendrons en exemple une voie de signalisation clé dans la mécano-sensibilité : la voie HIPPO (YAP/TAZ).

### III. Morphologie cellulaire et mécano-sensibilité

La morphologie cellulaire, autrefois considérée comme le reflet passif des contraintes physiques extérieures ou de l'enveloppe membranaire, est aujourd'hui reconnue comme le produit actif de processus intracellulaires hautement régulés. Cette transformation conceptuelle trouve ses racines dans l'histoire des découvertes sur le cytosquelette, une structure intracellulaire dynamique dont le rôle dépasse le simple soutien structural pour inclure des fonctions mécano-sensorielles, signalétiques et morphogénétiques.

#### A. Une architecture cellulaire dictée par le cytosquelette

##### i. Découverte et définition

Pendant plusieurs siècles, la forme cellulaire était principalement une catégorie descriptive. Ce n'est qu'à partir du milieu du XXe siècle que des liens fonctionnels entre la morphologie et les processus biologiques ont commencé à émerger, en particulier dans le cadre du développement embryonnaire, de la différenciation et de la migration cellulaire<sup>169</sup>. Des auteurs comme E. Frixione ont retracé cette « épopée » scientifique, en insistant sur le rôle des révolutions techniques (fluorescence, cryo-microscopie, immunohistochimie) qui ont permis de découvrir l'existence d'un réseau polymérique interne régulant activement la morphologie cellulaire<sup>170</sup>. L'histoire de la cytologie a également montré l'émergence progressive de concepts unificateurs tels que celui de polarité cellulaire, qui repose directement sur l'organisation du

cytosquelette<sup>171</sup>. Cette révision de paradigme s'est accompagnée d'une redéfinition de la forme cellulaire comme un indicateur, voire un moteur, de la fonction biologique.

Le cytosquelette est aujourd'hui reconnu comme un ensemble de structures protéiques dynamiques et spécialisées — filaments d'actine, microtubules, filaments intermédiaires — organisées en réseaux adaptatifs permettant le maintien, la modification et la transmission des formes cellulaires. Il ne s'agit pas d'une charpente inerte, mais d'une interface modulable avec l'environnement intracellulaire et extracellulaire<sup>172</sup>. Des travaux récents ont montré que les différents éléments du cytosquelette, bien que distincts par leur composition, coopèrent à travers des points d'ancrage, des complexes de régulation (tels que les Rho GTPases), et des moteurs moléculaires comme la myosine ou la dynéine. Cela permet des réponses spatio-temporelles rapides à des signaux mécaniques ou chimiques<sup>173,174</sup>. Sur le plan évolutif, la découverte d'homologues de l'actine et de la tubuline chez les bactéries a confirmé l'antériorité du cytosquelette comme structure fonctionnelle, indiquant une émergence précoce de ces réseaux polymériques dans l'histoire de la vie cellulaire<sup>175,176</sup>.

## ii. Constituants du cytosquelette

Le cytosquelette est une infrastructure cellulaire dynamique et hautement organisée, constituée d'un ensemble complémentaire de structures filamenteuses et de protéines associées (Figure 5). Il se divise classiquement en trois grandes familles de filaments : les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires, chacun doté de propriétés mécaniques, structurales et fonctionnelles distinctes. De plus, de nombreux composants régulateurs gravitent autour de ces éléments de base, rajoutant un niveau de complexité. Parmi ces éléments, on retrouve notamment : des moteurs moléculaires, des complexes de nucléation, des protéines de liaison et des régulateurs GTPasiques. Ainsi, c'est l'ensemble de ces éléments qui va constituer ce réseau complexe qu'est le cytosquelette. Chacun de ces acteurs possède des fonctions spécifiques, des architectures distinctes, et des mécanismes de régulation propres. Ensemble, ils assurent non seulement le maintien de la forme cellulaire, mais aussi la coordination du transport intracellulaire, la division cellulaire, la motilité, et la réponse aux signaux mécaniques et chimiques de l'environnement.

Les microfilaments, aussi appelés filaments d'actine, sont les plus fins des trois réseaux cytosquelettiques avec un diamètre d'environ 7 nm. Composés de monomères d'actine globulaire (G-actine) qui s'assemblent en filaments hélicoïdaux (F-actine), ils sont omniprésents dans le cortex cellulaire, juste sous la membrane plasmique. La nucléation de

l'actine est le processus initial par lequel plusieurs monomères d'actine globulaire (G-actine) s'assemblent pour former un noyau stable, nécessaire à la polymérisation ultérieure du filament d'actine (F-actine). L'actine joue un rôle fondamental dans de nombreux processus cellulaires, notamment la migration, la contraction, l'endocytose et la division cellulaire. Elle forme des structures telles que les lamellipodes, filopodes, fibres de stress ou encore l'anneau contractile mitotique<sup>177</sup>. La régulation des microfilaments est complexe et finement contrôlée. Des protéines comme la profilin ou la thymosine- $\beta$ 4 régulent la disponibilité des monomères, tandis que les complexes Arp2/3 et formines contrôlent la nucléation et la structuration des réseaux ramifiés ou linéaires<sup>173</sup>. Les GTPases de la famille Rho (notamment RhoA, Rac1 et Cdc42) orchestrent spatialement l'organisation de l'actine, dictant les transitions entre protrusion, adhésion et rétraction<sup>178</sup>.

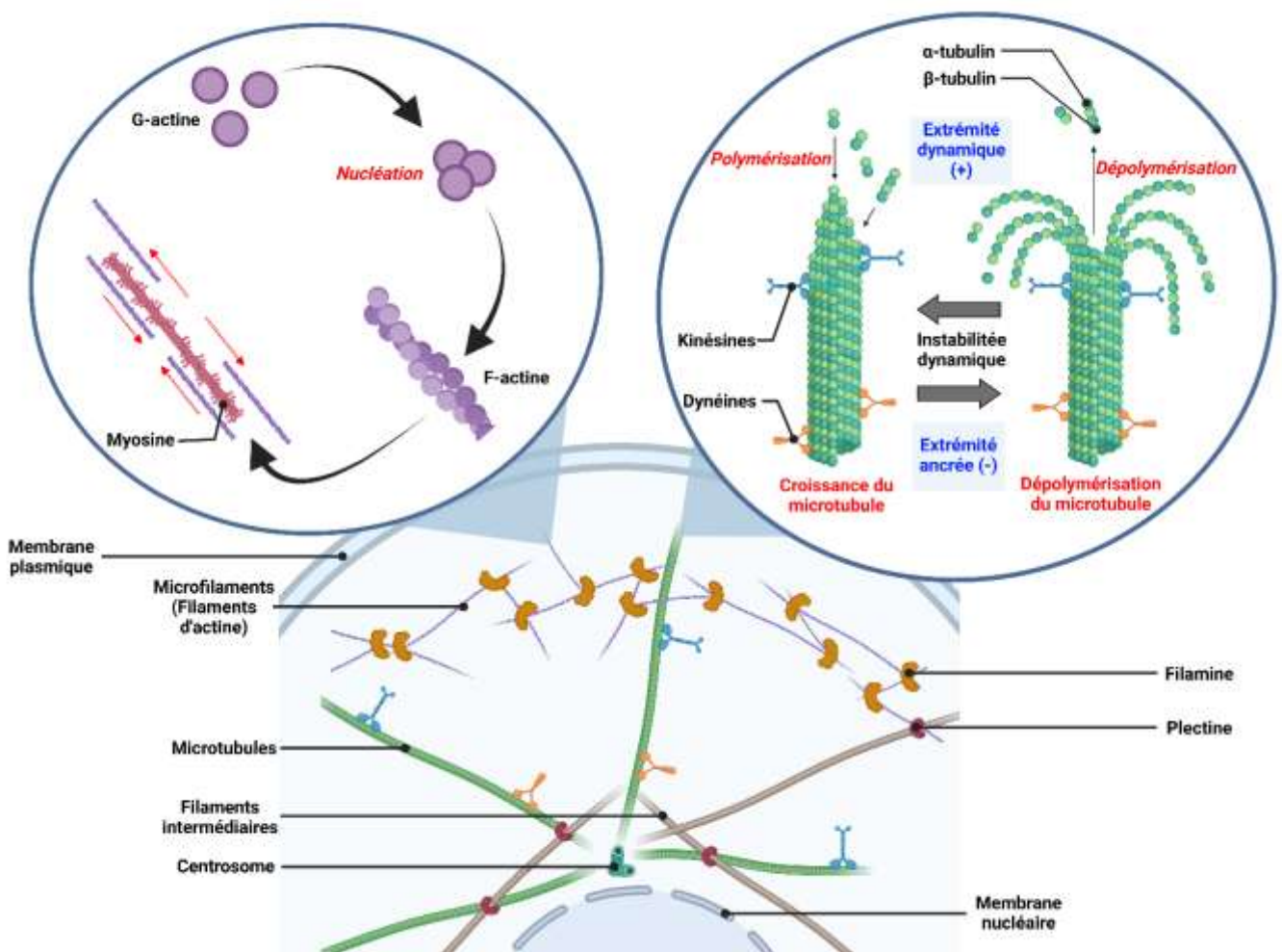


Figure 5 : Représentation schématique des constituants du cytosquelette et de leur dynamique. Le cytosquelette est un réseau dynamique composé de structures filamenteuses (Microfilaments, Microtubules et Filaments intermédiaires) et de protéines associées. Autour de ces filaments gravitent de nombreux régulateurs tels que les moteurs moléculaires (Kinésines, Dynéines, Myosines) et les protéines de liaisons (Filamine, Plectine, etc.). Figure réalisée avec BioRender.com.

Les microtubules sont des cylindres rigides de 25 nm de diamètre formés de dimères  $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline. Leur organisation radiale depuis le centrosome leur confère une polarité structurale avec une extrémité dynamique (+) et une extrémité ancrée (-). Ils sont essentiels à l'organisation intracellulaire, au transport de vésicules, à la séparation des chromosomes durant la mitose et à l'établissement de la polarité cellulaire<sup>179</sup>. La polarité cellulaire correspond à une organisation asymétrique des composants cellulaires, permettant la spécialisation de différentes régions de la cellule. Les microtubules contribuent notamment à l'établissement de la polarité apico-basale et de la polarité planaire (PCP) qui est perpendiculaire à la précédente<sup>180,181</sup>. La dynamique des microtubules repose sur des transitions entre croissance et dépolymérisation (instabilité dynamique). Elle est régulée par des protéines telles que les +TIPs (comme EB1) ou la stathmine. Les modifications post-traductionnelles comme la tyrosination ou l'acétylation influencent leur stabilité. Par exemple, la tyrosination (spécifique de la tubuline), consiste en un ajout d'un résidu de tyrosine à l'extrémité C-terminale de la tubuline  $\alpha$  et contribue à rendre les microtubules plus dynamiques<sup>182</sup>. Ils interagissent aussi étroitement avec les réseaux d'actine via des ponts moléculaires qui facilitent le crosstalk entre les deux systèmes<sup>183</sup>.

Moins étudiés historiquement, les filaments intermédiaires sont aujourd'hui reconnus pour leur rôle structural et mécanique. Ils mesurent environ 10 nm de diamètre, ne possèdent pas de polarité, et sont constitués de protéines spécifiques aux tissus : vimentine dans les cellules mésenchymateuses, desmine dans les muscles, kératines dans les épithéliums et lamines dans le noyau<sup>184</sup>. Ils ne participent pas directement à la motilité mais assurent la cohésion tissulaire, la résistance aux contraintes mécaniques et la protection nucléaire. Leur régulation passe par des phosphorylations (notamment pendant la mitose), et ils interagissent avec d'autres filaments via des protéines de liaison comme la plectine<sup>185</sup>. Leur rôle de plateforme d'intégration mécanique est particulièrement bien mis en lumière dans les épithéliums et les cellules soumises à des stress mécaniques importants (étirement tissulaire, compression et cisaillement, etc)<sup>186</sup>.

Les moteurs moléculaires convertissent l'énergie de l'ATP en travail mécanique le long des filaments. Ils sont essentiels au transport intracellulaire et à la génération de forces. Trois familles principales sont associées au cytosquelette : les myosines (actine), les kinésines (microtubules vers l'extrémité +) et les dynéines (microtubules vers l'extrémité -). Les myosines, surtout la myosine II, participent à la contraction de l'actomyosine et à la migration cellulaire. Les kinésines transportent des vésicules, mitochondries ou ARN, tandis que les dynéines sont cruciales pour la mitose et le transport rétrograde dans les neurones. Leur

régulation dépend d'interactions avec des complexes adaptateurs, de modifications post-traductionnelles et d'associations avec des cargos spécifiques<sup>187</sup>.

Les protéines de liaison et d'ancrage comme la plectine, la filamine, la spectrine ou l'e-zrine assurent l'interconnexion entre les réseaux de filaments, la membrane plasmique et les organites. La plectine relie les filaments intermédiaires aux microtubules et à l'actine, jouant un rôle dans l'intégrité tissulaire. La filamine croise les filaments d'actine, stabilisant les réseaux dans les zones de contrainte. Ces protéines facilitent aussi la transmission des forces mécaniques entre cytosquelette et adhésions focales ou jonctions intercellulaires, participant à la mécanosensibilité cellulaire<sup>188</sup>.

Enfin, les régulateurs GTPasiques présents au sein du cytosquelette ont un rôle fondamental dans l'organisation structurée du cytosquelette d'actine. Les GTPases de la famille Rho — principalement RhoA, Rac1 et Cdc42 — dirigent la formation de structures spécifiques adaptées aux besoins fonctionnels de la cellule. Ces petites protéines GTPasiques fonctionnent comme des commutateurs moléculaires, alternant entre un état actif (lié au GTP) et un état inactif (lié au GDP), et sont régulées par des GEFs (guanine nucleotide exchange factors), GAPs (GTPase activating proteins) et GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors) (Figure 6A)<sup>178</sup>. La figure 6B illustre l'implication des GTPases de la famille Rho dans la formation de structure composées de filaments d'actine. RhoA, lorsqu'il est activé, stimule l'assemblage de fibres de stress — des faisceaux contractiles riches en actine et en myosine II — via l'activation des formines et de la kinase ROCK (Rho-associated kinase). Ces structures jouent un rôle essentiel dans la génération de force, l'ancrage aux points d'adhésion focale et la migration cellulaire sur des substrats rigides<sup>189,190</sup>. Rac1, en revanche, favorise la formation de lamellipodes, de larges protrusions membranaires à l'avant de la cellule. Cette action s'opère principalement par l'activation du complexe WAVE. WAVE, ou WASP-family verprolin-homologous protein, est un ensemble de protéines régulatrices qui à son tour active le complexe Arp2/3, responsable de la nucléation et de la ramification de réseaux d'actine denses et dynamiques. Les lamellipodes sont essentiels pour la progression directionnelle lors de la migration cellulaire et pour la détection de gradients chimiques<sup>179,191</sup>. Cdc42, quant à lui, contrôle la formation des filopodes, de fines extensions cytoplasmiques composées de faisceaux parallèles d'actine. Ces structures sont impliquées dans l'exploration de l'environnement extracellulaire, l'établissement de contacts initiaux et la polarisation cellulaire. Cdc42 active les formines (notamment mDia2) et le complexe WASP. WASP, ou Wiskott-Aldrich Syndrome Protein, est un ensemble de protéines régulatrices. Ils catalysent également l'activation

d'Arp2/3 dans une configuration spécifique favorisant l'alignement linéaire de l'actine<sup>192,193</sup>. Ces trois GTPases ne fonctionnent pas de manière isolée, mais interagissent dans un réseau finement régulé permettant une coordination spatio-temporelle des dynamiques cytosquelettiques nécessaires à la plasticité cellulaire, à la migration et à la signalisation.

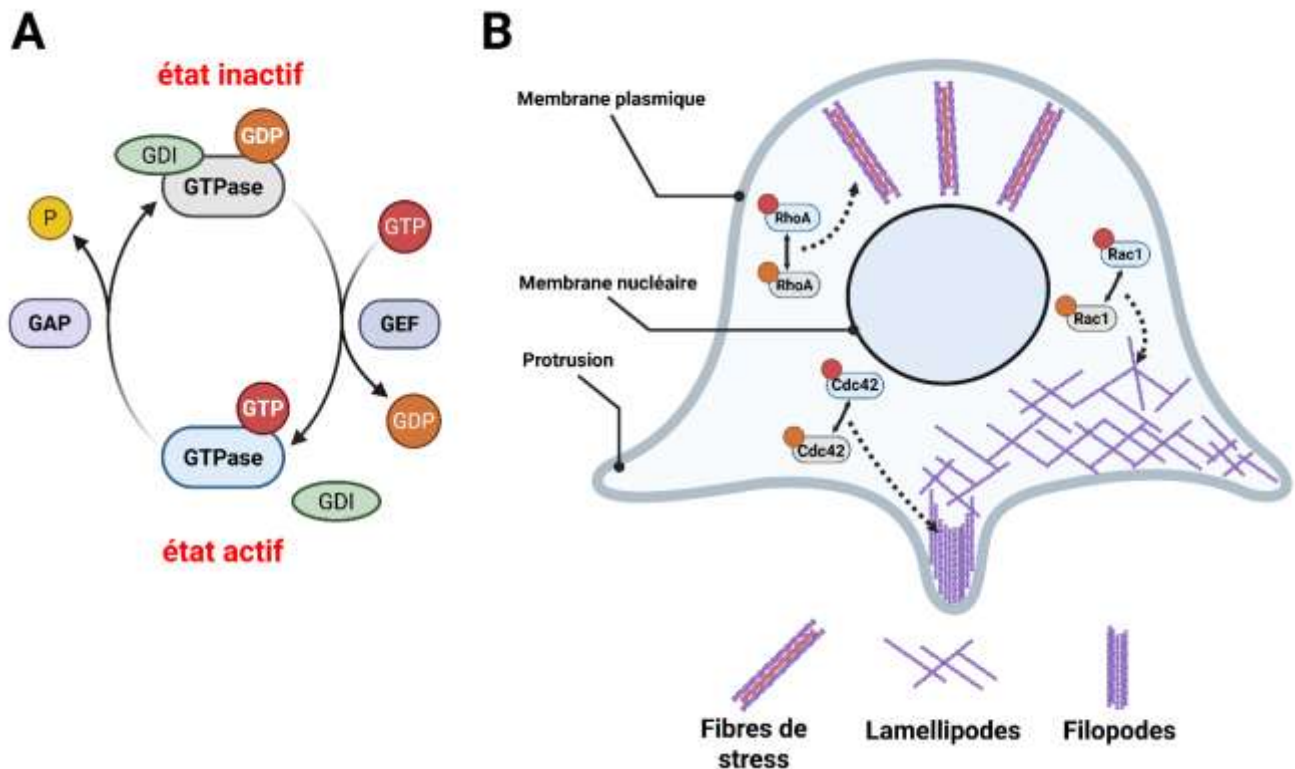


Figure 6 : **Rôle des GTPases de la famille Rho dans l'organisation du réseau d'actine.** (A) Schéma du mode d'activation des GTPases. L'état d'activation est caractérisé par la liaison au GDP (état inactif) ou GTP (état actif). Ces états sont régulés par des GEFs (guanine nucleotide exchange factors), GAPs (GTPase activating proteins) et GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors). (B) Les GTPases de la famille Rho sont impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Selon les besoins de la cellule, RhoA, Rac1 et Cdc42 contribuent à la formation de structures telles que les fibres de stress (RhoA), les lamellipodes (Rac1) et les filopodes (Cdc42). Ces structures contribuent aux capacités d'ancrage et de migration des cellules. Figure réalisée avec BioRender.com.

### iii. Dérégulation dans les cancers

Le cytosquelette agit comme une charpente dynamique assurant la forme, la polarité, la division et la migration cellulaire. Cette organisation repose sur une coordination rigoureuse entre les filaments d'actine, les microtubules, les filaments intermédiaires, et leurs régulateurs associés. Toutefois, dans un contexte tumoral, cette architecture cytosquelettique, habituellement maîtrisée, est profondément remaniée. De la même manière que l'adaptation métabolique dont font preuves les cellules tumorales, ces dernières exploitent et détournent le

cytosquelette pour s'adapter aux contraintes imposées par leur microenvironnement. Le cytosquelette devient alors un outil supplémentaire d'adaptation et de plasticité, permettant aux cellules tumorales d'acquérir des propriétés invasives, résistantes et motiles<sup>194,195,196,197</sup>.

Sous l'effet de signaux mécaniques ou chimiques du microenvironnement tumoral, la cellule active des voies de signalisation — notamment via les GTPases Rho — qui induisent la formation de structures spécialisées. Par exemple, la suractivation de Rac1 favorise la mise en place de lamellipodes, des extensions larges et aplaties riches en actine ramifiée, qui facilitent la migration cellulaire à travers les barrières tissulaires. Ces structures sont stabilisées par l'activation du complexe WAVE-Arp2/3, conduisant à la polymérisation rapide d'un réseau d'actine cortical<sup>198,199</sup>. En parallèle, Cdc42 stimule la formation de filopodes, de fines protrusions à base d'actine linéaire impliquées dans l'exploration de la matrice extracellulaire et la reconnaissance de voies migratoires potentielles<sup>196</sup>. Ces filopodes jouent également un rôle clé dans l'établissement de contacts précoces avec les capillaires lors de la dissémination métastatique. Par ailleurs, RhoA, en activant les kinases ROCK, favorise la formation de fibres de stress contractiles contenant de la myosine II. Ces structures génèrent une force de traction sur les adhésions focales, augmentant la capacité des cellules à se contracter et à migrer sur des substrats rigides, comme c'est souvent le cas dans les tumeurs riches en matrice<sup>194,200</sup>. La plasticité du réseau d'actine permet ainsi à la cellule cancéreuse de moduler en continu sa forme et son mode de migration (mésenchymateux ou amiboïde), en réponse à des gradients mécaniques ou biochimiques.

Les microtubules, dans une cellule cancéreuse, sont réorganisés pour soutenir les processus migratoires et mitotiques anormaux. Ils orientent la polarité cellulaire, facilitent le transport de protéines et d'organites vers les protrusions invasives, et participent au repositionnement du centrosome (le centre organisateur des microtubules). Les altérations de la dynamique de la tubuline — par sur-expression de certaines isoformes ou par des modifications post-traductionnelles (acétylation, détyrosination) — sont fréquemment observées dans les cancers, conférant une résistance accrue aux traitements dirigés contre les microtubules comme le taxol<sup>201,202</sup>.

Les filaments intermédiaires, bien que moins dynamiques, subissent également des réorganisations majeures. La vimentine, marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), est souvent surexprimée dans les tumeurs agressives. Elle confère une élasticité accrue, une meilleure résistance au stress mécanique et facilite la transmigratio n à travers la matrice ou les parois vasculaires<sup>203,204</sup>. Cette fonction est amplifiée par des protéines de liaison comme la

plectine, qui relie les filaments intermédiaires aux autres réseaux filamenteux et aux points d'ancrage cellulaires.

Enfin, les moteurs moléculaires — en particulier les kinésines et les dynéines — sont détournés pour favoriser le transport rapide de vésicules contenant des métalloprotéases (MMPs), nécessaires à la dégradation de la matrice extracellulaire<sup>205,206,207</sup>. Cette logistique intracellulaire contribue à l'invasion locale et à la libération de signaux pro-tumoraux.

Ainsi, le détournement des réseaux cytosquelettiques par les cellules tumorales ne se limite pas à une réorganisation passive de leurs structures internes : il traduit une véritable réécriture de leur interaction avec leur environnement. En s'appropriant les propriétés dynamiques de l'actine, des microtubules et des filaments intermédiaires, les cellules cancéreuses acquièrent la capacité de remodeler leur architecture, de migrer activement et de résister aux contraintes mécaniques extrinsèques. Or, cette aptitude adaptative repose sur une caractéristique centrale du cytosquelette : sa sensibilité mécanique. Dans une cellule saine, la mécano-sensibilité permet de percevoir, intégrer et transduire les signaux physiques du microenvironnement en réponses biologiques appropriées. Dans les cancers, ce mécanisme est profondément altéré, réorienté au service de la prolifération, de l'invasion et de la dissémination. Afin de mieux appréhender les implications de telles adaptations mécaniques de la part des cellules tumorales, nous allons revenir sur quelques notions essentielles de mécano-sensibilité.

## B. Notions de mécano-sensibilité

Nous avons pu nous rendre compte, au travers des différentes notions abordées, que les cellules, qu'elles soient saines ou cancéreuses, évoluent dans des environnements complexes et hautement régulé. Pour autant, le microenvironnement dans lequel les cellules évoluent n'est pas seulement chimique, mais aussi mécanique. Les cellules sont exposées en permanence à des forces telles que la tension, la compression, le cisaillement ou encore la rigidité de la matrice extracellulaire. La capacité des cellules à percevoir et à répondre à ces signaux mécaniques — appelée mécano-sensibilité — est un principe fondamental de la biologie cellulaire moderne. Ce processus repose sur une chaîne d'événements appelée mécano-transduction, qui permet la conversion d'une contrainte physique en réponses biochimiques adaptatives. Cette aptitude permet à la cellule de réguler des fonctions essentielles telles que la migration, la prolifération, la différenciation ou l'apoptose<sup>208,209</sup>.

## i. La détection des signaux mécaniques

L'idée que les cellules sont sensibles à leur environnement mécanique remonte aux années 1980, avec les travaux précurseurs de Donald Ingber et ses collaborateurs, qui ont formulé le concept de tensegrité cellulaire. La tensegrité est un concept physique comparable à une tente de camping montée avec des cordes tendues et des piquets souples. Les cordes (tension) tirent vers l'extérieur, les piquets (compression) poussent vers l'intérieur, et c'est l'équilibre entre les deux qui maintient la tente debout. Si une seule corde se relâche, toute la structure se déforme. Le modèle de tensegrité cellulaire formulé par Donald Ingber proposait que la cellule fonctionne comme une structure architecturale stable, où des éléments en tension (actine) et en compression (microtubules) assurent la stabilité mécanique tout en permettant la détection des forces externes<sup>210</sup>. Ces travaux ont par la suite été renforcés par des études montrant que l'application de forces mécaniques locales (microaiguilles flexibles) pouvait déclencher des réponses intracellulaires telles que la phosphorylation de la Focal Adhesion Kinase (FAK), la réorganisation de l'actine corticale ou la relocalisation de complexes d'adhésion<sup>211,212,213</sup>.

Ces travaux, ayant posé les fondements d'une vision dynamique de la cellule, ont par ailleurs contribué à la classification des signaux mécaniques perceptible par une cellule selon leur nature physique (Figure 7) :

- La **tension** correspond à des forces d'étirement, souvent générées par des interactions avec la matrice extracellulaire (MEC) ou d'autres cellules. Elle est particulièrement importante dans les tissus soumis à des mouvements (muscle, poumon, intestin) et dans un contexte de microenvironnement tumoral<sup>214</sup>.
- La **compression**, à l'inverse, résulte d'un écrasement ou d'un empilement cellulaire, comme on peut l'observer dans les tumeurs solides ou les épithéliums en croissance<sup>215,216,217</sup>.
- Le **cisaillement** (ou Shear Stress) est provoqué par des flux de liquide, comme dans l'endothélium vasculaire soumis au débit sanguin. Ce type de contrainte est essentiel à l'homéostasie vasculaire et à la fonction endothéliale<sup>218,219</sup>.
- La **rigidité de la matrice** (ou Stiffness) est perçue à travers les forces de traction générées par la cellule elle-même sur son substrat. Plus la matrice est rigide, plus la cellule génère de tension via le cytosquelette pour explorer son environnement. Ce paramètre influence fortement la différenciation cellulaire<sup>168</sup>.

- Enfin, les **topographies** ou **courbures de surface** sont aussi des signaux mécaniques que la cellule peut détecter, en ajustant localement la distribution de ses adhésions et de son cytosquelette<sup>220</sup>.

Ces signaux peuvent agir seuls ou de manière combinée, et leur interprétation cellulaire dépend à la fois de leur intensité, de leur fréquence, de leur direction et de la durée de l'exposition.

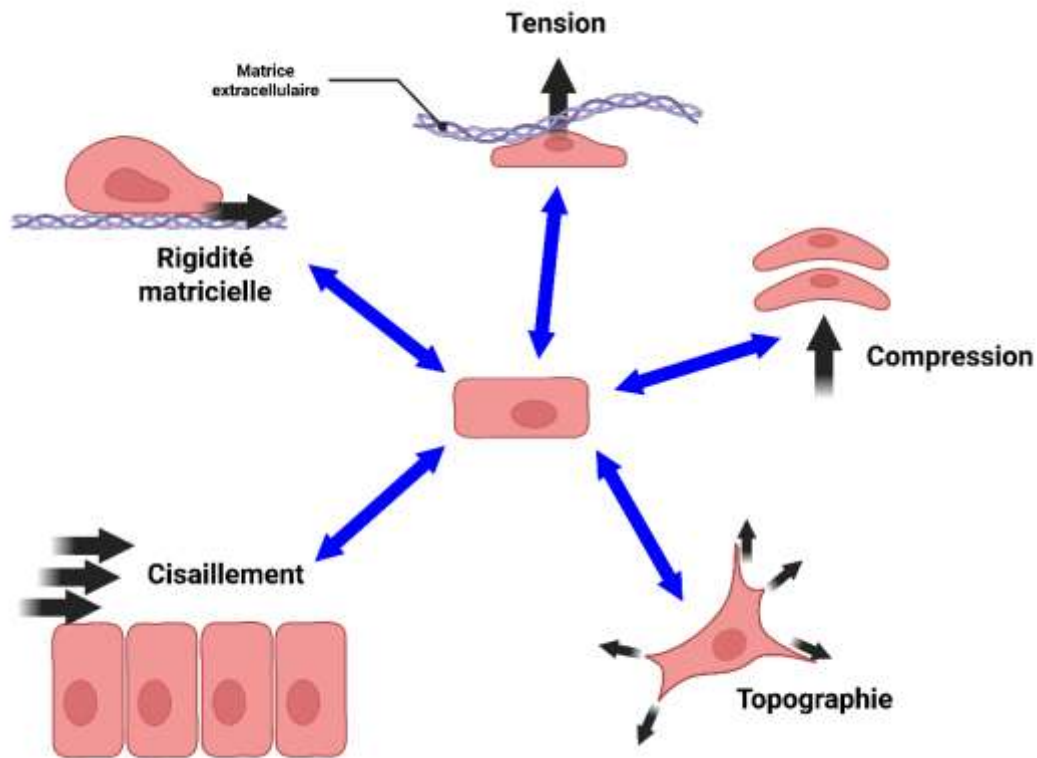


Figure 7 : **Signaux mécaniques perceptibles par une cellule.** Représentation schématisée des signaux mécaniques perceptibles par une cellule. Les forces exercées sur la cellule sont représentées par les flèches en noir. Ces forces sont générées par l'environnement de la cellule, impliquant d'autres cellules, la matrice extracellulaire et les mouvements de fluides. Figure réalisée avec BioRender.com.

La détection de ces signaux repose sur un ensemble de capteurs et de structures, dont l'interaction assure une réponse rapide et coordonnée. On peut regrouper ces acteurs en trois grandes familles : les récepteurs transmembranaires (Intégrines et Cadhérines), les canaux ioniques mécano-activés et les structures mécaniques intracellulaires (Cytosquelette).

Les intégrines sont les principaux récepteurs mécano-sensibles à la jonction cellule-MEC. Une fois activées par des forces d'ancrage ou de traction, elles se lient à des protéines intracellulaires pour former les adhésions focales, complexes multiprotéiques qui transmettent les contraintes à l'actine<sup>221,222</sup>. Les cadhérines, quant à elles, assurent les contacts mécaniques intercellulaires, et participent à la détection des tensions au sein des jonctions d'adhérence<sup>223</sup>.

Des canaux ioniques comme Piezo1, TRPV4, ou TREK-1 répondent directement à des déformations de la membrane plasmique. Leur activation provoque un afflux d'ions (notamment  $\text{Ca}^{2+}$ ) qui sert de signal secondaire pour moduler la réorganisation du cytosquelette, la signalisation Rho GTPase, ou l'activation de facteurs transcriptionnels comme NF- $\kappa$ B ou YAP/TAZ<sup>224,225</sup>.

Enfin, le cytosquelette, transmet les signaux mécaniques vers l'intérieur de la cellule, jusqu'au noyau. Il est interconnecté aux complexes d'adhésion via des protéines adaptatrices comme la taline, la vinculine, la plectine ou la filamine, qui modulent localement la rigidité et la sensibilité à la traction<sup>226,227</sup>.

## ii. La transduction mécanique

Une fois perçues par les récepteurs mécano-sensibles — principalement les intégrines dans les adhésions focales — les forces mécaniques sont transmises à des structures cytoplasmiques spécialisées. Ces forces déclenchent le recrutement de protéines adaptatrices comme taline, vinculine, paxilline, qui lient les intégrines à l'actine. Ce couplage force-protéine est mécano-dépendant : sous tension, la taline change de conformation et révèle des sites de liaison supplémentaires, stabilisant ainsi le complexe d'adhésion et déclenchant une cascade de signalisation intracellulaire<sup>228</sup>. En parallèle, les cadhérines des jonctions intercellulaires (jonctions d'adhérence) transmettent les tensions entre cellules via l'alpha-caténine, qui s'ouvre sous tension pour recruter la vinculine, renforçant l'ancrage à l'actine et permettant la propagation de la force à travers des tissus entiers<sup>223</sup>.

La tension mécanique stabilise les adhésions focales et active localement des GTPases de la famille Rho, notamment RhoA, Rac1 et Cdc42. Ces protéines orchestrent la réorganisation dynamique du cytosquelette d'actine, modifiant la polarité, la contractilité ou la migration cellulaire. RhoA, via la kinase ROCK, stimule la formation de fibres de stress et augmente la contractilité actomyosine, tandis que Rac1 et Cdc42 favorisent respectivement la formation de lamellipodes et de filopodes<sup>229</sup>. Conformément au principe de tensegrité cellulaire développé précédemment, ces mécanismes participent à la propagation mécanique interne, où le cytosquelette fonctionne comme un réseau de transmission de la tension, depuis la membrane jusqu'au noyau.

Enfin, les signaux mécaniques sont transmis au noyau via le cytosquelette et les complexes LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton), qui relient les filaments d'actine à la lamina nucléaire. Cette transmission mécanique peut modifier la forme du noyau,

influencer l'organisation de la chromatine, et réguler l'expression génique. En résumé, la transduction mécanique repose sur un enchaînement coordonné d'événements : (1) déformation perçue à la membrane, (2) activation des complexes d'adhésion et des GTPases, (3) réorganisation cytosquelettique, (4) transmission mécanique au noyau et (5) régulation transcriptionnelle. La régulation transcriptionnelle survenant à la fin de cette chaîne de transmission fait notamment intervenir le duo protéique YAP/TAZ qui seront abordé plus en détail dans un chapitre spécifiquement dédié.

### iii. Le rôle du cytosquelette

Le cytosquelette – au travers de ses différents constituants – occupe une position centrale dans le processus de mécano-sensibilité cellulaire. Il fonctionne à la fois comme capteur, transducteur et effecteur des signaux mécaniques. Son organisation en réseaux dynamiques — actine, microtubules et filaments intermédiaires — lui confère une capacité unique à propager, intégrer et interpréter les contraintes physiques auxquelles la cellule est soumise. Ces réseaux ne sont pas indépendants : ils interagissent étroitement pour assurer une réponse mécanique coordonnée à l'échelle de la cellule entière.

Le réseau d'actine, et plus précisément l'actine corticale associée à la membrane plasmique, est le principal vecteur de propagation des forces mécaniques vers les structures internes. Lorsqu'une force est appliquée sur la cellule — par exemple une traction via les intégrines —, cette tension est immédiatement transmise le long des filaments d'actine organisés en faisceaux, notamment dans les fibres de stress et les câbles périnucléaires. Ces structures, enrichies en myosine II, génèrent une contractilité active, modulée par les voies Rho/ROCK, essentielle pour ajuster la rigidité cellulaire et maintenir l'homéostasie mécanique<sup>230</sup>.

Les microtubules, bien que souvent considérés comme des voies de transport, participent activement à la mécano-transduction. Ils stabilisent la polarité directionnelle lors de la migration induite par des gradients mécaniques (durotaxie) et contribuent à la distribution des forces de traction en régulant les positions des organites, du centrosome et du noyau. Leur capacité à fléchir sous contrainte mécanique et à s'auto-réorganiser en réponse à des tensions les rend particulièrement importants pour l'adaptation à des substrats rigides ou en tension<sup>231</sup>.

Les filaments intermédiaires, tels que la vimentine ou les lamines nucléaires, assurent la résilience mécanique de la cellule. Moins dynamiques que l'actine ou les microtubules, ils forment un maillage élastique qui absorbe et redistribue les contraintes mécaniques internes et

externes. La vimentine, en particulier, est surexprimée dans des contextes de forte tension tissulaire, comme lors de la migration ou de la transition épithélio-mésenchymateuse, ce qui suggère un rôle clé dans la plasticité mécanique cellulaire<sup>232</sup>. La transmission des forces mécaniques vers le noyau implique les complexes LINC, qui connectent les filaments d'actine et les filaments intermédiaires à la lamina nucléaire. Ces complexes, composés principalement de protéines SUN et nesprine, transmettent les tensions mécaniques à l'enveloppe nucléaire, modulant la forme du noyau et influençant l'organisation de la chromatine et l'expression génique. En réponse à une déformation, le noyau s'aplatit ou se rigidifie, ce qui active des régulateurs transcriptionnels mécano-sensibles comme YAP/TAZ ou modifie l'accessibilité de certains loci génomiques<sup>233,234</sup>.

Enfin, des protéines adaptatrices, telles que  $\alpha$ -actinine, gelsoline, filamine ou plectine, orchestrent l'interconnexion entre les différents réseaux du cytosquelette et avec les complexes d'adhésion. Ces molécules jouent un rôle critique dans la régulation locale de la rigidité et dans la stabilisation des liaisons mécaniques, notamment dans les zones de forte contrainte comme les adhésions focales ou les invadopodes<sup>235,236,237,238</sup>.

Il paraît ici plus clair que la mécano-sensibilité, orchestré par le cytosquelette, représente un système efficace de détection, transmission et réponse aux signaux physiques environnementaux. L'efficacité d'un tel système est notamment rendue possible par l'interconnexion permanente entre la membrane plasmique, les complexes d'adhésion, le cytosquelette et le noyau. Ces interactions assurent à la cellule une capacité d'adaptation permanente aux contraintes de son environnement, tant dans des contextes physiologiques que pathologiques comme le cancer ou la fibrose. Néanmoins, il est primordial que ces signaux mécaniques soit transmis à travers des interfaces spécialisées pour assurer un effet fonctionnel. Ces interfaces peuvent être catégorisées selon des contacts cellule-cellule (jonction d'adhérence) ou cellule-matrice (adhésions focales). Par définition, ces interfaces sont médiées par des molécules d'adhésion, qui agissent à la fois comme ancres mécaniques et comme plateforme de signalisation.

## C. Molécules d'adhésion et leurs fonctions mécaniques

Les molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) constituent un groupe hétérogène de glycoprotéines membranaires essentielles à l'architecture tissulaire, au guidage cellulaire, à l'homéostasie mécanique et à la signalisation intercellulaire. Les CAMs agissent comme points d'ancrage mécaniques, assurant la transmission des forces de la membrane vers le cytosquelette, ou entre cellules et MEC. En plus de leur rôle structural, les CAMs agissent comme des plateformes de signalisation biochimique intégrées, activant une variété de voies intracellulaires. Elles sont réparties en quatre grandes familles : intégrines, cadhérines, sélectines, et CAMs de type immunoglobuline (Ig-CAMs) (Figure 8).

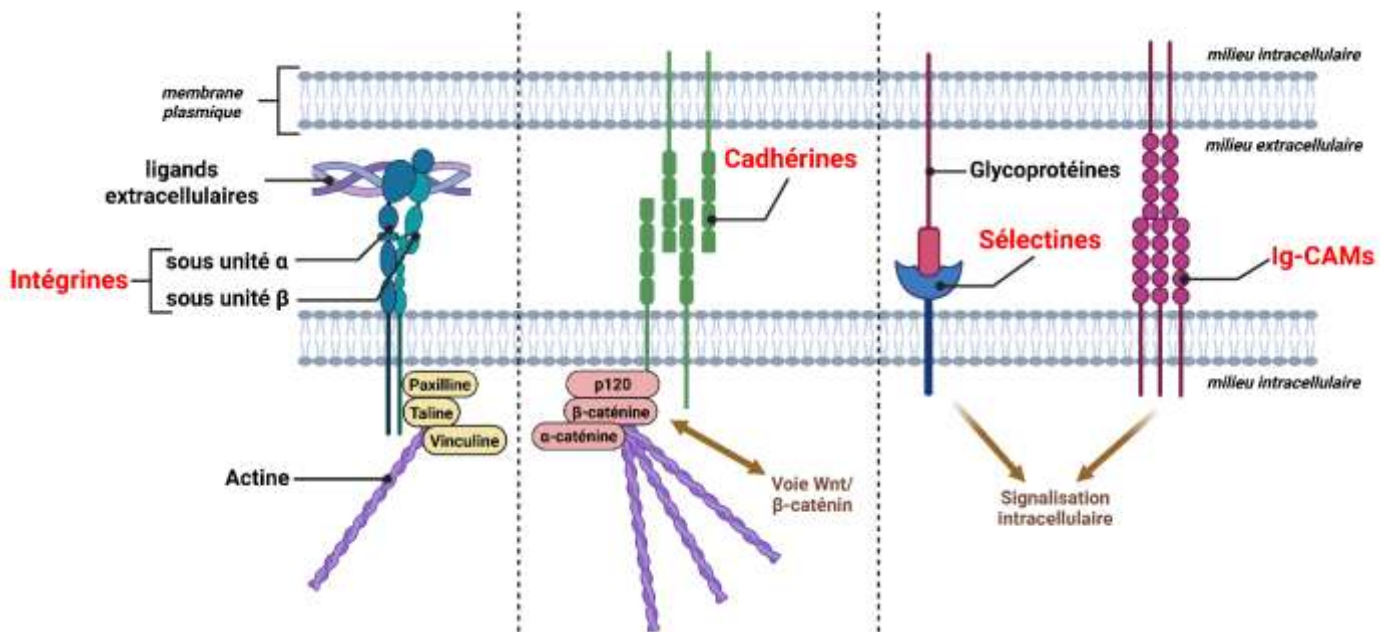


Figure 8 : **Principales molécules d'adhésion et leurs rôles mécaniques et signalétiques.** Les 4 grandes familles de molécules d'adhésion (indiquées en rouge) contribuent à la détection et la transmission des forces mécaniques au sein de la cellule à partir de signaux extracellulaire (provenant de la matrice ou de cellules adjacentes). Ces molécules peuvent également agir comme plateformes de signalisation biochimique par le biais de protéines spécifiques (indiquées en jaune et rose). Figure réalisée avec BioRender.com.

### i. Les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques formés d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . Leur activation par des ligands extracellulaires — tels que le collagène, la fibronectine ou la vitronectine — permet l'établissement d'adhésions focales, où elles sont connectées à l'actine via des protéines adaptatrices comme taline, vinculine ou paxilline<sup>230</sup>. Ces structures sont sensibles aux signaux mécaniques : l'étirement de la taline, par exemple, révèle des sites de liaison pour la vinculine, renforçant l'ancrage et initiant une cascade de mécano-

transduction intracellulaire. L'expansion des adhésions focales reflète ainsi l'intensité des forces perçues, modulant la migration, la polarité et la survie cellulaire<sup>239</sup>. Par ailleurs, les intégrines, via les adhésions focales, permettent une traction cellulaire dirigée, essentielle à la migration, et ajustent la rigidité cellulaire selon les propriétés mécaniques du substrat<sup>216,230</sup>. De plus, elles initient des cascades comme FAK/Src, PI3K/Akt, et MAPK, qui régulent la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. Elles sont également impliquées dans la régulation de la mécano-sensibilité via des effecteurs comme YAP/TAZ<sup>239</sup>.

## ii. Les cadhérines

Les cadhérines, telles que E-cadhérine ou N-cadhérine, sont des glycoprotéines transmembranaires calcium-dépendantes assurant l'adhésion homophile entre cellules via les jonctions d'adhérence. Leur domaine cytoplasmique interagit avec les caténines ( $\alpha$ ,  $\beta$ , p120), qui relient les complexes cadhérine-caténine au cytosquelette d'actine. Sous contrainte mécanique, l' $\alpha$ -caténine s'ouvre, recrutant la vinculine et renforçant l'ancrage au cytosquelette, ce qui permet aux jonctions d'adhérence de se comporter comme des capteurs de force entre cellules voisines<sup>240,241</sup>. Par ailleurs, en reliant les cytosquelettes de cellules adjacentes, les cadhérines assurent la cohésion mécanique des tissus. Dans les tissus épithéliaux, cette capacité permet d'absorber les contraintes de cisaillement ou d'étirement et d'y répondre collectivement<sup>241</sup>. De plus, elles participent à la régulation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine : en cas de perte d'adhésion, la  $\beta$ -caténine est libérée du complexe jonctionnel et migre dans le noyau, influençant la transcription de gènes cibles liés à la croissance cellulaire<sup>242</sup>.

## iii. Les sélectines

Les sélectines (E, P, L) reconnaissent des motifs glycaniques spécifiques (comme le sialyl Lewis X) et sont particulièrement actives dans l'adhésion transitoire des leucocytes à l'endothélium lors de l'inflammation. Bien qu'elles ne soient pas directement reliées au cytosquelette, leurs domaines cytoplasmiques peuvent déclencher des signaux intracellulaires favorisant la transmigration cellulaire ou l'activation immunitaire<sup>243,244</sup>.

## iv. Les CAMs de la superfamille des Immunoglobulines

Les CAMs de la superfamille des immunoglobulines (comme ICAM-1, VCAM-1 ou NCAM) sont exprimées dans de nombreux tissus et régulent les interactions cellule-cellule de manière moins rigide que les cadhérines. Elles jouent un rôle central dans la réponse immunitaire, le développement neuronal, et la migration, notamment via l'activation de

voies calcium-dépendantes et de MAPK/ERK<sup>245</sup>. Les CAMs de cette famille sont également représentatives d'une dualité fonctionnelle en agissant comme point d'ancrage mécaniques et comme plateformes de signalisation biochimique. Parmi ses membres, on pourra citer par exemple ICAM-1 et VCAM-1, qui sont parmi les plus étudiés en raison de leur implication dans la signalisation oncogénique, la migration, la survie cellulaire, et la métastase<sup>246,247,248</sup>.

ICAM-1 est exprimée à faible niveau dans de nombreux types cellulaires, et fortement induite lors de stimulations inflammatoires (par exemple par TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$ ). Son rôle principal est de stabiliser les interactions entre leucocytes et cellules endothéliales, facilitant ainsi leur transmigration vers les tissus inflammés. Elle agit comme ligand pour l'intégrine LFA-1 (CD11a/CD18) sur les lymphocytes T, les cellules NK et les monocytes, permettant leur arrêt sur l'endothélium et leur passage par diapedèse. Ce rôle est crucial dans les réponses immunitaires locales, notamment dans les tissus infectés ou tumoraux<sup>249</sup>. Sur le plan signalétique, ICAM-1 n'est pas une simple molécule d'ancrage : son regroupement (clustering) active des cascades intracellulaires impliquant le recrutement de kinases comme Src, la phosphorylation de protéines cytosquelettiques et l'organisation de réseaux d'actine. Ce processus modifie la perméabilité vasculaire et peut favoriser la formation de "gaps" entre cellules endothéliales lors de l'inflammation<sup>250</sup>.

VCAM quant à lui, est exprimé par les cellules endothéliales activées, notamment dans des sites d'inflammation chronique (articulations, vaisseaux, tissus tumoraux). Elle interagit avec l'intégrine VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) sur les cellules T, B et les cellules souches hématopoïétiques. Sa fonction première est de faciliter le recrutement sélectif de lymphocytes activés dans les tissus cibles, ce qui est particulièrement important dans les pathologies auto-immunes ou l'oncogenèse. Elle intervient aussi dans le trafic cellulaire dans la moelle osseuse et l'invasion métastatique de certains cancers<sup>251,252</sup>. Du point de vue de la signalisation, l'engagement de VCAM-1 peut activer la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène), moduler l'activité de NF- $\kappa$ B, et induire des changements cytosquelettiques favorisant l'ouverture de jonctions intercellulaires et la migration trans-endothéliale<sup>253</sup>. Ces deux molécules sont ainsi des éléments clés de l'immuno-surveillance, mais aussi des amplificateurs mécano-sensibles de la réponse inflammatoire, capables de moduler les propriétés barrières de l'endothélium et d'activer des cascades intracellulaires.

Les molécules d'adhésion jouent aussi un rôle essentiel dans la façon dont les cellules perçoivent et interprètent les contraintes mécaniques qui les entourent. En agissant comme des relais entre l'environnement physique et les circuits de signalisation intracellulaire, elles

influencent directement le comportement cellulaire. Parmi les voies activées en réponse à ces signaux mécaniques, la voie HIPPO se distingue particulièrement. D'abord connue pour son implication dans la régulation de la croissance tissulaire, elle est aujourd'hui reconnue comme un intégrateur majeur des signaux mécaniques, agissant en aval des forces exercées sur les complexes d'adhésion et le cytosquelette. Son effecteur final, le duo transcriptionnel YAP/TAZ, traduit mécaniquement l'état physique de la cellule en réponses géniques déterminant son destin. Le chapitre suivant se consacrera à l'analyse détaillée de cette voie et des mécanismes par lesquels elle relie mécano-perception, organisation tissulaire et plasticité cellulaire.

## IV. La voie de signalisation Hippo (YAP/TAZ)

### A. De la *Drosophile* aux mammifères

Au début des années 2000, la voie de signalisation Hippo a été initialement décrite chez *Drosophila melanogaster* dans le cadre de criblages génétiques visant à identifier les régulateurs de la croissance tissulaire et des tumeurs. L'observation de phénotypes de surcroissance anormale dans des clones mutants a conduit à l'identification de gènes suppresseurs de tumeurs dont l'inactivation provoquait une prolifération cellulaire excessive et empêchait l'apoptose<sup>254,255</sup>. Tirant son nom de la protéine kinase Hippo (Hpo), il a été mis en évidence que les mutations de cette protéine conduisent à une prolifération tissulaire anormale associée à un phénotype de type « hippopotame ». Par ailleurs, on observe chez ces mutants une croissance anormale au niveau des disques imaginaux, structures à partir desquelles les différentes parties de l'insecte adulte seront formées. Ces premiers travaux ont permis d'établir la base de la voie Hippo, un mécanisme de signalisation intracellulaire hautement conservé<sup>256,257</sup>.

Chez la drosophile, la voie Hippo repose sur une cascade de kinases hautement régulées, telle que la kinase Hippo (Hpo), une sérine/thréonine kinase, qui active en aval la kinase Warts (Wts) via la protéine adaptatrice Salvador (Sav). L'activation de Warts conduit à la phosphorylation et à l'inactivation du coactivateur transcriptionnel Yorkie (Yki). À l'état phosphorylé, Yki est retenu dans le cytoplasme, ce qui empêche son interaction avec les facteurs de transcription nucléaires comme Scalloped (Sd). Lorsque la voie est inactivée, Yki migre dans le noyau, induisant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose<sup>258,259,260</sup>. La régulation en amont de cette cascade implique des protéines membranaires et des senseurs de polarité cellulaire, tels que Fat, Dachous, Merlin (Mer), Expanded (Ex) et Kibra, qui influencent l'activation de Hippo en réponse à la densité cellulaire, à la tension mécanique ou aux signaux extracellulaires<sup>259,261</sup>.

La voie Hippo joue un rôle critique dans le contrôle de la taille des organes en régulant à la fois la prolifération cellulaire et l'apoptose<sup>260,262,263,264</sup>. Elle empêche la croissance excessive des tissus, garantissant que les organes atteignent une taille appropriée durant le développement. En l'absence de signal Hippo, l'activation de Yorkie conduit à une augmentation de l'expression de gènes tels que diap1 (inhibiteur de l'apoptose) et cyclin E, favorisant ainsi la croissance tissulaire<sup>261</sup>.

La caractérisation de la voie Hippo chez *Drosophila melanogaster* a constitué une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes de régulation de la croissance et de la taille des organes. Cette découverte a non seulement permis d'identifier les bases moléculaires d'un système de freinage du développement tissulaire, mais elle a aussi révélé une voie de signalisation conservée chez les organismes supérieurs. Chez les mammifères, la voie Hippo a émergé comme un acteur central de l'intégration des signaux mécaniques (mécano-sensibilité) et de la perception du microenvironnement cellulaire. Elle répond aux changements de la rigidité de la matrice extracellulaire, à la tension cellulaire et au contact cellule-cellule, jouant ainsi un rôle essentiel dans la traduction des contraintes mécaniques en réponses transcriptionnelles<sup>265,266,267,268</sup>. À travers ces mécanismes, la voie Hippo participe activement à l'orchestration de la prolifération, de l'apoptose, de la différenciation, ainsi qu'à l'organisation tissulaire<sup>269,270,271</sup>.

Tout comme Yorkie chez la drosophile, les effecteurs transcriptionnels YAP (Yes-associated protein) et TAZ (Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) constituent les relais fonctionnels majeurs de la voie chez les mammifères<sup>272</sup>. À l'instar de Yorkie, YAP et TAZ sont inhibés par phosphorylation en aval de la cascade Hippo, ce qui empêche leur translocation nucléaire et limite l'activation transcriptionnelle de gènes contrôlant la prolifération et la survie cellulaire<sup>258</sup>. Ces deux coactivateurs sont sensibles à l'état mécanique de la cellule et traduisent des signaux physiques – tels que la tension membranaire, la rigidité de la matrice extracellulaire ou encore la forme cellulaire – en programmes transcriptionnels adaptatifs<sup>265,267</sup>. De plus, il est important de garder à l'esprit que c'est la phosphorylation inhibitrice de ses effecteurs finaux (YAP/TAZ) qui traduit une activation de la voie. Lorsqu'ils sont déphosphorylés, YAP/TAZ s'accumulent dans le noyau et activent la transcription de gènes impliqués dans la croissance, la survie et la différenciation. Ce mode de fonctionnement, dit ON/OFF, est schématisé dans la figure 9. Les différents acteurs de la voie seront discutés dans les sections suivantes.

## i. Les kinases et adaptateurs de la voie

La voie Hippo chez les mammifères repose sur une cascade de phosphorylation conservée, composée de protéines homologues à celles identifiées initialement chez *Drosophila melanogaster*.

Les protéines MST1 et MST2 (orthologues de Hippo chez la drosophile) sont des kinases sérine/thréonine et sont les kinases initiatrices de la voie Hippo. Elles possèdent un domaine catalytique N-terminal et un domaine SARAH (Sav-RASSF-Hpo) C-terminal, qui leur permet d'interagir avec d'autres régulateurs comme SAV1 ou RASSF. L'activation de MST1/2 repose sur une autophosphorylation de la thréonine 183 (MST1) ou 180 (MST2), événement indispensable pour initier la cascade de signalisation. Ces kinases phosphorylent ensuite les protéines LATS1/2, activant ainsi les étapes suivantes de la voie Hippo<sup>271,273</sup>. Pour cela, la présence de la protéine SAV1 est indispensable. SAV1 (Salvador homolog 1) agit comme une plateforme adaptatrice. Homologue de Salvador chez la drosophile, elle sert de cofacteur à l'activation de MST1/2. Grâce à son propre domaine SARAH (situé en C-terminal), elle peut former des complexes homo- ou hétérodimériques via des interactions coiled-coil spécifiques avec d'autres protéines, contenant elles aussi un domaine SARAH, comme MST1/2 et les protéines RASSF (Ras association domain family). En formant un complexe stable avec MST1/2, SAV1 favorise leur activation par autophosphorylation et leur localisation aux jonctions cellulaires<sup>274</sup>. Ce positionnement spatial, à la membrane plasmique est crucial pour stabiliser et potentialiser l'activité de MST1/2 et assurer une transmission efficace du signal vers LATS1/2<sup>273,275</sup>.

Les kinases LATS1 et LATS2 (Large Tumor Suppressor kinases), orthologues de Warts chez la drosophile, représentent le cœur de la branche effectrice de la cascade. Leur activation requiert la phosphorylation de résidus spécifiques, notamment le motif hydrophobe Thr1079 sur LATS1 et leur association avec la protéine MOB1 (Mps One Binder kinase activator-like 1), homologue de Mats chez la drosophile, qui est également essentielle à leur pleine activité. Une fois activées, LATS1/2 phosphorylent YAP et TAZ sur des résidus critiques, notamment S127 (YAP) et S89 (TAZ), déclenchant ainsi leur séquestration cytoplasmique par 14-3-3 et l'inhibition de leur activité transcriptionnelle<sup>273,276,277</sup>.

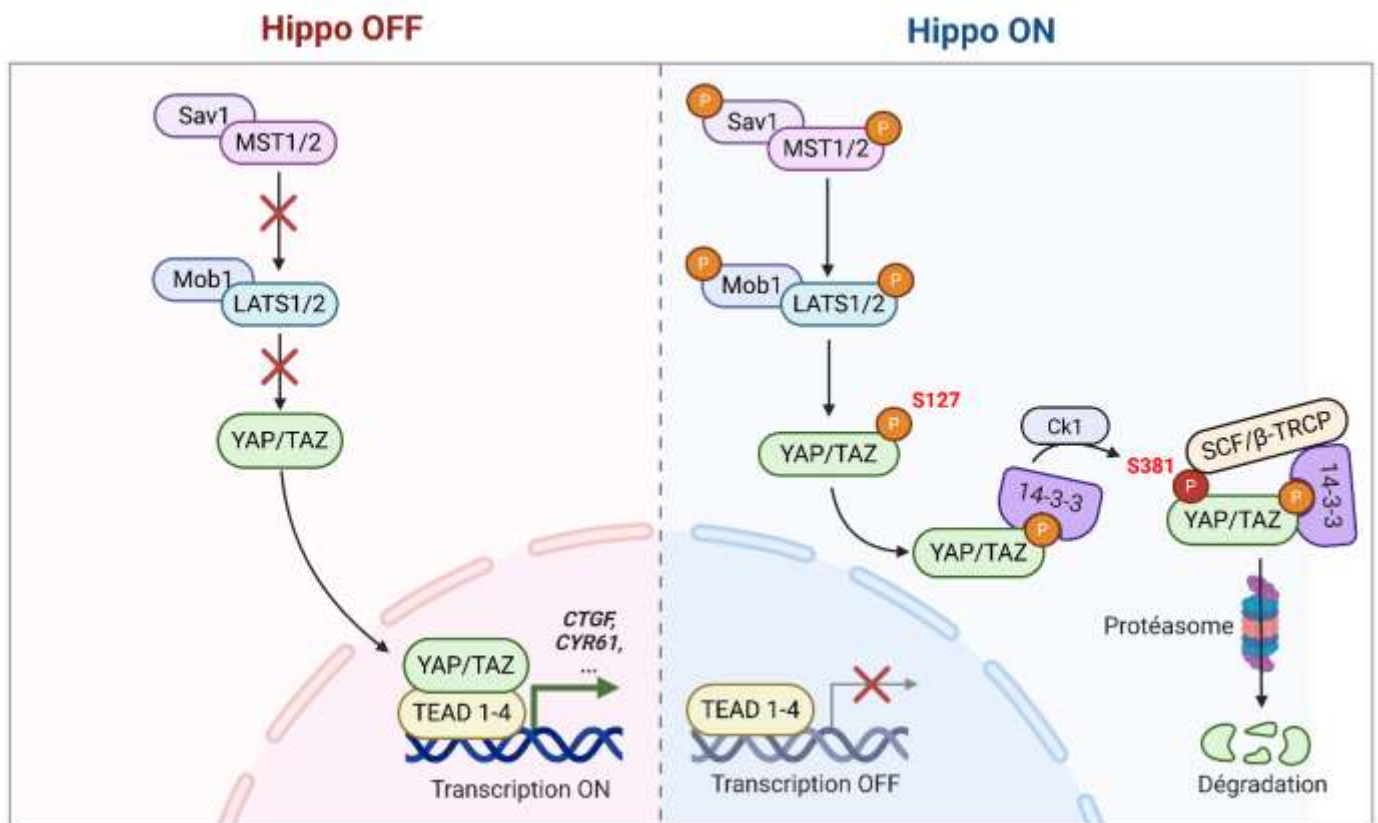


Figure 9 : **Représentation schématique de la voie de signalisation HIPPO chez les mammifères.** Lorsque la voie hippo n'est pas activée (Hippo OFF), les effecteurs finaux YAP/TAZ ne sont pas phosphorylés et peuvent transloquer dans le noyau et se fixer à certains facteurs de transcription comme TEAD 1-4, permettant la transcription de gènes cibles (CTGF, CYR61, etc). D'autres partenaires nucléaires de YAP/TAZ existent et ne sont pas figurés ici (AP-1, SMADs, RUNX1/2, etc). À l'inverse, l'activation de la voie (Hippo ON) entraîne l'activation successive de différentes kinases (MST1/2 et LATS1/2) qui aboutissent à la phosphorylation de YAP sur la Sérine S127 (Sérine 89 pour TAZ, non représentée sur le schéma) et sa dégradation par le protéasome. Figure réalisée avec BioRender.com.

La protéine MOB1 agit comme un coactivateur de LATS1/2. Phosphorylée par MST1/2 sur plusieurs résidus sérine et thréonine (notamment Thr12 et Thr35), MOB1 subit un changement conformationnel qui augmente son affinité pour LATS1/2<sup>271,273</sup>. MOB1 se lie alors aux domaines N-terminal de LATS1/2 et augmente leur activité kinase. Elle favorise ainsi leur interaction avec MST1/2, créant un complexe fonctionnel (MST1/2–MOB1–LATS1/2) nécessaire à la transmission du signal. En d'autres termes, MOB1 agit comme un adaptateur phosphorylé, rapprochant spatialement la kinase activatrice (MST) et son substrat (LATS), tout en augmentant la vitesse et l'efficacité de la transmission du signal<sup>276</sup>. Cette interaction constitue une étape clé dans l'amplification et la robustesse de la signalisation Hippo<sup>273,278,279</sup>.

Non spécifique de cette voie de signalisation, la protéine 14-3-3 est un régulateur central de la localisation subcellulaire des effecteurs finaux YAP/TAZ. En se liant aux sites phosphorylés (notamment S127 de YAP), 14-3-3 masque les séquences de localisation nucléaire (NLS) et empêche leur entrée dans le noyau. Elle agit comme un "verrou" cytoplasmique : tant que la phosphorylation est maintenue, YAP/TAZ restent inactifs dans le cytoplasme. Cette interaction est réversible, permettant une régulation dynamique en réponse à des stimuli mécaniques ou biochimiques<sup>276,278</sup>.

## ii. Les effecteurs finaux de la voie : YAP/TAZ

En aval de la voie Hippo/MST1/2, s'opère la régulation des effecteurs finaux YAP et TAZ, deux coactivateurs transcriptionnels présentant une forte homologie fonctionnelle. Tous deux possèdent un domaine de liaison aux facteurs de transcription TEAD, un ou deux domaines WW impliqués dans les interactions protéines-protéines, un domaine d'activation transcriptionnelle, ainsi qu'un motif PDZ à l'extrémité C-terminale. YAP se distingue de TAZ par la présence de deux domaines WW, ce qui lui confère une capacité d'interaction plus étendue. La phosphorylation de YAP/TAZ par LATS1/2 constitue le principal mode de régulation. La phosphorylation sur la sérine 127 (YAP) ou 89 (TAZ) induit leur liaison à la protéine 14-3-3. Cette interaction masque la séquence NLS, entraîne leur rétention dans le cytoplasme, et inhibe leur activité transcriptionnelle<sup>273,279</sup>. La phosphorylation supplémentaire de YAP sur la S381 (ou de TAZ sur la S311) par LATS, suivie d'une phosphorylation secondaire par CK1, entraîne la formation d'un motif de dégradation phospho-dépendant. Ce motif, appelé motif DSGXXS, est reconnu par le complexe SCF/ $\beta$ -TRCP, qui est une ubiquitine ligase E3. Cela conduit à l'ubiquitination puis à la dégradation protéasomale de YAP/TAZ<sup>271</sup>. D'autres résidus, comme S61, S109 et S164, sont également ciblés par LATS1/2 ou CK1. Leur phosphorylation contribue à maintenir YAP à l'état inactif, empêchant sa localisation nucléaire et sa fonction transcriptionnelle<sup>273,279</sup>.

L'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ module l'expression de nombreux gènes cibles impliqués dans la prolifération, la survie, la migration, et l'interaction cellule-microenvironnement. La majorité de ces effets sont médiés par leur interaction avec les facteurs de transcription TEAD1–4. D'autres partenaires (comme AP-1, RUNX1/2, SMADs ou p73) peuvent être recrutés dans des contextes cellulaires et pathologiques spécifiques<sup>280,281</sup>. CTGF (Connective Tissue Growth Factor, ou CCN2) et CYR61 (ou CCN1) sont deux des gènes cibles classiques les plus sensibles à l'activation de YAP/TAZ–TEAD. Ils participent à la prolifération

cellulaire, à l'adhésion et au remodelage de la matrice extracellulaire<sup>282</sup>. Les gènes ANKRD1, AMOTL2, et AREG (amphiregulin) sont également régulés par le complexe YAP/TAZ–TEAD. Ils interviennent dans la mécano-transduction, la migration cellulaire et la communication paracrine, notamment via l'activation secondaire de récepteurs comme EGFR<sup>283</sup>. Dans certains contextes physiologiques, YAP et TAZ apparaissent également comme coactivateurs transcriptionnels jouant un rôle non négligeable dans la régulation de certaines voies métaboliques. Bien que leur implication dans le contrôle direct de la glycolyse ou du métabolisme mitochondrial ne soit pas universelle à tous les types cellulaires, plusieurs études ont montré qu'ils peuvent moduler l'expression de gènes impliqués dans la prise de nutriments et la biosynthèse. Par exemple, YAP peut favoriser l'expression de transporteurs de glucose (GLUT1) ou de glutamine (SLC1A5), et celle d'enzymes comme PGAM1 dans certains modèles, notamment hépatiques ou cancéreux<sup>284,285</sup>. Des travaux ont également mis en évidence une capacité de YAP/TAZ à influencer la biogenèse mitochondriale via l'activation de PGC1 $\alpha$  dans des cellules musculaires ou cardiaques, bien que ce lien demeure dépendant du contexte tissulaire et du statut différenciatif<sup>286</sup>.

Indépendamment des phosphorylations successives sur les résidus sérine (par LATS et CK1), YAP peut également être phosphorylé sur sa tyrosine 357 (Y357), un site dont la phosphorylation confère des propriétés fonctionnelles distinctes. Cette modification est catalysée par la kinase c-Abl en réponse à un stress génotoxique, mais peut également être induite par des membres de la famille des kinases Src. Contrairement aux phosphorylations médiées par LATS1/2, la phosphorylation de YAP sur la Y357 favorise son accumulation nucléaire en bloquant l'interaction avec la protéine 14-3-3. Dans le noyau, YAP phosphorylé sur cette tyrosine forme un complexe avec le facteur de transcription p73, conduisant à l'activation de gènes pro-apoptotiques tels que BAX et PUMA<sup>287</sup>.

Taz présente des similarités avec ces systèmes de régulations. Par exemple, le résidu S89 joue le même rôle que le résidu S127 de YAP. Sa phosphorylation par LATS1/2 permet la liaison à 14-3-3 et retient TAZ dans le cytoplasme<sup>288</sup>. Le résidu S311 est équivalent à S381 chez YAP. Il est aussi phosphorylé par CK1, ce qui conduit à sa dégradation via le complexe SCF/ $\beta$ -TRCP. D'autres sites comme S66, S117, S314 sont également phosphorylés. Ensemble, ces résidus contrôlent la stabilité et l'inactivation de TAZ<sup>289</sup>. Dans plusieurs modèles cellulaires, YAP et TAZ ont des rôles redondants et peuvent partiellement compenser l'absence de l'autre. Par exemple, dans les cellules souches embryonnaires, la double inactivation de YAP et TAZ entraîne une perte massive de viabilité et d'adhésion, tandis que la délétion de l'un seul peut

être compensée par une surexpression adaptative de l'autre<sup>290</sup>. Inversement, des surexpressions expérimentales de YAP peuvent partiellement restaurer la fonction ostéogénique dans des cellules TAZ<sup>-/-</sup>, bien que l'efficacité transcriptionnelle sur certains gènes spécifiques (comme Runx2 ou PPAR $\gamma$ ) reste inférieure à celle de TAZ natif<sup>267</sup>.

Malgré ces similarités, des différences notables existent entre les deux protéines. YAP et TAZ sont exprimés de manière ubiquitaire mais avec des niveaux variables selon les tissus. Des analyses transcriptomiques ont par ailleurs montré que YAP est fortement exprimé dans les tissus embryonnaires, le foie, l'intestin, le cœur et l'épiderme. TAZ est quant à lui particulièrement actif dans les tissus mésenchymateux, notamment le muscle squelettique, le tissu conjonctif, et les cellules souches mésenchymateuses où il joue un rôle essentiel dans la différenciation ostéoblastique et adipocytaire<sup>272</sup>. De plus, des études de délétion génique (knockout) chez la souris ont permis de mieux distinguer leurs rôles fonctionnels. La délétion de YAP est létale au stade embryonnaire (entre 8 et 10 jours après la fécondation), provoquant des défauts majeurs de gastrulation, de vascularisation et de développement cardiaque, ce qui souligne son rôle central dans le développement précoce<sup>291</sup>. En revanche, les souris TAZ<sup>-/-</sup> sont viables mais présentent des anomalies du squelette, une ostéopénie et une déficience dans la formation du tissu conjonctif, confirmant le rôle plus tardif et spécialisé de TAZ dans la différenciation des lignées mésenchymateuses<sup>292</sup>. De plus, les différences dans les domaines WW entre YAP et TAZ influencent leur spectre d'interactions protéiques<sup>293,294</sup>. En interagissant avec un plus grand nombre de partenaires (TEAD étant celui principalement étudié), YAP possède une plus grande polyvalence dans les programmes transcriptionnels. TAZ interagit de manière plus stable avec certains régulateurs de la différenciation, en particulier dans les contextes de réponse mécanique et de contrôle de la polarité cellulaire<sup>273,295,296,297</sup>.

Parallèlement aux études faites selon des modèles d'inhibitions, l'introduction de modèles d'étude « activateurs » ont permis d'explorer en détail ces différents mécanismes fonctionnels<sup>298,299,300</sup>. Par exemple, le modèle YAP 5SA est utilisé pour simuler l'activation constitutive de YAP. Ce modèle est généré par la substitution en alanine de 5 sites de phosphorylations (S61, S109, S127, S164 et S381) impliqués dans la phosphorylation par LATS1/2, permettant à YAP de s'affranchir de la séquestration cytoplasmique par 14-3-3 et d'être constitutivement actif dans le noyau<sup>301</sup>. Ce mutant est utilisé comme outil expérimental pour étudier les différents effets de YAP et sa relation avec TAZ, indépendamment de la cascade Hippo. Ainsi, ce mutant permet de s'affranchir de la diversité et de la complexité des signaux en amont de la voie que nous allons maintenant aborder.

### iii. Signaux régulateurs en amont de la voie Hippo

Bien que les grands principes de la voie soient conservés entre les espèces, les mécanismes régulateurs en amont diffèrent sensiblement entre la drosophile et les mammifères. Chez *Drosophila melanogaster*, les protéines Expanded, Merlin et Fat constituent des régulateurs majeurs du complexe Hippo, jouant un rôle central dans le contrôle de la croissance et de l'organisation tissulaire. En revanche, aucun homologue fonctionnel direct d'Expanded n'a été identifié chez les mammifères, et les multiples paralogues de Fat (Fat1 à Fat4) n'exercent pas un rôle clairement défini dans la régulation de YAP/TAZ. Les travaux d'Helen McNeill ont particulièrement mis en évidence cette divergence évolutive : si Fat4, l'homologue le plus apparent de la protocadhérine Fat, est impliqué dans la régulation de la polarité planaire et de la morphogenèse, son lien avec l'activité canonique de la voie Hippo est contextuel et souvent indépendant du module MST1/2–LATS1/2<sup>302,303</sup>. Par exemple, dans le rein ou l'épiderme, Fat4 joue un rôle crucial dans le positionnement cellulaire et la polarité, mais sans forcément passer par une modulation directe de YAP/TAZ<sup>304,305</sup>. Un autre aspect fondamental qui distingue les deux modèles concerne la mécano-transduction. Tandis que les effets de la tension mécanique, de la rigidité de la matrice extracellulaire ou du cisaillement sur l'activité de YAP/TAZ sont largement étudiés chez les mammifères, notamment dans des modèles de culture cellulaire ou d'ingénierie tissulaire, ces dimensions biophysiques ont été peu explorées chez la drosophile. Ainsi, l'importance des signaux mécaniques dans l'activation de YAP/TAZ semble être une caractéristique émergente et amplifiée chez les vertébrés, illustrant une spécialisation évolutive dans l'intégration des signaux de densité et de contrainte mécanique au sein des tissus complexes<sup>306,307</sup>. La figure 10 illustre les différents signaux en amont de la voie Hippo et ayant un impact sur l'activité de YAP/TAZ. Ces derniers seront discutés plus en détails dans les paragraphes et sections suivantes.

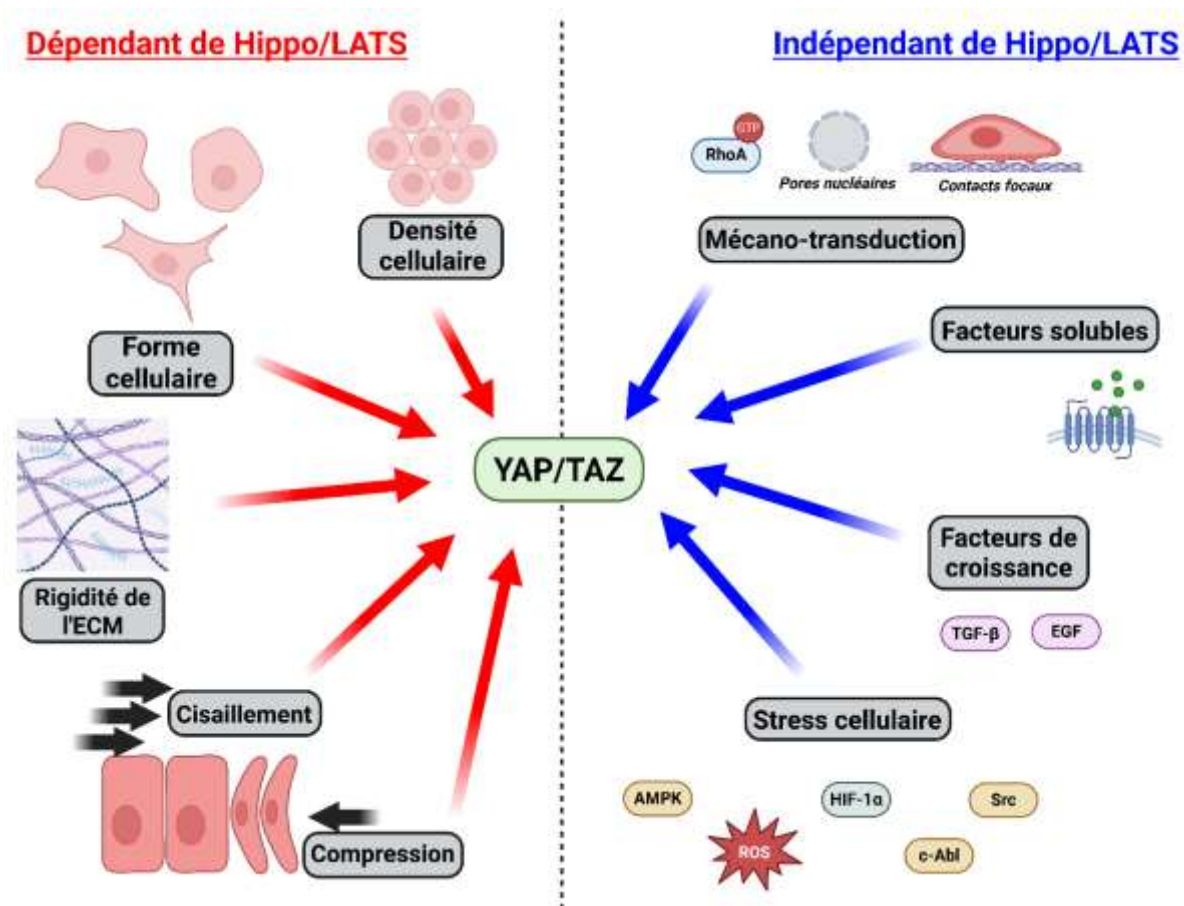


Figure 10 : Représentation schématique des signaux modulant l'activité de YAP/TAZ. Les signaux modulant l'activité de YAP/TAZ de manière dépendante de la signalisation Hippo/LATS sont indiqués par les flèches rouges. Les flèches bleues indiquent les signaux le faisant de manière indépendante de cette signalisation. Figure réalisée avec BioRender.com.

La densité cellulaire est un régulateur majeur de la voie Hippo. Lorsqu'une cellule est isolée ou faiblement connectée à ses voisines, les jonctions adhérentes sont peu développées, la tension intracellulaire est élevée, et la voie Hippo est inactive<sup>308,309,310</sup>. Dans ce contexte, YAP/TAZ ne sont pas phosphorylés et s'accumulent dans le noyau, stimulant la prolifération cellulaire. À l'inverse, lorsque la densité cellulaire augmente, les cellules établissent de nombreuses jonctions de type E-cadhérine/ $\beta$ -caténine, ce qui conduit à une redistribution du cytosquelette d'actine, à une diminution de la tension et à l'activation de la cascade Hippo. Les kinases LATS1/2 phosphorylent alors YAP/TAZ, provoquant leur exclusion nucléaire et leur inactivation fonctionnelle<sup>265,311</sup>.

La forme cellulaire influence également cette régulation. Des expériences de confinement spatial ont démontré que les cellules étalées ou allongées conservent YAP/TAZ actifs, tandis que les cellules confinées sur de petites surfaces (favorisant une forme arrondie) présentent une inactivation de YAP/TAZ<sup>267,312,313,314</sup>. Ces différences morphologiques modulent

les forces de traction internes via le cytosquelette d'actomyosine. Des travaux menés par Zhao et al. en 2012 ont par ailleurs mis en évidence la capacité de la GTPase RhoA, sous sa forme activée (RhoA-GTP), à stimuler la formation de fibres de stress d'actine (F-actine) et augmenter la tension intracellulaire. Cette tension inhibe les kinases LATS1/2 et permet à YAP de migrer dans le noyau et augmenter l'expression de gènes cibles telles que CTGF ou CYR61<sup>315</sup>. Le complexe apical Crumbs et la protéine AMOT (Angiomotin) sont également impliqués dans cette régulation, en agissant comme capteurs topologiques et en recrutant les kinases initiatrices (MST1/2) et effectrices (LATS1/2) de la voie Hippo<sup>316,317,318</sup>.

La rigidité de la matrice extracellulaire (MEC) constitue une autre dimension critique de la régulation de la voie Hippo. Les cellules interagissent avec l'ECM via des intégrines et des complexes d'adhésion focale, qui transmettent des signaux mécaniques à travers les protéines taline, paxilline, vinculine, et FAK (Focal Adhesion Kinase). Lorsque les cellules sont en contact avec une matrice rigide (comme dans les tissus osseux ou les tumeurs fibrotiques), elles génèrent de fortes forces de traction via l'activation de RhoA et ROCK, ce qui inhibe la cascade Hippo et permet la translocation nucléaire de YAP/TAZ. À l'opposé, sur des substrats souples (comme les tissus adipeux ou cérébraux), l'absence de tension mécanique conduit à l'activation des kinases LATS1/2 et à l'inactivation de YAP/TAZ<sup>319</sup>. Ce couplage mécanochimique permet aux cellules de répondre ou s'adapter à la nature de leur environnement, en régulant la migration cellulaire, l'angiogenèse, la différenciation des cellules souches mésenchymateuses, ou encore la progression tumorale<sup>265,295</sup>. Par ailleurs, les intégrines — récepteurs transmembranaires majeurs d'adhésion cellule-matrice — régulent l'activité de YAP/TAZ par plusieurs mécanismes. Les intégrines activent des voies qui convergent vers LATS1/2 en modulant notamment le cytosquelette d'actine<sup>315</sup>. L'activation de FAK (Focal Adhesion Protein) par diverses intégrines peut réprimer l'activité de LATS1/2 en modulant leurs interactions avec AMOT ou NF2 (merlin), conduisant à une déphosphorylation de YAP/TAZ et donc à leur activation<sup>320</sup>. D'autre part, la perte d'adhérence à la MEC, observable par exemple dans des cellules épithéliales normales, déclenche une forme spécifique d'apoptose appelé anoïkis. Ce processus est contrôlé par la voie Hippo : les signaux provenant des intégrines, en lien avec la réorganisation du cytosquelette d'actine, provoque la rétention cytoplasmique de YAP/TAZ via une activation des kinases MST1/2 et LATS1/2<sup>315,320</sup>. Cependant, dans les cellules tumorales, cette régulation est souvent perturbée : l'inhibition de la voie Hippo ou la surexpression de YAP/TAZ permet aux cellules de résister à l'anoïkis, favorisant ainsi leur survie en conditions d'ancrage perdues, comme lors de la dissémination métastatique<sup>315,320</sup>.

Outre les signaux de contact et les propriétés matricielles, nous avons précédemment discuté d'autres propriétés mécaniques dynamiques telles que le cisaillement ou la compression. Ces forces influencent également la signalisation Hippo et la localisation subcellulaire de YAP/TAZ. Dans les cellules endothéliales, par exemple, un flux laminaire stable active les kinases LATS1/2, inhibant YAP/TAZ et favorisant un phénotype anti-prolifératif et anti-inflammatoire<sup>321,322</sup>. À l'inverse, un flux oscillant ou turbulent désactive la voie Hippo et favorise la translocation nucléaire de YAP, contribuant à des réponses pathogènes telles que l'athérosclérose<sup>321</sup>. Des études ont aussi montré que les cellules soumises à un étirement cyclique, tel qu'observé dans les muscles ou les poumons, présentent une activation soutenue de YAP/TAZ, qui joue un rôle dans la croissance musculaire, la réparation tissulaire et la réponse inflammatoire<sup>323</sup>. La compression, en revanche, tend à activer la voie Hippo et donc à inhiber YAP/TAZ, bien que les mécanismes exacts restent moins caractérisés<sup>324</sup>.

L'activité de YAP/TAZ résulte d'une intégration complexe de plusieurs types de signaux intracellulaires, incluant non seulement les forces mécaniques transmises via le cytosquelette, mais aussi des signaux solubles tels que les facteurs de croissance, les cytokines, ainsi que des conditions de stress cellulaire comme l'hypoxie, le stress oxydatif ou les perturbations métaboliques. Ces stimuli activent des réseaux moléculaires complexes, composés de cascades de phosphorylation, d'interactions protéiques spécifiques et de modifications post-traductionnelles. Ensemble, ces mécanismes contrôlent avec précision la localisation, la stabilité et l'activité transcriptionnelle de YAP et TAZ.

#### iv. Régulation de YAP/TAZ indépendant de Hippo/LATS

##### a. MECANO-TRANSDUCTION

La mécano-transduction peut aussi influencer la localisation et l'activité de YAP/TAZ de manière non canonique, indépendamment de LATS (Figure 10). Les intégrines, notamment  $\beta 1$ , transmettent des forces mécaniques à l'intérieur de la cellule via les adhésions focales, stimulant des cascades kinases qui contournent la voie Hippo. La signalisation intégrine  $\beta 1$ -FAK-Src-PI3K-PDK1 active RhoA et renforce la contractilité de l'actomyosine, induisant une entrée nucléaire de YAP/TAZ<sup>267,325</sup>. Lorsqu'elle est activée, RhoA interagit avec plusieurs effecteurs en aval, en particulier la kinase ROCK (Rho-associated coiled-coil kinase). Cette voie RhoA/ROCK, activée par les intégrines, augmente la tension cytosquelettique, favorisant l'ouverture mécanique des pores nucléaires via le complexe LINC, ce qui permet une translocation de YAP/TAZ indépendamment de LATS<sup>298</sup>. L'importance de RhoA est soulignée

par les expériences de perte de fonction : l'inhibition pharmacologique de RhoA (avec C3 transferase) ou de ROCK (avec Y-27632 ou fasudil) empêche l'entrée nucléaire de YAP/TAZ et réduit leur activité transcriptionnelle TEAD-dépendante, même en présence d'une matrice rigide. Ces effets sont mimés par la dépolymérisation des filaments d'actine F (via cytochalasine D, latrunculine B) ou l'inactivation des protéines de jonction comme l' $\alpha$ -caténine<sup>267,268,325</sup>.

De manière complémentaire, la phosphorylation de MLC2 (Myosin Light Chain 2), sur la thréonine 18 et la sérine 19, par les kinases ROCK ou MLCK favorise l'activation de la myosine II, moteur principal de la contraction des fibres d'actomyosine<sup>326</sup>. Cette activation est essentielle à la rétractation et de la génération de tension dans les fibres d'actomyosine. En parallèle, ROCK active la LIM kinase (LIMK), qui phosphoryle et inhibe cofiline, une protéine de dépolymérisation de l'actine, menant à la stabilisation des filaments d'actine F<sup>327</sup>. MYPT1 (Myosin Phosphatase Target Subunit 1), composante de la phosphatase MLCP, est également inhibée par ROCK, ce qui empêche la déphosphorylation de MLC2 et maintient la contractilité actomyosine<sup>328</sup>. Cette contractilité actomyosine génère une tension mécanique intracellulaire transmise au noyau et à la membrane basale via un réseau de filaments d'actine reliés aux adhésions focales. Ces dernières assurent, via des protéines mécano-sensibles (paxiline, FAK, etc.), une transmission verticale des forces entre la cellule et la matrice extracellulaire<sup>329,330</sup>. Autrement dit, cette tension mécanique intracellulaire, en particulier dans les cellules étalées sur une matrice rigide, est transmise via les adhésions focales (composées de FAK, taline, vinculine, paxilline) au noyau, en créant un état de tension cytosquelettique favorable à l'activation de YAP.

Plus important encore, cette tension est transférée jusqu'au noyau par le complexe LINC, composé de protéines SUN et nesprine, qui connectent les filaments d'actine au lamina nucléaire. Cette transmission mécanique entraîne une déformation de l'enveloppe nucléaire, modifiant la conformation des pores nucléaires et facilitant le transport actif de YAP/TAZ vers le noyau, même en l'absence d'inhibition de LATS<sup>295,298</sup>. La déformation du noyau, induite par des forces mécaniques, facilite l'importation nucléaire de YAP/TAZ en rendant leurs séquences NLS plus accessibles aux complexes importine- $\alpha/\beta$ . Ce processus repose sur un transport actif dépendant de Ran-GTP et est favorisé par une perméabilité accrue des pores nucléaires sous contrainte, ce qui accélère l'entrée nucléaire de YAP/TAZ<sup>295,298,331</sup>.

Ce mécanisme est crucial dans divers contextes physiologiques et pathologiques. Par exemple, dans les cellules souches mésenchymateuses, la rigidité du substrat module la

différenciation ostéogénique ou adipocytaire via l'activation de YAP/TAZ par RhoA-ROCK. De même, dans les fibroblastes tumoraux (CAFs) ou les cellules endothéliales, ce mécanisme renforce l'invasion, la migration ou l'angiogenèse tumorale<sup>267,325</sup>.

## **b. FACTEURS SOLUBLES**

YAP/TAZ sont aussi sensibles à de nombreux signaux extracellulaires, notamment des ligands de récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) et des facteurs de croissance (Figure 10). Les ligands comme LPA, S1P, angiotensine II, ou adrénaline activent des GPCRs qui, selon leur sous-type ( $G\alpha_{12/13}$ ,  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_s$ ), déclenchent des cascades opposées. Les GPCRs couplés à  $G\alpha_{12/13}$  ou  $G\alpha_q$  activent RhoA, renforçant la tension cytosquelettique et favorisant l'entrée nucléaire de YAP/TAZ. En revanche, les GPCRs couplés à  $G\alpha_s$  activent PKA, ce qui inhibe l'activité de RhoA et réprime YAP/TAZ<sup>332,333</sup>.

Les facteurs de croissance tels que l'Epithelial Growth Factor (EGF) et Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) peuvent aussi activer YAP/TAZ. Lorsqu'EGF se lie à EGFR, cela induit sa dimérisation et sa phosphorylation, déclenchant deux cascades de signalisation majeures : la voie PI3K-AKT-mTOR et la voie RAS-RAF-MEK-ERK. L'activation de la voie PI3K/AKT augmente l'activité métabolique et la survie cellulaire<sup>334</sup>. Plus spécifiquement, AKT phosphoryle des cibles qui modulent le cytosquelette, comme la girdin ou la cofiline, stabilisant les filaments d'actine<sup>334</sup>. AKT peut aussi phosphoryler des inhibiteurs de YAP, comme AMPK ou GSK3 $\beta$ , limitant leur activité et favorisant ainsi l'accumulation de YAP dans le noyau<sup>335</sup>. La voie MAPK/ERK, quant à elle, contribue à augmenter la transcription de YAP et d'autres coactivateurs transcriptionnels (comme FOS, MYC). Elle active également des protéines cytosquelettiques (myosine, filamine A) qui renforcent la rigidité interne et la mécano-transduction<sup>336</sup>. Enfin, cette voie réduit l'activité de LATS1/2 via des modifications de l'Angiomotin (AMOT), un inhibiteur de YAP, réduisant ainsi son ancrage au cytosquelette cortical<sup>337</sup>. Ces mécanismes permettent à YAP/TAZ de rester actifs dans le noyau, même en conditions de haute densité cellulaire, où normalement la voie canonique Hippo les inhiberait.

Le TGF- $\beta$  est un facteur de croissance pléiotrope jouant un rôle essentiel dans la différenciation cellulaire, la fibrose, et la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT). Contrairement à l'EGF, qui agit via des kinases cytoplasmiques, le TGF- $\beta$  signale via des récepteurs sérine/thréonine kinases (TGF- $\beta$ RI/II), activant les facteurs SMAD<sup>338</sup>. Lorsque le TGF- $\beta$  est actif, les SMAD2/3 sont phosphorylés et forment un complexe avec SMAD4, puis migrent dans le noyau. YAP/TAZ peuvent interagir directement avec les SMADs, formant un

super-complexe transcriptionnel sur les promoteurs de gènes cibles comme CTGF, SERPINE1, COL1A1 (collagène type 1), FN1 (Fibronectine), impliqués dans la fibrose et la migration cellulaire<sup>339,340</sup>. Cette interaction est fonctionnelle même si LATS1/2 sont actifs. De fait, YAP/TAZ peuvent coopérer avec les SMADs pour amplifier la réponse transcriptionnelle au TGF- $\beta$ . Ces observations contribuent à expliquer pourquoi la voie du TGF- $\beta$  est fortement fibrogénique et peut initier des programmes pathologiques comme l'EMT, en synergie avec YAP/TAZ. Enfin, des études ont montré que l'activation prolongée de YAP/TAZ par le TGF- $\beta$  favorisait l'EMT, stimulait la production de MEC (exacerbant la rigidité tissulaire) et renforçait l'activation de RhoA/ROCK. Cela aboutit à la création d'un cercle auto-amplificateur de mécano-activation<sup>341,342</sup>.

### c. LE STRESS CELLULAIRE

Les cellules adaptent aussi l'activité de YAP/TAZ face à des conditions de stress métabolique ou environnemental (Figure 10). Ces régulations sont essentielles pour la survie, la prolifération contrôlée ou l'activation de la mort cellulaire.

L'AMP-activated protein kinase (AMPK) est une kinase sérine/thréonine qui joue le rôle de régulateur métabolique intracellulaire. Elle est activée en réponse à une baisse du ratio ATP/AMP, typiquement dans des conditions de privation de nutriments, hypoglycémie ou exercice métabolique intense. Une fois activée, AMPK initie un vaste programme de conservation d'énergie et de suppression des processus consommateurs comme la synthèse protéique ou la prolifération<sup>343,344,345</sup>. Dans ce contexte, AMPK inhibe directement YAP par phosphorylation sur la sérine 94 (S94), un résidu situé dans le domaine de liaison à TEAD, partenaire transcriptionnel essentiel de YAP<sup>346</sup>. Cette phosphorylation empêche l'interaction YAP-TEAD, bloquant ainsi l'expression de gènes prolifératifs comme CYR61 ou CTGF, même si YAP reste présent dans le noyau. De plus, AMPK peut aussi inhiber les voies RhoA-ROCK en affectant le cytosquelette d'actine, ce qui réduit la tension mécanique et favorise l'export cytoplasmique de YAP/TAZ. Ainsi, AMPK agit à deux niveaux complémentaires : par modification post-traductionnelle directe de YAP, et par modulation mécanique indirecte via le cytosquelette. Cette double action garantit une inactivation rapide et adaptative de YAP/TAZ en conditions de stress énergétique — un mécanisme vital pour empêcher une prolifération mal contrôlée dans les tissus sous stress métabolique<sup>347</sup>. Parallèlement, la voie mTORC1, activée par des niveaux élevés d'acides aminés ou de glucose, peut favoriser indirectement l'activation transcriptionnelle de YAP/TAZ, notamment via le remodelage du cytosquelette et l'augmentation de la rigidité cellulaire. Le métabolisme des isoprénoïdes via la voie du

mévalonate est également déterminant pour l'activité de Rho-GTPases, qui sont elles-mêmes essentielles à la localisation nucléaire de YAP/TAZ en modulant la contractilité actomyosine<sup>348,349</sup>. Néanmoins, ces effets dépendent fortement du type cellulaire, du contexte mécanique, et ne reflètent pas toujours une régulation directe par les métabolites eux-mêmes, mais plutôt une signalisation intégrée complexe.

Le stress oxydatif, caractérisé par l'accumulation de ROS (Reactive Oxygen Species), ainsi que l'hypoxie (manque d'oxygène), sont fréquents dans des environnements tissulaires altérés comme les tumeurs, les tissus ischémiques ou en inflammation chronique. Ces conditions peuvent moduler YAP/TAZ de façons opposées selon le contexte cellulaire<sup>350,351,352</sup>. Dans certaines cellules, une forte concentration de ROS entraîne une déstabilisation du cytosquelette d'actine, ce qui désactive mécaniquement YAP/TAZ en réduisant la tension intracellulaire<sup>353,354,355</sup>. Les ROS peuvent également perturber les protéines d'ancrage comme AMOT ou favoriser l'activation de LATS, ce qui accentue la rétention cytoplasmique de YAP<sup>353</sup>. À l'inverse, dans un contexte tumoral ou fibrotique, une hypoxie modérée peut favoriser la coopération entre YAP/TAZ et le facteur HIF-1 $\alpha$ , principal activateur transcriptionnel des gènes d'adaptation hypoxique. Cette coopération active des cibles pro-survie et pro-angiogéniques comme VEGFA, GLUT1 ou ANGPTL4, facilitant la survie des cellules tumorales dans des environnements pauvres en oxygène<sup>356</sup>. Dans ce scénario, YAP n'agit pas comme coactivateur de TEAD, mais comme cofacteur transcriptionnel alternatif de HIF. Ce type de reprogrammation transcriptionnelle constitue une stratégie adaptative qui contourne la régulation canonique et favorise l'agressivité cellulaire<sup>357,358,359</sup>.

Lorsqu'une cellule subit un stress génotoxique, comme l'irradiation, une chimiothérapie ou une cassure double brin de l'ADN, elle active une série de voies de réponse au stress. L'une d'elles repose sur la kinase c-Abl, une tyrosine kinase nucléaire activée par les complexes de détection de l'ADN endommagé (ATM/ATR). La kinase c-Abl phosphoryle YAP sur la tyrosine 357 (Y357), un résidu situé dans sa région centrale. Cette phosphorylation modifie la conformation de YAP, réduisant son affinité pour TEAD et favorisant son interaction avec le facteur p73, un membre de la famille p53. Le complexe YAP-p73 migre alors dans le noyau et active un programme pro-apoptotique via la transcription de gènes tels que PUMA, BAX, NOXA et CDKN1A<sup>360,361,362</sup>. Ce mécanisme est indépendant de LATS1/2 et ne fait intervenir aucun des mécanismes classiques de la voie Hippo<sup>363,364</sup>. Il représente un exemple clair de la plasticité fonctionnelle de YAP, capable de changer de partenaire selon le contexte. Dans ce cas,

YAP n'est plus pro-prolifératif mais pro-apoptotique, ce qui montre qu'il joue un rôle bimodal selon les signaux environnementaux.

De surcroît, La tyrosine 357 (Y357) de YAP peut être phosphorylée par des kinases de la famille Src – et Src elle-même – dans des contextes oncogéniques tels que le cancer du sein (kinases YES1 et SRC), le glioblastome (kinases LCK et SRC) ou les cholangiocarcinomes (kinases LCK et SRC)<sup>365,366,367</sup>. Cette phosphorylation par la famille Src favorise l'activation transcriptionnelle de YAP/TEAD, stabilise YAP dans le noyau et favorise l'expression de gènes pro-survie et pro-migration (CTGF, CYR61, AXL), contribuant ainsi à la progression tumorale<sup>368,369</sup>. De manière assez évidente, une voie aussi centrale et crucial que la voie Hippo se retrouve très souvent dérégulée dans de nombreuses pathologies.

## B. Hippo et Cancers

### i. Implication dans la tumorigénèse et la résistance aux traitements

La dérégulation de la voie Hippo — en particulier l'activation aberrante de ses effecteurs YAP et TAZ — est une caractéristique fréquente dans divers cancers. Cette activation permet aux cellules tumorales d'échapper à la croissance contrôlée, de résister à l'apoptose, de promouvoir l'angiogenèse, et d'acquérir des propriétés migratoires et invasives. Dans le carcinome hépatocellulaire (CHC), une activation nucléaire de YAP/TAZ est souvent observée en l'absence de mutations dans les gènes codant MST1/2 ou LATS1/2. YAP y joue un rôle critique dans l'induction de la prolifération hépatocytaire, la suppression de l'apoptose et la régénération aberrante du tissu hépatique, agissant en coopération avec d'autres voies comme Notch, Wnt/ $\beta$ -caténine ou TGF- $\beta$ <sup>370,371,372</sup>.

Dans le cancer du pancréas, particulièrement le carcinome canalaire pancréatique (PDAC), YAP est requis pour l'oncogénèse induite par KRAS. Son activation favorise la dédifférenciation cellulaire, la reprogrammation métabolique, et la formation de métastases. De plus, YAP permet de contourner l'inhibition de KRAS, conférant une plasticité redoutable aux cellules tumorales<sup>371,373</sup>.

Dans le cancer du sein triple négatif, l'activité de TAZ est fortement associée à l'EMT, à l'agressivité tumorale et à la régénération clonogénique des cellules souches tumorales. TAZ est en particulier actif dans les cellules capables de reformer des tumeurs après chimiothérapie, ce qui en fait un facteur clé de récurrence<sup>374</sup>.

Dans le cancer du pancréas, YAP contribue à la résistance à la gemcitabine en renforçant les signaux de survie et en modulant la communication avec le stroma pancréatique. Dans les glioblastomes, YAP et TAZ sont responsables de l'échec de la thérapie anti-angiogénique en maintenant une vascularisation alternative via l'induction de VEGFA et ANGPTL4<sup>371</sup>.

Dans les cellules tumorales, l'axe YAP/TAZ est fréquemment hyperactivé, ce qui contribue à la reprogrammation métabolique favorisant la prolifération, la survie cellulaire et la résistance aux traitements. YAP/TAZ peuvent renforcer l'activité de programmes métaboliques pro-tumoraux, notamment la glycolyse aérobie (effet Warburg), la biosynthèse des acides gras et l'absorption accrue de glutamine, comme observé dans des cancers du foie, du sein ou du poumon<sup>284,375</sup>. Cette activation métabolique s'accompagne souvent d'une transcription accrue de gènes tels que GLUT1, HK2, ou SLC1A5, qui soutiennent les besoins énergétiques et biosynthétiques des cellules cancéreuses. En parallèle, YAP/TAZ ont été associés à l'induction de gènes de résistance aux traitements, comme ABCG2, ou de facteurs anti-apoptotiques (BCL2, BIRC5, MCL1, etc.), ce qui suggère leur rôle dans l'acquisition de phénotypes thérapeutiquement réfractaires<sup>284,376</sup>. Toutefois, ces effets ne sont pas systématiques et varient selon le type tumoral, son stade de progression et le contexte génétique ou épigénétique associé.

## ii. Rôles dans le microenvironnement tumoral

Au-delà de leur fonction intrinsèque dans les cellules tumorales, YAP et TAZ jouent un rôle fondamental dans la structuration, la signalisation et la plasticité du microenvironnement tumoral (TME). Leur activation dans différentes populations non cancéreuses du TME contribue à façonner un environnement favorable à la progression tumorale, à l'angiogenèse, à la fibrose et à l'immunosuppression<sup>377,378,379,380</sup>.

De précédentes études ont mis en évidence l'activation de YAP/TAZ en réponse à la rigidité de la matrice extracellulaire dans les fibroblastes associés aux cancers (CAFs)<sup>381</sup>. Ils y induisent la transcription de gènes codant pour des composants matriciels tels que le collagène de type I, la fibronectine, la tenascine-C ou encore des facteurs pro-fibrotiques comme le TGF- $\beta$ 1<sup>377,382</sup>. Cela forme une boucle de rétroactivation mécanique où YAP/TAZ renforcent le dépôt matriciel, augmentant encore la rigidité et perpétuant leur propre activation.

YAP/TAZ sont également impliqués dans la modulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Dans des macrophages associés aux tumeurs (TAMs), YAP favorise une polarisation de type M2, pro-tumorale, et régule l'expression de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10, le TGF- $\beta$  ou CSF1, qui inhibent la phagocytose et recrutent d'autres cellules

suppressives<sup>383,384</sup>. YAP/TAZ dans les cellules tumorales peuvent également stimuler la sécrétion de chimiokines telles que CXCL5, qui recrutent des cellules myéloïdes suppressives (MDSC), contribuant à l'échec des immunothérapies anti-PD1/PDL1<sup>385,386</sup>.

Cette capacité de YAP/TAZ à moduler les réponses immunitaires ne se limite pas aux cellules myéloïdes ou tumorales, mais s'étend également aux cellules stromales et lymphoïdes, illustrant leur rôle profondément contextuel dans l'immunomodulation. Dans les cellules réticulaires fibroblastiques (FRCs) des ganglions lymphatiques, YAP/TAZ sont essentiels à l'engagement des progéniteurs mésenchymateux dans la lignée FRC, comme l'ont démontré Choi et al. dans leurs travaux. Leur activation transitoire favorise l'expression de chimiokines nécessaires à la structuration des zones B/T et au recrutement lymphocytaire. Toutefois, une activation prolongée ou excessive de YAP/TAZ empêche la maturation fonctionnelle des FRCs, induit un phénotype myofibroblastique pathologique, perturbe l'architecture ganglionnaire et altère la réponse immunitaire adaptative<sup>387</sup>. À l'inverse, dans les lymphocytes T CD4+ et CD8+, les travaux de Stampoulouglou et al. ont mis en évidence une fonction opposée de YAP, cette fois comme frein à l'activation et à la différenciation effectrice. La délétion spécifique de YAP dans les cellules T augmente leur activation, favorise leur différenciation en sous-populations Th1, Th2, Th17 et Treg, et améliore leur infiltration et leur fonction antitumorale dans des modèles murins de cancer<sup>388</sup>. Ces observations soulignent que YAP/TAZ peuvent tour à tour soutenir ou freiner la réponse immunitaire, selon le type cellulaire et le contexte microenvironnemental, et appellent à une approche prudente dans leur ciblage thérapeutique.

L'activité de YAP/TAZ est également cruciale dans les cellules endothéliales, où elle contrôle l'angiogenèse tumorale. En réponse à la rigidité de la matrice extracellulaire, au stress de cisaillement ou à des facteurs de croissance (comme VEGF et FGF), des études ont mis en évidence le rôle de YAP/TAZ dans l'angiogenèse tumorale. Ils induisent l'expression de VEGFA, de MMPs et de ANGPTL4, qui favorisent la formation de néovaisseaux instables mais fonctionnels dans la tumeur<sup>389,390</sup>. Ce rôle de YAP dans l'angiogenèse est renforcé par sa coopération avec HIF-1 $\alpha$  en hypoxie, un contexte fréquent dans les tumeurs solides, renforçant ainsi la perméabilité vasculaire et l'oxygénation tumorale — éléments clés de la croissance et de la dissémination métastatique.

Dans de nombreux cancers solides, il est désormais bien établi que les cellules tumorales exploitent la voie Hippo en modulant l'expression ou l'activité de ses effecteurs YAP et TAZ, contribuant ainsi de manière décisive à la tumorigenèse, à la progression de la maladie et à la résistance aux traitements. Cette dérégulation ne se limite toutefois pas aux cellules cancéreuses

elles-mêmes : des travaux récents montrent que YAP/TAZ sont également activés dans diverses cellules du microenvironnement tumoral, notamment les CAFs, TAMs et les cellules endothéliales, où ils orchestrent des fonctions pro-tumorales telles que l'angiogenèse, la fibrose et l'immunosuppression. De manière intuitive, l'étude de la voie Hippo semble particulièrement adaptée aux tumeurs solides, dont l'architecture histologique dense, les contraintes mécaniques et les hétérogénéités tissulaires permettent d'explorer les multiples dimensions de la mécano-transduction et des interactions cellule-matrice. Cependant, cette complexité, en particulier la dimension biophysique du signal, rend parfois l'analyse fonctionnelle de la voie difficile à dissocier des autres facteurs contextuels. Cette observation invite à élargir notre regard vers d'autres entités pathologiques où le remodelage du microenvironnement joue également un rôle central, sans pour autant s'inscrire dans une organisation tissulaire rigide.

Lorsque l'on regarde dans la littérature récente, plusieurs études ont également mis en évidence le rôle de la voie Hippo (et de YAP/TAZ) dans des pathologies cancéreuses liquide. Dans le myélome multiple, une maladie caractérisée par l'infiltration de plasmocytes tumoraux dans la moelle osseuse, l'implication de TAZ dans les cellules stromales médullaires a été décrite. Ces cellules répondent aux signaux tumoraux en activant TAZ, ce qui favorise l'expression de gènes pro-survie et de remodelage matriciel (notamment MMP9, IL-6, TGF- $\beta$ ), créant une niche protectrice pour les cellules myélomateuses<sup>391</sup>. Dans la leucémie aiguë lymphoblastique T (T-ALL), une activation aberrante de YAP/TAZ, dans les cellules tumorales, a été détectée dans près de 50 % des cas, où elle soutient la prolifération des cellules leucémiques et interfère avec l'induction de l'apoptose<sup>392</sup>. Dans la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC), bien que les cellules B leucémiques présentent une faible expression de YAP, la voie Hippo semble active dans les cellules du TME telles que les macrophages et les cellules stromales. Ces cellules, activées par les signaux issus des cellules tumorales, expriment des cibles transcriptionnelles de YAP comme CTGF, CXCL5, et IL-6, qui créent un microenvironnement protecteur et immunosuppresseur. YAP/TAZ peuvent ainsi moduler la production de cytokines et de chimiokines dans ces cellules non tumorales, favorisant la survie et la prolifération leucémique<sup>393</sup>.

Enfin, sur le plan métabolique, l'activation de YAP/TAZ dans les cellules du microenvironnement tumoral participe à la structuration d'un écosystème bioénergétique favorable à la progression néoplasique. Dans les fibroblastes associés aux cancers (CAFs), par exemple, YAP/TAZ favorisent une reprogrammation glycolytique via l'induction de transporteurs de glucose (GLUT1), d'enzymes comme PFKFB3 ou PKM2, et de voies

biosynthétiques telles que le cycle des pentoses phosphates, soutenant ainsi les besoins énergétiques et anaboliques de ces cellules<sup>394,395</sup>. Ces CAFs hautement métaboliques relarguent également du lactate et des acides gras libres, qui peuvent être captés et métabolisés par les cellules tumorales environnantes dans une dynamique de couplage métabolique intercellulaire. De manière parallèle, l'activation de YAP/TAZ dans les cellules endothéliales stimule la glycolyse au détriment de la phosphorylation oxydative, un profil métabolique classiquement associé à l'angiogenèse pathologique et à la formation de néovaisseaux immatures mais perfusant<sup>389</sup>. Dans les cellules immunitaires infiltrant le TME, comme les macrophages ou les cellules myéloïdes suppressives, YAP/TAZ semblent promouvoir une orientation métabolique basée sur l'oxydation des acides gras et la tolérance au stress métabolique, contribuant à l'acquisition d'un phénotype immunosuppresseur<sup>284,396</sup>. Ensemble, ces observations suggèrent que YAP/TAZ agissent comme des intégrateurs de signaux mécaniques et métaboliques dans le TME, en adaptant les programmes bioénergétiques des cellules stromales et immunitaires afin de renforcer les conditions permissives à la croissance tumorale et à l'évasion immunitaire.

Après avoir exploré les fondements du microenvironnement tumoral et des dynamiques métaboliques et mécaniques associées, nous allons à présent illustrer la convergence de ces processus au sein d'un modèle pathologique concret. Le chapitre suivant s'intéressera à une pathologie fortement dépendante de son microenvironnement, et brièvement évoquée précédemment, la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC).

## V. La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

### A. Présentation générale

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne caractérisée par l'accumulation clonale de lymphocytes B matures, morphologiquement petits, dans le sang périphérique, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate. Elle se développe à partir de cellules B ayant traversé partiellement ou totalement le centre germinatif. Le centre germinatif est le site au sein d'un ganglion lymphatique où les lymphocytes B, exposés aux antigènes, subissent une maturation d'affinité, développant ainsi leur capacité à produire des anticorps de haute affinité. Dans la LLC, la traversée du centre germinatif se fait avec ou sans mutations somatiques des gènes des immunoglobulines (IGHV), influençant fortement le pronostic<sup>397,398</sup>. L'importance du statut « Muté » ou « Non Muté » des IGHV sera discuté par la suite.

Sur le plan immunophénotypique, les cellules B leucémiques de la LLC expriment de manière caractéristique les antigènes CD5, CD19, CD23, ainsi qu'une faible densité de CD20 et d'immunoglobulines de surface (IgM/IgD). Le CD5, habituellement exprimé par les lymphocytes T, est présent de façon aberrante sur les cellules B de LLC, constituant un marqueur diagnostique fondamental<sup>399</sup>. Le CD23, un récepteur de faible affinité pour les IgE, est utile pour distinguer la LLC d'autres néoplasies lymphoïdes B, comme le lymphome du manteau<sup>400</sup>. Le CD19, exprimé tout au long du développement des cellules B jusqu'au stade plasmatique, joue un rôle essentiel dans la co-stimulation du récepteur B (BCR) et sert de marqueur pan-B indispensable à la détection des lymphocytes B circulants. Quant au CD20, molécule transmembranaire impliquée dans la régulation de l'activation, de la prolifération et du signal calcique intracellulaire, il constitue également une cible thérapeutique majeure dans les traitements à base d'anticorps monoclonaux (e.g. rituximab), bien que son expression soit souvent faible ou hétérogène dans la LLC<sup>401,402</sup>.

Sur le plan épidémiologique, la LLC est la forme de leucémie la plus fréquente chez l'adulte dans les pays occidentaux, avec une incidence estimée entre 4 et 5 cas pour 100 000 personnes par an. Elle affecte principalement les sujets âgés, avec une médiane d'âge au diagnostic autour de 70 ans, et présente une nette prédominance masculine (ratio H/F  $\approx$  2:1)<sup>403</sup>. Toutefois, cette incidence varie significativement selon les origines ethniques : la LLC est nettement moins fréquente dans les populations d'Asie de l'Est (notamment Chine et Japon) et chez les populations afro-caribéennes, suggérant une composante génétique ou environnementale protectrice encore mal comprise<sup>398</sup>. Dans la majorité des cas, la LLC est précédée par une phase infraclinique appelée lymphocytose B monoclonale (MBL). Cette condition, détectée chez 3 à 12 % des adultes de plus de 40 ans, est définie par la présence de cellules B clonales CD5+ dans le sang périphérique sans signe d'atteinte des organes lymphoïdes. Bien que bénigne dans la majorité des cas, environ 1 à 2 % des MBL évoluent vers une LLC manifeste chaque année, ce qui en fait un précurseur établi de la maladie<sup>404,405</sup>. Dans un nombre limité de cas, la leucémie lymphoïde chronique peut évoluer vers une forme plus agressive de lymphome, le plus souvent un lymphome diffus à grandes cellules B, dans un processus appelé syndrome de Richter<sup>406</sup>. Cette transformation concerne environ 2 à 10 % des patients au cours de leur parcours, et elle reflète une évolution biologique particulière de la maladie, souvent associée à des altérations moléculaires comme des mutations de TP53 ou l'activation de la voie NOTCH1<sup>407,408</sup>.

Par ailleurs, la LLC est une pathologie remarquablement hétérogène, tant sur le plan clinique que biologique. On distingue deux formes évolutives, caractérisées par le statut mutationnel des gènes *IGHV*, *CD38* et *ZAP-70*. Le gène *IGHV* (Immunoglobulin Heavy-Chain Variable Region) encode la région variable des chaînes lourdes des immunoglobulines, qui joue un rôle clé dans la reconnaissance des antigènes par les cellules B. Dans des conditions physiologiques, la sélection des gènes *IGHV* reflète le processus de maturation des cellules B au sein des centres germinatifs, où les réarrangements génétiques aboutissent à une grande diversité de BCR, optimisés pour reconnaître des antigènes spécifiques. Dans la LLC, le statut mutationnel du gène *IGHV* permet d'évaluer le degré de maturation des cellules B au moment de leur transformation leucémique. Fait notable, la sélection des gènes *IGHV* dans la LLC ne semble ne pas être aléatoire : certaines séquences, telles que *IGHV1-69* ou *IGHV3-21*, sont fréquemment utilisées, suggérant une pression antigénique partagée entre différents patients. Ce phénomène est particulièrement bien illustré par l'existence de BCR dits « stéréotypés », c'est-à-dire des BCR présentant des séquences quasi identiques chez des individus non apparentés. Cela témoigne d'une reconnaissance antigénique convergente, probablement liée à des antigènes communs ayant contribué à la sélection clonale initiale<sup>409,410</sup>. Le *CD38* est une protéine de surface intervenant dans le métabolisme du  $\text{NAD}^+$  et la signalisation calcique, favorisant la prolifération et la survie cellulaire. La tyrosine kinase *ZAP-70* (Zeta-associated protein 70), dont l'expression est aberrante dans les cellules B de LLC, amplifie la signalisation du BCR, simulant une forte stimulation antigénique.

Les formes indolentes, souvent diagnostiquées fortuitement, évoluent lentement, parfois sur plusieurs décennies, sans nécessiter de traitement immédiat. Ces formes sont souvent associées à des gènes *IGHV* mutés, une faible expression de *CD38* et *ZAP-70*, et une absence d'anomalies cytogénétiques défavorables. Les patients présentent peu de symptômes et une faible prolifération des cellules B, qui semblent accumuler principalement via une résistance à l'apoptose plutôt qu'une activité mitotique intense<sup>411,412</sup>.

Les formes progressives se caractérisent quant à elle par une lymphocytose croissante, adénopathies, hépatosplénomégalie, anémie ou thrombopénie, et parfois des complications auto-immunes. Ces formes sont souvent associées à des *IGHV* non mutés, une expression élevée de *ZAP-70* qui reflète ici une plus grande réactivité antigénique des cellules B<sup>413</sup>. Le *CD38*, dont l'expression est élevée dans les formes progressives, est également associé à une prolifération accrue et à une survie plus courte<sup>414</sup>.

Enfin, les progrès dans la compréhension de la biologie de la LLC ont permis de définir des sous-groupes de patients selon leur sensibilité aux traitements. Plusieurs travaux issus de notre laboratoire ont abouti à une nouvelle méthode de classification des patients, dits “répondeurs” (responders) versus “non-répondeurs” (non-responders), sur la base de leur sensibilité *ex vivo* à des stimuli antigéniques ou à des traitements ciblant la signalisation BCR<sup>415,416</sup>. Cette approche a permis de corrélérer la réponse fonctionnelle à l'activité clonale et à la capacité de remodelage du microenvironnement tumoral, suggérant des mécanismes de résistance intrinsèques.

## B. Caractéristiques des cellules B de LLC

Les cellules B de LLC sont le siège de profondes altérations de signalisation intracellulaire, conférant à ces cellules un avantage sélectif en termes de survie, de résistance à l'apoptose et d'adaptation à leur microenvironnement. Ces anomalies impliquent un large éventail d'effecteurs moléculaires, faisant de l'étude des voies de signalisation dérégulées un champ de recherche particulièrement riche et complexe. Pour pallier la disponibilité limitée et l'hétérogénéité marquée des cellules primaires issues de patients atteints de LLC, plusieurs lignées cellulaires ont été développées et sont largement utilisées dans les études *in vitro*. Ces modèles cellulaires, comme la lignée MEC-1 ou HG-3, permettent de reproduire certaines caractéristiques phénotypiques et moléculaires de la LLC tout en offrant une reproductibilité et une standardisation essentielles pour l'analyse mécanistique des voies de signalisation dérégulées<sup>417,418</sup>.

Si l'interaction avec le microenvironnement non tumoral représente un aspect central et particulièrement fascinant de la physiopathologie de la LLC, il apparaît néanmoins essentiel de contextualiser la dérégulation des voies de signalisation au sein des cellules B elles-mêmes. Parmi celles-ci, les voies BCR, PI3K/AKT/mTOR et Wnt/ $\beta$ -caténine ainsi que les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et NFAT occupent une place prépondérante dans la dérégulation biologique caractéristique de cette hémopathie.

### i. La voie du récepteur des cellules B (BCR)

Le récepteur des cellules B (BCR) est un complexe multimoléculaire présent à la surface des lymphocytes B et constitue un pivot de la physiopathologie de la LLC. Il est composé d'une immunoglobuline de surface qui reconnaît l'antigène, associée à deux chaînes transductrices, CD79A et CD79B. Son activation joue un rôle fondamental dans le maintien de la survie et la prolifération des cellules B dans la LLC. Un co-récepteur essentiel dans cette signalisation est

le CD19, une glycoprotéine transmembranaire qui forme un complexe avec le CD21 et le CD81<sup>419,420</sup>. CD19 agit comme amplificateur du signal du BCR, en facilitant le recrutement de la PI3K via des résidus tyrosines phosphorylés dans son domaine intracellulaire. Cette interaction accroît la production de PIP3, renforçant ainsi l'activation d'AKT et d'autres effecteurs en aval. En plus de potentialiser la voie PI3K/AKT, CD19 permet une activation plus efficace de BTK et PLC $\gamma$ 2, augmentant la sensibilité des cellules B à l'antigène<sup>421,422</sup>.

Lorsqu'un antigène (ou une stimulation mimétique) engage le BCR, cela active LYN, une tyrosine kinase de la famille Src, qui initie la cascade de signalisation. Cette activation conduit à la phosphorylation de SYK (Spleen Tyrosine Kinase), qui amplifie le signal intracellulaire. SYK active ensuite plusieurs voies :

- BTK (Bruton's Tyrosine Kinase), essentielle à la transmission du signal BCR,
- PLC $\gamma$ 2 (phospholipase C gamma 2), qui génère des seconds messagers (DAG et IP3) activant la voie calcique et NFAT,
- Ainsi que les voies MAPK (ERK1/2) et PI3K/AKT, qui régulent respectivement la prolifération et la survie cellulaire.

Au cours du développement normal des lymphocytes B, chaque cellule génère un BCR unique par recombinaison somatique des segments génétiques V(D)J des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGHV). Après cette étape, certains lymphocytes B rencontrent leur antigène dans un centre germinatif, où ils subissent des mutations somatiques ciblées dans le gène IGHV afin d'améliorer l'affinité de leur BCR — un processus appelé hypermutation somatique<sup>423,424</sup>. Ainsi dans la LLC, on distingue les Patients M-CLL (IGHV muté) et U-CLL (IGHV non muté). Les patients M-CLL (IGHV muté), présentent des cellules leucémiques dérivant de lymphocytes B ayant rencontré un antigène et subi une maturation dans le centre germinatif. Les patients U-CLL (IGHV non muté), présentent quant à eux des cellules qui n'ont pas subi ce processus, reflétant une activation antigène-indépendante ou extra-germinative. Les cellules dites U-CLL (non mutées) présentent une activation plus soutenue du BCR, même en l'absence d'antigène. Cette signalisation "tonique" entraîne une stimulation continue des voies de survie cellulaire comme celles impliquant BTK ou PI3K $\delta$ , ce qui favorise la prolifération et la persistance des cellules leucémiques. C'est en grande partie ce qui explique leur phénotype plus agressif comparé aux cellules M-CLL (mutées), qui ont généralement traversé un centre germinatif et montrent une signalisation BCR plus régulée<sup>423,425,426</sup>. Cette différence a des implications thérapeutiques directes : les cellules U-CLL, fortement dépendantes de la

signalisation BCR, sont souvent plus sensibles aux inhibiteurs ciblant BTK (comme l'ibrutinib) ou PI3K $\delta$  (comme l'idelalisib), qui perturbent ces signaux de survie. En revanche, les M-CLL, moins activées via le BCR, peuvent présenter une réponse plus modérée à ces inhibiteurs<sup>427,428,428</sup>.

## ii. La voie PI3K-Akt-mTOR

La voie PI3K/AKT/mTOR est activée en aval du BCR, mais aussi par d'autres récepteurs comme CD40, BAFF-R ou les intégrines. La PI3K (phosphoinositide 3-kinase), en particulier son isoforme PI3K $\delta$ , convertit le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en PIP3, un second messager lipidique. PIP3 recrute PDK1 (phosphoinositide-dépendent kinase-1) et AKT (aussi appelée PKB pour Protéine Kinase B) à la membrane plasmique. Une fois phosphorylé, AKT devient actif et inhibe plusieurs effecteurs pro-apoptotiques comme BAD (Bcl-2-associated death promoter), FOXO1 (Facteur de transcription pro-apoptotique) et GSK3 $\beta$  (une kinase qui régule la transcription, le cycle cellulaire, le métabolisme ou encore la voie Wnt). AKT active également mTORC1, un complexe kinase central dans la régulation de la croissance, de la biosynthèse protéique (via S6K1 et 4EBP1) et de l'autophagie<sup>430,431,432</sup>. Dans les cellules B de LLC, cette voie est systématiquement suractivée, contribuant à leur survie prolongée<sup>426,433</sup>.

## iii. Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et NFAT

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est un régulateur essentiel des gènes impliqués dans l'inflammation, la survie et la prolifération. Dans sa forme inactive, NF- $\kappa$ B est retenu dans le cytoplasme par l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ . L'activation de la voie canonique (via IKK $\beta$ /NEMO) conduit à la phosphorylation et à la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ , libérant NF- $\kappa$ B (souvent le dimère p50/RelA) qui migre dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles. Dans les lymphocytes B de LLC, cette voie est activée de manière constitutive par la signalisation BCR, le CD40L (exprimé par les cellules T), le Toll-Like Receptor 9 (TLR9) et les interactions avec le microenvironnement (intégrines VLA-4, chemokines, etc.)<sup>434,435</sup>. De plus, l'activation chronique de NF- $\kappa$ B régule l'expression de gènes tels que BCL2, MCL1, IL6 et TNFA, renforçant la survie et l'inflammation locale<sup>436</sup>.

En parallèle de NF- $\kappa$ B, le facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) constitue un autre pivot transcriptionnel activé en aval de la signalisation BCR dans les cellules B de la LLC. Plus spécifiquement, la voie calcium–calcineurine déclenche la

déphosphorylation de NFAT2, facilitant sa translocation nucléaire. Dans les cellules B-LLC, NFAT2 est surexprimé de manière constitutive et localisé partiellement dans le noyau, même sans stimulation antigénique, suggérant un état pré-activé de la voie<sup>437</sup>. Cependant, seule la stimulation par l'IgM induit une augmentation marquée de l'activité transcriptionnelle de NFAT2 dans les cellules dites "répondeuses", en lien avec une survie cellulaire accrue et un pronostic clinique défavorable. L'inhibition pharmacologique sélective de NFAT via le peptide VIVIT bloque cette activation, supprime la transcription de cibles telles que CD23, et annule l'avantage de survie induit par le BCR, simulant ainsi un phénotype "non-répondeur"<sup>437</sup>. Ces résultats démontrent l'implication fonctionnelle de NFAT2 dans la persistance des cellules B-LLC et désignent l'axe BCR–NFAT comme une cible thérapeutique prometteuse.

#### iv. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine

La voie Wnt constitue un réseau signalétique clé impliqué dans la régulation de la prolifération, la survie, la migration et l'adhésion cellulaire. Dans la LLC, cette voie est activée par des ligands Wnt présents dans le microenvironnement, mais aussi produits de manière autocrine par les cellules B leucémiques elles-mêmes<sup>438,439,440</sup>.

Il existe deux grandes modalités de transduction du signal Wnt : la voie canonique, dépendante de la  $\beta$ -caténine, et la voie non-canonique, indépendante de celle-ci. Dans la voie canonique, des ligands tels que Wnt3A se lient aux récepteurs Frizzled et aux co-récepteurs LRP5/6, ce qui inhibe le complexe de dégradation (formé par GSK3 $\beta$ , CK1, Axin et APC) responsable de la phosphorylation et de la dégradation de  $\beta$ -caténine<sup>441,442</sup>. L'inhibition du complexe de dégradation permet l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme, sa translocation vers le noyau, puis l'activation transcriptionnelle de gènes cibles via des partenaires tels que TCF/LEF, NF- $\kappa$ B, FOXO ou SOX. La  $\beta$ -caténine transloquée dans le noyau régule des gènes impliqués dans la migration (CXCR4), la prolifération (MYC) et la résistance au stress. Ce type de signalisation est particulièrement actif dans la niche ganglionnaire ou médullaire<sup>438,439</sup>.

Cependant, les travaux sur la LLC ont mis l'accent sur la signalisation non canonique de Wnt, qui semble jouer un rôle plus central que la voie canonique dans la régulation des propriétés invasives et migratoires des cellules leucémiques. En particulier, les travaux de Yu et al. (2016) ont mis en évidence un mécanisme crucial dans lequel le ligand Wnt5a induit l'oligomérisation des récepteurs orphelins ROR1 et ROR2, formant un complexe ROR1/ROR2. Ce complexe recrute des facteurs d'échange de guanine (GEFs), activant les GTPases RhoA et

Rac1, qui orchestrent la migration directionnelle et la prolifération des cellules leucémiques. Ce processus peut être bloqué par UC-961 (cirmtuzumab), un anticorps anti-ROR1, démontrant l'importance fonctionnelle de cette voie dans la pathogénie de la LLC<sup>443</sup>. De plus, les travaux de Kaucka et al. (2013) ont révélé que la signalisation PCP (Planar Cell Polarity), une branche non canonique du réseau Wnt, est également activée dans la LLC. Ils ont montré une surexpression des composants clés de cette voie tels que Vangl2, Prickle1, FZD3, FZD7, Celsr1 et les protéines Disheveled (Dvl2/3) dans les cellules B leucémiques. Leur activation favorise la migration directionnelle, l'invasion transendothéliale et la colonisation des niches ganglionnaires. Les inhibiteurs de cette voie, notamment contre CK1 $\epsilon$  ou Rho/ROCK, altèrent significativement ces capacités migratoires. Ces observations soutiennent un rôle fonctionnel du programme PCP dans l'interaction pathogène entre les cellules de LLC et leur microenvironnement<sup>444</sup>.

Très importante pour la voie Wnt canonique, la  $\beta$ -caténine est une protéine multifonctionnelle dont le rôle est central dans deux processus cellulaires majeurs : l'adhésion cellulaire et la régulation transcriptionnelle. Dans le cadre de l'adhésion, la  $\beta$ -caténine joue un rôle structural essentiel en s'associant au domaine cytoplasmique des cadhérines, des molécules d'adhésion calcium-dépendantes présentes à la surface des cellules. En se liant aux cadhérines, la  $\beta$ -caténine permet l'ancrage de ces dernières au cytosquelette d'actine via la  $\alpha$ -caténine, stabilisant ainsi les jonctions adhérentes et maintenant l'intégrité des tissus. Cette fonction adhésive contraste avec son rôle dans la signalisation Wnt, où, en l'absence de dégradation, la  $\beta$ -caténine cytosolique s'accumule et transloque dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles. De manière intéressante, de récents travaux issus de notre laboratoire ont mis en évidence un rôle bifonctionnel de la  $\beta$ -caténine selon sa localisation cellulaire dans les cellules de LLC. En présence du complexe de dégradation, la  $\beta$ -caténine est rapidement polyubiquitinylée, après phosphorylation sur ses résidus S33, S37, T41 et S45, et dégradée par le protéasome. À l'aide du mutant S45A de la  $\beta$ -caténine (non phosphorylable et s'accumulant dans le cytoplasme), les travaux de Mihoub et al. ont permis de mettre en évidence un différentiel de localisation de la  $\beta$ -caténine dans les cellules B en fonction de leur adhésion à des cellules du microenvironnement. Ces travaux mettent également en lumière l'implication de signaux solubles tels que CXCL12 dans l'activation de gène de survie (cyclin D1) et l'implication de jonctions cellulaires via les intégrines essentiels pour l'adhésion cellulaire<sup>445</sup>. La figure 11 schématise le rôle de la  $\beta$ -caténine dans la survie des cellules B-LLC et met en

lumière au travers de cet exemple de signalisation le caractère dynamique du dialogue entre microenvironnement et cellules leucémiques dans la LLC<sup>446</sup>.

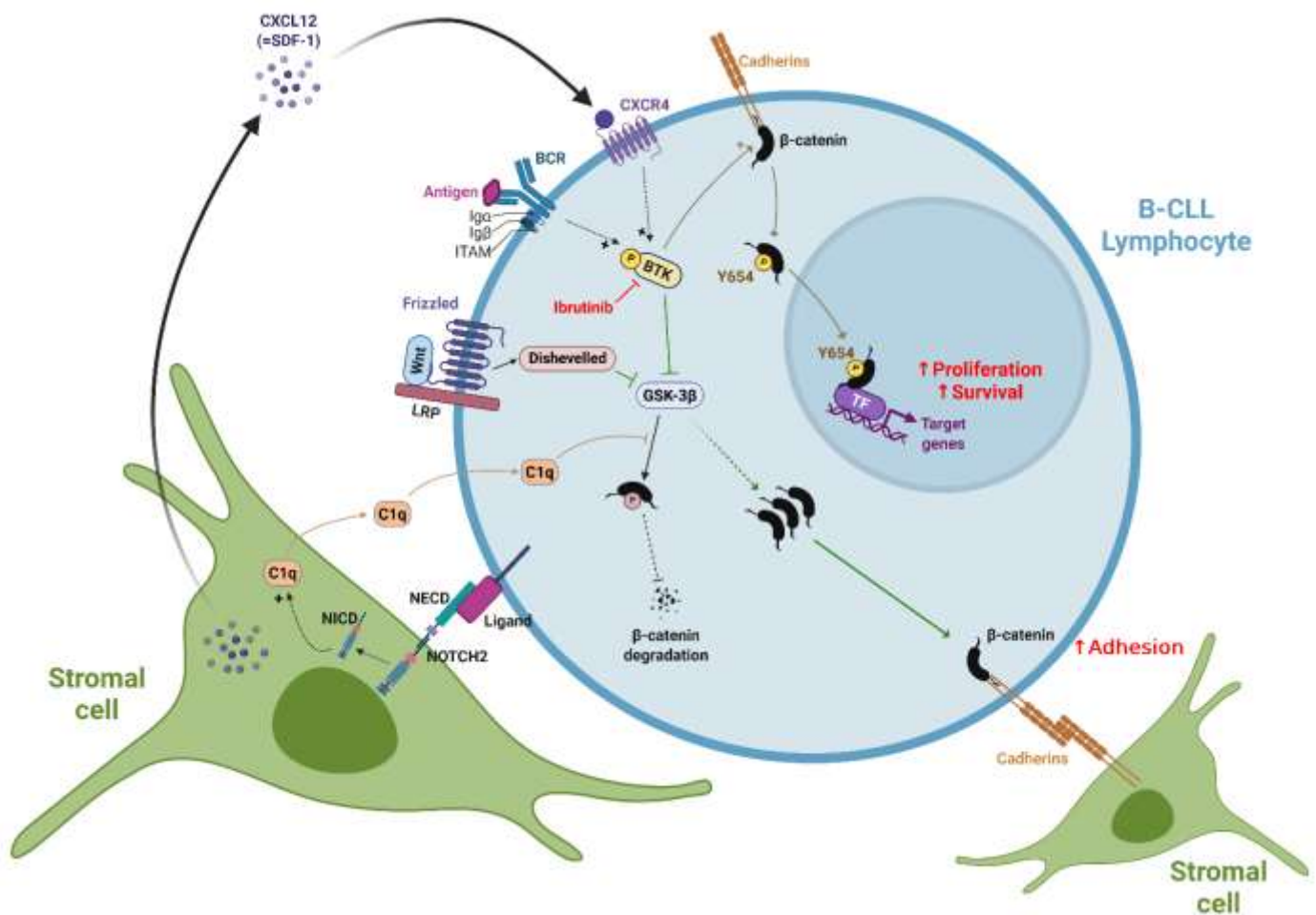


Figure 11 : **Représentation schématique du rôle de la  $\beta$ -caténine dans la survie des cellules B-LLC.** L'inhibition de la protéine GSK-3 $\beta$  dans les cellules B-LLC par divers stimuli du microenvironnement empêche la phosphorylation et la dégradation de la  $\beta$ -caténine et conduit à son accumulation (flèches vertes). La  $\beta$ -caténine est recrutée à la membrane et stabilise des structures d'adhésions dépendantes des cadhérines. En parallèle, BTK peut phosphoryler la  $\beta$ -caténine sur la Tyrosine 654 (Y654), favorisant son importation nucléaire et son activité transcriptionnelle sur des gènes cibles impliqués dans la prolifération et la survie des cellules B-LLC. L'activation du BCR et la liaison CXCL12/CXCR4 participent à la stabilisation de la  $\beta$ -caténine. Par ailleurs, le facteur C1q produit à la suite de la signalisation stromales Notch2 contribue également à la stabilisation de la  $\beta$ -caténine et à son activité transcriptionnelle. Figure réalisée avec BioRender.com.

Ainsi, au travers de ces différentes voies de signalisation, il apparaît de plus en plus clairement que la pathophysiologie de la LLC repose sur des altérations intrinsèques des cellules B leucémiques, mais aussi sur un dialogue étroit et dynamique avec son microenvironnement.

### C. Le microenvironnement tumoral de la LLC

À l'interface entre support et signalisation, le microenvironnement constitue un réseau complexe d'interactions et il offre non seulement un refuge protecteur aux cellules malignes, mais influence également leur comportement biologique. La figure 12 représente une vue d'ensemble des différents acteurs du microenvironnement LLC et leurs impacts sur les cellules leucémiques. Dans les sections suivantes, nous allons explorer en détail la composition de ce microenvironnement, ses compartiments anatomiques distincts, ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués dans ce dialogue tumoral-stromal essentiel à la physiopathologie de la LLC.

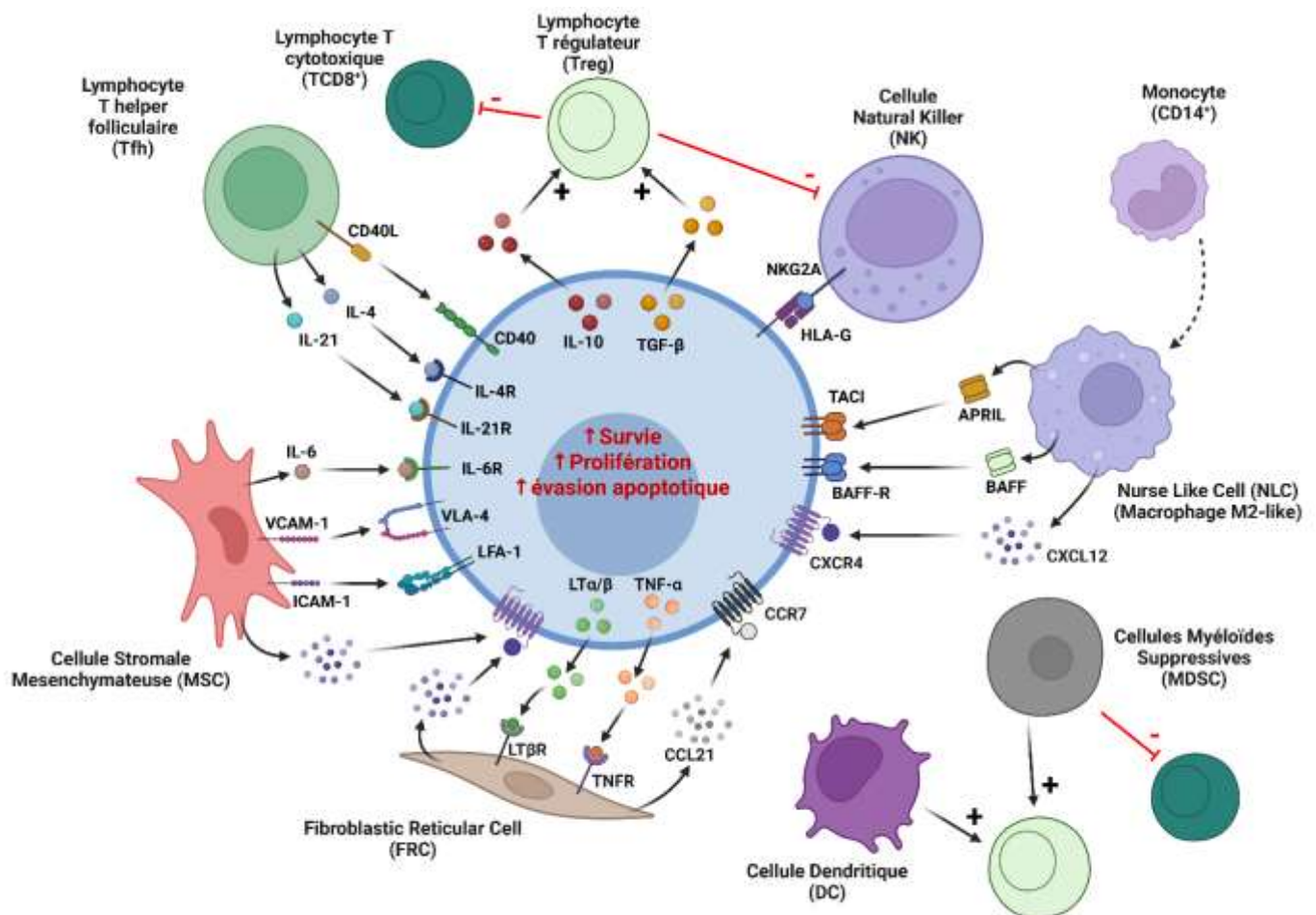


Figure 12 : Vue d'ensemble du microenvironnement LLC et rôle des acteurs cellulaires sur les cellules B leucémiques. La composante cellulaire du microenvironnement LLC comprend différents types cellulaires : Lymphocytes T (Tfh, TCD8<sup>+</sup>, Treg), Natural Killer (NK), Monocytes, Nurse Like Cells (NLC), Cellules Myéloïdes Suppressives (MDSC), Cellules dendritiques (DC), Cellules Stromales Mésenchymateuses (MSC) et Follicular Reticular Cell (FRC). Par le biais de facteurs solubles et de contacts directs, l'ensemble de ces cellules communique avec les cellules B de LLC (représenté en bleu au centre de l'image). Ces interactions contribuent à la suppression immunitaire et au recrutement

*de cellules participant à la survie et la prolifération des cellules leucémiques. Figure réalisée avec BioRender.com.*

## i. Composition du TME

### a. LES CELLULES IMMUNITAIRES

Les cellules T CD4<sup>+</sup>, notamment les T helper folliculaires (Tfh), sont des régulateurs essentiels de la réponse immunitaire adaptative. Dans la LLC, ces cellules sont détournées de leur rôle normal pour favoriser la survie des cellules B leucémiques, faisant d'elles des modulateurs coopératifs de la niche tumorale. Par le biais de l'expression de CD40L, elles interagissent avec le CD40 exprimé à la surface des cellules B, déclenchant l'activation des voies NF-κB et MAPK qui favorisent la prolifération et l'évasion apoptotique des cellules tumorales. Par ailleurs, les Tfh produisent de l'IL-4, de l'IL-21, et parfois de l'IFN-γ, qui renforcent l'expression de gènes de survie et de prolifération dans les B-LLC<sup>447</sup>.

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) - exprimant le CD4, le CD25 et FOXP3 – sont significativement enrichis dans le sang et les ganglions des patients atteints de LLC<sup>448,449,450</sup>. Leur expansion est stimulée par l'environnement tumoral, notamment via l'IL-10 et le TGF-β produits par les cellules stromales, les cellules B de LLC et les exosomes tumoraux. Véritables gardiens de l'immunosuppression, les Tregs inhibent l'activation des cellules T cytotoxiques et des cellules NK, empêchant ainsi toute attaque immunitaire efficace contre les cellules leucémiques. Leur accumulation est corrélée à une progression plus rapide de la maladie<sup>451</sup>.

Bien que présents dans la circulation, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> dans la LLC sont fonctionnellement épuisés et affichent des marqueurs d'anergie tels que PD-1, LAG-3, et TIM-3. « Soldats » épuisés de la surveillance immunitaire, leur perte de fonction cytotoxique est en partie orchestrée par les exosomes tumoraux, qui altèrent l'activation des T effecteurs, et par les signaux suppressifs des MDSC et des Tregs<sup>452</sup>.

Les cellules Natural Killer (NK), normalement capables d'éliminer des cellules tumorales sans présentation antigénique, sont présentes dans la LLC mais affichent une activité cytotoxique réduite. L'expression aberrante de HLA-G et de ligands de récepteurs inhibiteurs (ex. NKG2A) sur les B-LLC contribue à leur paralysie fonctionnelle. Les exosomes sécrétés par les cellules B leucémiques modulent également l'expression des récepteurs activateurs sur les NK<sup>453</sup>.

Les cellules dendritiques (DC), sentinelles du système immunitaire, sont dans la LLC souvent immatures et adoptent un phénotype tolérant. Elles expriment faiblement les molécules de co-stimulation (CD80/CD86), produisent peu d'IL-12, et orientent préférentiellement les réponses immunitaires vers l'induction de Tregs. Ainsi, elles ne jouent pas leur rôle de pont entre immunité innée et adaptative, mais plutôt de modulateurs passifs de la tolérance locale<sup>451</sup>.

Enfin, les MDSC (Myeloid-Derived Suppressor Cells), cellules myéloïdes immatures, sont accrues dans la LLC. Elles suppriment la prolifération des T effecteurs via la production d'arginase-1, NO, IL-10, ROS, et TGF- $\beta$ . Elles participent à l'immunosuppression systémique, soutiennent les Tregs et favorisent l'angiogenèse et la progression tumorale<sup>454</sup>.

## **b. LES CELLULES STROMALES**

Le microenvironnement tumoral de la LLC repose en grande partie sur une architecture stromale spécialisée qui façonne une niche protectrice et trophique pour les cellules B leucémiques. Parmi ces cellules, les Nurse-Like Cells (NLC), les Fibroblastic Reticular Cells (FRC) et les Mesenchymal Stromal Cells (MSC) occupent des rôles complémentaires mais convergents dans la modulation de la survie, de la migration et de la chimiorésistance des cellules malignes.

### *i. Les Nurse-Like Cells (NLC)*

Les Nurse-Like Cells (NLC) sont, par origine et nature, des cellules immunitaires, plus précisément des macrophages dérivés de monocytes CD14<sup>+</sup><sup>455,456</sup>. Elles sont principalement décrites dans des contextes pathologiques, en particulier la LLC, où elles remplissent un rôle similaire à celui des TAMs dans les cancers solides ; certains travaux suggèrent également que des cellules présentant des caractéristiques proches des NLC pourraient émerger dans des états inflammatoires chroniques, comme en témoigne leur description dans la polyarthrite rhumatoïde<sup>457</sup>. Dans le contexte de la LLC, les NLC acquièrent des fonctions typiquement associées aux cellules stromales. Cette identité fonctionnelle hybride les rend parfois ambiguës et en font d'elles des cellules de soutien essentielles aux cellules B de LLC<sup>456,458</sup>. Les Nurse-Like Cells (NLC) dérivent de monocytes CD14<sup>+</sup> du sang périphérique qui, au contact des cellules B leucémiques, subissent une différenciation spontanée en macrophages à polarisation M2-like<sup>459</sup>. Ce processus, observé aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, reflète l'influence directe de la niche tumorale sur la plasticité du compartiment myéloïde<sup>458,460</sup>.

Phénotypiquement, les NLC expriment des marqueurs caractéristiques des macrophages alternatifs, tels que CD68, CD163, et CD206, ainsi que des molécules d'activation comme CD14 et HLA-DR. Ces marqueurs soulignent à la fois leur origine monocytaire et leur capacité à interagir avec les cellules B-LLC via des mécanismes de présentation d'antigènes ou de signalisation directe<sup>461</sup>.

Sur le plan fonctionnel, les NLC sont de puissants fournisseurs de signaux de survie pour les cellules B leucémiques. Elles sécrètent en grande quantité des facteurs trophiques tels que BAFF (B-cell Activating Factor) et APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand), qui agissent via les récepteurs BAFF-R et TACI exprimés sur les B-LLC. Cette signalisation active les voies NF- $\kappa$ B et PI3K/AKT, entraînant une surexpression de gènes anti-apoptotiques comme BCL2 et MCL1, et conférant aux cellules tumorales une résistance accrue à l'apoptose<sup>456</sup>.

Les NLC produisent également des chimiokines et cytokines immunomodulatrices, notamment CXCL12, qui interagit avec CXCR4 sur les cellules B-LLC pour renforcer leur ancrage dans la niche et activer des cascades de survie intracellulaire. D'autres molécules comme IL-10, CCL3, et CCL4 participent à la modulation du microenvironnement immunitaire local, favorisant la polarisation des lymphocytes T vers un profil régulateur et l'inhibition des effecteurs cytotoxiques<sup>459,460</sup>.

Au-delà de leur rôle sécrétoire, les NLC participent activement à la résistance thérapeutique. En co-culture, elles protègent les cellules B-LLC de l'action de nombreux agents cytotoxiques, notamment la fludarabine, le venetoclax (inhibiteur de BCL2), ou encore l'ibrutinib (inhibiteur de BTK). Cette protection repose à la fois sur la stabilisation des protéines anti-apoptotiques (comme MCL1) et sur l'activation de voies de contournement métabolique, telles que l'autophagie ou le métabolisme mitochondrial oxydatif<sup>462</sup>.

Enfin, les NLC participent à la désorganisation du tissu lymphoïde normal. Dans les ganglions infiltrés par les B-LLC, elles forment des réseaux cellulaires diffus, qui perturbent la topographie classique des zones B et T, limitent la circulation des lymphocytes naïfs, et facilitent l'installation de niches aberrantes favorables à l'expansion clonale tumorale<sup>459</sup>.

## *ii. Les Fibroblastic Reticular Cells (FRC)*

Si les NLC, dérivées du compartiment myéloïde, incarnent une forme de plasticité immunitaire réorientée au service du soutien tumoral, d'autres cellules d'origine mésenchymateuse contribuent également à façonner la niche leucémique. C'est notamment le

cas des Fibroblastic Reticular Cells (FRC), dont le réseau dense et spécialisé structure l'environnement ganglionnaire et en régule finement les flux cellulaires et moléculaires<sup>463,464</sup>. Localisées principalement dans la zone T des ganglions lymphatiques, ces cellules mésenchymateuses non hématopoïétiques forment un réseau tridimensionnel réticulé, essentiel à l'organisation spatiale des cellules immunitaires et à la coordination des signaux de migration et de survie<sup>463</sup>.

Phénotypiquement, les FRC se distinguent par l'expression de gp38 (podoplanine) et d'antigènes matriciels tels que ER-TR7, tout en étant négatives pour les marqueurs hématopoïétiques (CD45) et endothéliaux (CD31)<sup>463,465</sup>. Leur matrice extracellulaire, riche en collagène et en glycoprotéines, sert de support mécanique mais aussi de canalisation pour les flux de cytokines et d'antigènes, facilitant la signalisation à distance dans le ganglion.

Dans un contexte normal, les FRC produisent des chimiokines telles que CCL19, CCL21 et CXCL12, qui assurent le positionnement correct des lymphocytes T et B au sein des compartiments ganglionnaires. Elles contribuent aussi à la circulation et à la rétention des lymphocytes, en modulant la barrière des cellules endothéliales à haute perméabilité (HEV) et en créant des gradients chimiotactiques adaptés à chaque sous-population immunitaire<sup>466</sup>. Cependant, dans la LLC, cette organisation est profondément altérée. L'infiltration massive de cellules B leucémiques provoque un remodelage pathologique du réseau FRC, avec perte de polarisation, dérégulation transcriptionnelle et hyperproduction de CCL21. Ce dérèglement entraîne une séquestration aberrante des cellules B tumorales dans des niches désorganisées, favorisant leur persistance et perturbant la circulation normale des lymphocytes au sein du ganglion<sup>459</sup>.

Les FRC contribuent également de manière directe à la survie des cellules B-LLC. Par la sécrétion de CXCL12, elles activent CXCR4 sur les cellules tumorales, déclenchant des cascades intracellulaires de type AKT et ERK, connues pour leur rôle anti-apoptotique<sup>467</sup>). Par ailleurs, sous l'influence de signaux inflammatoires locaux, les FRC peuvent subir une reprogrammation métabolique (ex. glycolyse accrue, activité mitochondriale modifiée) qui altère leur profil de sécrétion et renforce leur rôle trophique vis-à-vis des cellules tumorales<sup>468</sup>. En réponse à la présence prolongée de cellules B-LLC, les FRC expriment également des récepteurs sensibles à la lymphotoxine (LT $\alpha/\beta$ ) et au TNF- $\alpha$ , sécrétés par les cellules tumorales. Cette activation stimule leur expansion et leur différenciation, amplifiant le maillage stromal et favorisant ainsi la création de niches de survie auto-renforcées<sup>466</sup>.

### *iii. Les Mesenchymal Stromal Cells (MSC)*

Tandis que les FRC jouent un rôle fondamental dans la structuration des niches ganglionnaires, le compartiment médullaire repose sur une autre population stromale aux fonctions tout aussi déterminantes : les Mesenchymal Stromal Cells (MSC). Dérivées de cellules mésenchymateuses multipotentes, les MSC forment un réseau de soutien tissulaire capable de moduler à la fois la biologie cellulaire, le métabolisme, et l'immunité locale<sup>469,470,471,472</sup>. Loin de se limiter à une fonction architecturale, ces cellules constituent un élément actif de la niche tumorale, contribuant à la survie, à la migration et à la résistance thérapeutique des cellules B leucémiques.

Phénotypiquement, les MSC sont définies par la co-expression de CD73, CD90 et CD105, tout en étant négatives pour les marqueurs hématopoïétiques CD45, endothéliaux CD31, et progéniteurs CD34. Ces cellules sont capables de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes, mais dans le contexte leucémique, leur fonction principale est d'orchestrer l'environnement médullaire tumoral<sup>473</sup>.

Les MSC sécrètent une gamme étendue de facteurs solubles jouant un rôle crucial dans le soutien des B-LLC. Parmi eux, la chimiokine CXCL12 (SDF-1) est particulièrement importante : en interagissant avec CXCR4 sur les cellules B leucémiques, elle dirige leur migration vers les niches protectrices de la moelle osseuse. Cette interaction déclenche l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK, qui favorisent la survie et la prolifération tumorale, tout en limitant la sensibilité aux agents cytotoxiques<sup>468</sup>. D'autres cytokines telles que l'IL-6, l'IL-8, le VEGF, et le TGF- $\beta$  participent à la constitution d'un environnement immunomodulateur et anti-apoptotique. En particulier, l'IL-6 stimule la voie JAK/STAT3, contribuant à l'expansion clonale des cellules B et à leur protection contre l'apoptose, y compris lors de traitements par venetoclax ou ibrutinib<sup>471,474</sup>.

Outre leur rôle sécrétoire, les MSC interagissent directement avec les cellules B-LLC via des molécules d'adhésion telles que VCAM-1, ICAM-1, et fibronectine, établissant des contacts prolongés qui amplifient la signalisation pro-survie. Ces interactions physiques renforcent la résistance à l'apoptose, via l'activation de voies comme FAK, ERK, ou encore NF- $\kappa$ B, et miment des signaux issus de la stimulation antigénique du BCR<sup>475</sup>.

Un aspect particulièrement remarquable du soutien MSC est leur capacité à reprogrammer le métabolisme des cellules B-LLC. Plusieurs études ont démontré que les MSC peuvent transférer des mitochondries fonctionnelles aux cellules leucémiques, via des tunneling

nanotubes ou des vésicules extracellulaires, améliorant leur respiration mitochondriale et leur résistance au stress oxydatif. Cette plasticité métabolique permet aux B-LLC de survivre en conditions hostiles, notamment lors de l'exposition aux agents thérapeutiques ou en milieu hypoxique<sup>476,477</sup>.

Enfin, les MSC jouent un rôle central dans la régulation du compartiment immunitaire local, en orchestrant un environnement tolérant favorable à la persistance tumorale. Une de leurs fonctions majeures est l'inhibition de l'activation des lymphocytes T effecteurs, notamment par la sécrétion de TGF- $\beta$ , IL-10, et de prostaglandines, ainsi que par l'expression de molécules immunosuppressives telles que PD-L1. Ces signaux inhibent la prolifération des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et limitent leur capacité cytotoxique, ce qui contribue à l'évasion immunitaire des cellules B-LLC<sup>478,479</sup>. Parallèlement, les MSC favorisent l'expansion des lymphocytes T régulateurs. Cette induction s'opère via des voies de signalisation dépendantes de TGF- $\beta$ /Smad et de l'IL-2, et peut être amplifiée par des interactions via CD39/CD73, des ectoenzymes qui produisent de l'adénosine, un puissant immunomodulateur<sup>480</sup>.

## ii. Niche médullaire et ganglionnaire

Les niches tumorales, principalement localisées dans les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse, offrent aux cellules B leucémiques un cadre spatial et moléculaire protecteur. Elles conditionnent fortement leur comportement biologique — qu'il s'agisse de prolifération, de quiescence ou de résistance aux traitements. Loin d'être de simples sites d'accumulation cellulaire, ces niches sont dynamiques et participent activement à l'évolution clonale et à la persistance de la maladie<sup>456,481</sup>.

Dans les ganglions lymphatiques, les cellules B-LLC se regroupent dans des zones spécifiques appelées centres de prolifération (ou pseudo-centres germinatifs), où elles interagissent avec un réseau dense de cellules immunitaires et stromales<sup>482,483,484</sup>. Parmi les acteurs clés de cette niche ganglionnaire figurent les cellules T auxiliaires folliculaires (Tfh), les cellules dendritiques et les NLCs. Ces cellules du microenvironnement libèrent une multitude de signaux solubles — comme CD40L, IL-4, BAFF, APRIL et CCL21 — qui soutiennent la survie et stimulent la prolifération des cellules B-LLC via l'activation des voies BCR, NF- $\kappa$ B, PI3K-AKT-mTOR et NOTCH1<sup>456,481,484</sup>. De plus, ce dialogue moléculaire constant induit une reprogrammation transcriptionnelle et métabolique, favorisant notamment l'utilisation accrue du glucose et de la glutamine dans un environnement local hypoxique, tel que démontré dans des modèles *ex-vivo* mimant les niches ganglionnaires<sup>485</sup>. Ce remodelage

métabolique participe à la plasticité des cellules B-LLC et à leur capacité à contourner les pressions thérapeutiques et immunitaires, favorisant l'émergence de clones plus agressifs. Ce contexte niche-dépendant induit une plasticité transcriptionnelle et épigénétique des cellules B-LLC, leur conférant une résistance accrue aux agents thérapeutiques et une capacité d'évasion immunitaire. Par ailleurs, la niche ganglionnaire est le site de la sélection clonale sous pression immunitaire et thérapeutique, et l'observation histologique de centre de prolifération dans les ganglions est associée à une évolution plus agressive de la maladie<sup>486</sup>.

En parallèle, la moelle osseuse constitue une autre niche stratégique, où les cellules B-LLC adoptent un comportement bien différent. Ici, elles entrent dans un état de quiescence, caractérisé par une faible activité proliférative mais une forte résistance à l'apoptose. Cette niche médullaire repose en grande partie sur les cellules stromales mésenchymateuses (MSC), qui orchestrent un environnement riche en CXCL12, IL-6, TGF- $\beta$  et VEGF<sup>487</sup>. Ces cellules stromales assurent l'ancrage des cellules B-LLC via l'axe CXCL12/CXCR4 et les intégrines VLA-4/VCAM-1, tout en modulant leur environnement redox par transfert mitochondrial, réduisant ainsi le stress oxydatif et favorisant leur survie à long terme<sup>488,489,490</sup>. Par ailleurs, Le transfert mitochondrial décrit par plusieurs équipes suggère un soutien énergétique direct de l'environnement aux cellules tumorales<sup>491</sup>. Cette niche agit donc comme un refuge protecteur, où les cellules peuvent persister sous une forme résiduelle, souvent indétectable, malgré un traitement efficace. Elle joue un rôle central dans la constitution d'un réservoir leucémique capable de relancer la maladie après une phase de rémission, contribuant ainsi aux rechutes tardives<sup>492</sup>.

Ainsi, dans la LLC, le microenvironnement tumoral est le siège d'interactions bidirectionnelles complexes entre les cellules B leucémiques et les cellules non malignes qui les entourent. De nombreuses données expérimentales indiquent que les cellules tumorales ne subissent pas passivement leur environnement, mais qu'elles contribuent activement à le façonner en modulant le phénotype et la fonction des cellules stromales et immunitaires. Cette plasticité environnementale peut être étudiée plus finement au travers des différents types cellulaires décrit précédemment. Cependant, l'analyse fonctionnelle de ces interactions reste toutefois limitée par la difficulté d'obtenir et de maintenir en culture certaines de ces cellules du microenvironnement issues de patients atteints de LLC. C'est pour cela que de nombreux modèles cellulaires ont été générés pour pallier au manque des échantillons biologiques.

## D. Un modèle d'étude de la reprogrammation stromale

### i. Des lignées pour mimer le stroma LLC

Dans le cadre des études *in vitro* portant sur la LLC, de nombreuses lignées cellulaires stromales ont été développées afin de reproduire les caractéristiques fonctionnelles du compartiment stromal observé *in vivo*. Ces lignées permettent de modéliser les interactions dynamiques entre les cellules B leucémiques et leur microenvironnement, et de mieux comprendre les mécanismes de soutien, de protection et de signalisation qui contribuent à la survie et à la progression tumorale. Elles constituent une alternative précieuse aux cultures primaires, souvent limitées par la disponibilité restreinte du matériel patient, la variabilité interindividuelle et la difficulté à maintenir un phénotype stable sur le long terme. Les modèles stromaux disponibles se répartissent principalement en deux catégories : les lignées d'origine murine et les lignées d'origine humaine.

Les lignées murines, comme MS-5 ou M2-10B4, ont été largement utilisées pour leur robustesse en culture et leur capacité à soutenir la viabilité des cellules leucémiques humaines dans des systèmes de coculture, y compris dans des configurations tridimensionnelles ou des modèles de xélogreffe<sup>493,494</sup>. Bien qu'elles offrent une bonne stabilité expérimentale, leur origine murine impose certaines limites, notamment en ce qui concerne la fidélité des interactions moléculaires intercellulaires, en raison de divergences d'espèce dans les récepteurs, les ligands ou les facteurs solubles<sup>493,495</sup>.

A l'inverse, les lignées humaines, telles que les lignées HS-5 et HS-27a<sup>496</sup>, représentent des outils efficaces pour modéliser le microenvironnement stromal humain dans la LLC. Les travaux de l'équipe de Mauro Krampera, publié en 2020, ont mis en évidence la capacité de ces lignées à imiter les fonctions des MSC primaires précédemment décrites. Ils ont notamment démontré la capacité de ces cellules à exprimer certaines cytokines, facteurs de croissance et molécules d'adhésions essentiels pour les cellules leucémiques<sup>497</sup>. Dérivées de la moelle osseuse humaine, l'utilisation des HS-5 et des HS-27a comme modèle fibroblastes stromaux de la moelle osseuse est à ce jour bien établit dans l'étude de la LLC. Par ailleurs, des études récentes, synthétisé par K. Miari et M. Williams en 2023, ont renforcé l'intérêt de ces lignées en démontrant leur capacité à favoriser la progression tumorale et la chimiorésistance dans d'autres hémopathies telles que la Leucémie Aigüe Myéloïde (AML)<sup>498</sup>.

Au travers des différentes lignées disponible pour étudier finement le compartiment stromal mésenchymateux dans un contexte de LLC, il apparaît clairement que la lignée

cellulaire HS-5 constitue un modèle expérimental pertinent pour étudier la niche médullaire dans la LLC. Bien qu'elle ne possède pas l'ensemble du potentiel différenciatif des cellules stromales mésenchymateuses (MSC) primaires—en particulier son incapacité à initier une différenciation adipocytaire ou chondrogénique— la lignée HS-5 conserve une plasticité fonctionnelle et exprime plusieurs marqueurs typiques des MSC humains tels que CD73, CD90, et CD105<sup>497</sup>. Dans le contexte de la LLC, où les cellules tumorales dépendent étroitement de leur microenvironnement pour maintenir un phénotype résistant aux traitements et éviter l'apoptose, la lignée HS-5 permet de mimer les interactions paracrines et immunomodulatrices spécifiques au stroma médullaire<sup>499</sup>.

## ii. Un dialogue entre HS-5 et B-LLC

L'intérêt pour la lignée HS-5 s'est accru à la lumière de nombreuses études décrivant son influence directe sur le comportement des cellules B-LLC. Des travaux récents ont mis en évidence la richesse du dialogue bidirectionnel entre les cellules stromales HS-5 et les cellules leucémiques, reposant à la fois sur des contacts intercellulaires directs, la sécrétion de cytokines et de facteurs solubles, ainsi que la libération de vésicules extracellulaires<sup>492,500</sup>. Ce réseau complexe d'interactions permet aux HS-5 de remodeler profondément le phénotype des cellules B-LLC et de leur conférer des propriétés de survie accrues face à des stress environnementaux ou thérapeutiques.

L'une des conséquences les plus étudiées de cette interaction est la réduction marquée de l'apoptose des cellules B-LLC lorsqu'elles sont cultivées en présence de HS-5<sup>445</sup>. Cette protection repose sur l'activation de voies de signalisation pro-survie, notamment NF- $\kappa$ B, PI3K/AKT et MAPK, activées via des médiateurs comme BAFF et IL-6<sup>492,501</sup>.

En parallèle, les HS-5 favorisent une reprogrammation métabolique des cellules B-LLC, en stimulant la phosphorylation oxydative mitochondriale, un mécanisme qui permet aux cellules leucémiques de maintenir leur métabolisme énergétique même en condition de stress, et qui participe à leur persistance<sup>502</sup>.

D'un point de vue immunologique, la coculture avec des HS-5 induit une modulation de l'expression de marqueurs d'échappement immunitaire, comme PD-L1, sur les cellules B-LLC, réduisant leur reconnaissance par les lymphocytes T cytotoxiques<sup>503</sup>. De plus, l'expression par HS-5 de la protéine chaperonne BAG3 a été identifiée comme un régulateur essentiel du soutien stromal, sa suppression augmentant significativement l'apoptose des cellules leucémiques<sup>504</sup>. Enfin, plusieurs études ont démontré que la présence de HS-5 altère la

réponse thérapeutique des cellules B-LLC, en réduisant leur sensibilité à l'induction de l'apoptose par divers agents cytotoxiques ou inhibiteurs de voie<sup>492,505,506</sup>.

### iii. Education des cellules stromales

Dans une pathologie comme la LLC, le microenvironnement est le produit direct d'une reprogrammation active orchestrée par les cellules tumorales. Les cellules B-LLC exercent une reprogrammation dirigée sur leur entourage cellulaire, transformant les cellules stromales médullaires en vecteurs de soutien tumorigénique. Cette capacité d'éducation repose sur un dialogue bidirectionnel, dans lequel les signaux échangés modulent réciproquement le phénotype et la fonction des deux types cellulaires. Ce phénomène a conduit à de nombreuses études, résumé en 2020 dans la revue de M. Mangolini et I. Ringhausen explorant les modifications transcriptionnelles, métaboliques et fonctionnelles des cellules B-LLC lorsqu'elles sont cultivées en présence de MSC<sup>507</sup>. L'activation de voies de signalisation telles que NF- $\kappa$ B, PI3K/AKT ou STAT3, l'augmentation de la résistance à l'apoptose, ou encore l'induction d'un métabolisme oxydatif mitochondrial ont été largement documentées dans les cellules B-LLC en présence de HS-5<sup>492,502,508</sup>.

Néanmoins, il est essentiel de souligner que ces effets ne sont pas unilatéraux. Les changements dans les cellules B-LLC sont eux-mêmes souvent la conséquence de modifications préalables survenues dans les cellules stromales, elles-mêmes induites par l'exposition prolongée aux signaux leucémiques. Autrement dit, les cellules tumorales modèlent leur environnement pour que celui-ci produise ensuite les facteurs qui leur seront nécessaires. Les cellules B-LLC peuvent ainsi, par des signaux paracrines ou via des vésicules extracellulaires, imposer aux cellules stromales un programme transcriptionnel favorable à leur propre survie, comme en témoignent les augmentations de CXCL12, BAFF, ou encore de molécules immunosuppressives comme PD-L1<sup>491,509</sup>.

Cette dynamique peut être comparée à celle d'un chef d'orchestre formant lui-même ses musiciens : les cellules B-LLC enseignent aux cellules du stroma comment produire les notes — cytokines, facteurs de croissance, signaux métaboliques — nécessaires à leur propre harmonie tumorale. Le stroma ainsi remodelé devient non seulement protecteur, mais aussi producteur actif des éléments clés de la persistance leucémique.

De manière assez évidente, ces notions de reprogrammation et d'éducation du microenvironnement sont au cœur de nombreux travaux, et cela indépendamment de la pathologie. A cet effet, il me semble tout à fait juste de revenir sur deux exemples bien précis

de la littérature qui ont inspiré une partie de ce travail de thèse. Le premier exemple est celui des travaux de Kumagai et al. (2022), qui ont étudié le rôle de l'acide lactique dans le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC). Ils ont démontré que ce métabolite, produit par les cellules tumorales glycolytiques, module la réponse immunitaire en favorisant l'expression de PD-1 sur les cellules T régulatrices, contribuant ainsi à une niche immunosuppressive<sup>510</sup>. Le second exemple est celui des travaux de Geeraerts et al. (2021), qui s'inscrit dans un modèle de mélanome murin. Les auteurs y ont montré que le métabolisme des macrophages tumoraux conditionne leur fonction pro- ou anti-tumorale, notamment via leur réponse au lactate<sup>511</sup>. Ils démontrent qu'un métabolisme oxydatif favorise la formation de vaisseaux anormaux et la dissémination métastatique. Ces deux études, bien qu'ancrées dans des contextes pathologiques distincts, partagent cependant un point commun fondamental : le métabolisme cellulaire est un levier puissant de reprogrammation fonctionnelle dans le microenvironnement tumoral. Transposé à la LLC, cela nous a conduit à formuler des hypothèses concernant la capacité des cellules B-LLC à induire une reprogrammation des cellules stromales, notamment sur le plan métabolique.

## Objectifs

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est une hémopathie maligne caractérisée par l'accumulation de lymphocytes B CD5<sup>+</sup> dont la survie et la prolifération dépendent étroitement du microenvironnement tumoral. Les cellules B-LLC interagissent activement avec les cellules stromales environnantes qu'elles modifient à leur avantage pour favoriser leur propre développement. Cette capacité d'éducation du microenvironnement constitue une dimension clé de la physiopathologie de la LLC.

Ce travail de thèse vise à explorer les mécanismes moléculaires par lesquels les cellules B-LLC reprogramment les cellules stromales. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de coculture entre cellules leucémiques (lignées MEC-1, HG-3 ou cellules de patients) et la lignée de cellules stromales médullaires humaines HS-5. Cette étude s'articule autour de deux axes développés conjointement.

Le premier axe s'intéresse à l'impact de cette interaction sur le métabolisme des cellules HS-5. Des analyses protéomiques précédemment réalisées au laboratoire ont révélé une modulation du taux de protéines mitochondriales et redox dans les cellules HS-5 cocultivées avec des cellules B-LLC. À partir de ces observations, nous avons cherché à identifier les voies métaboliques altérées par des signaux solubles émis par les cellules B-LLC et à évaluer les bénéfices que les cellules leucémiques pourraient tirer de cette reprogrammation, notamment en termes de soutien énergétique ou de survie.

Le second axe explore les conséquences morphologiques et mécano-sensibles des contacts cellulaires. Nos travaux précédents ont mis en évidence une adhérence dynamique des cellules B-LLC aux cellules stromales, suggérant un dialogue mécanique actif. Dans ce contexte, la voie Hippo, connue pour sa sensibilité aux contraintes mécaniques, a été étudiée avec un focus particulier sur son effecteur final, le co-activateur transcriptionnel YAP. En modulant son expression (mutant actif YAP 5SA ou inhibition par shRNA), nous avons analysé son rôle dans l'organisation morphologique des cellules stromales, leur interaction avec les cellules B-LLC, ainsi que sur l'expression de molécules d'adhérence et de composants matriciels.

En étudiant ces deux dimensions — métabolique et mécanique — cette thèse apporte un éclairage nouveau sur les stratégies mises en œuvre par les cellules B-LLC pour remodeler leur niche tumorale et assurer leur propre survie.

## Matériels et Méthodes

L'ensemble de la section matériels et méthodes décrite ci-après concerne exclusivement la partie II (Etude de la voie de signalisation Hippo) de ce travail de thèse. Les sections matériels et méthodes spécifiques de la partie I (Reprogrammation métabolique des cellules stromales) seront directement explicités dans l'article associé.

### Culture cellulaire

Les cellules B primaires de LLC ont été recueillies auprès de patients après obtention de leur consentement éclairé lors de bilans effectués en routine à l'hôpital Avicenne (AP-HP, Bobigny, France). Tous les patients ont donné leur consentement écrit, validé par le comité d'éthique de l'hôpital Avicenne conformément à la Déclaration d'Helsinki. Les informations concernant les échantillons de patients utilisés dans le cadre de l'axe sont résumées dans le Tableau 1.

Les cellules B primaires de LLC ont été isolées à partir d'échantillons sanguins frais en utilisant le kit d'isolement Pan B Cell (Miltenyi Biotech, Teterow, Allemagne) selon les instructions du fabricant. Les cellules B isolées ont été maintenues dans un milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Gibco) et 1 % de pénicilline/streptomycine (Gibco), cultivées à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub> ou conservées congelées dans l'azote liquide dans un milieu composé de 10 % de DMSO dans du SVF.

Les lignées des cellules de LLC MEC-1 et HG-3 ont été achetées auprès de la DSMZ (Berlin, Allemagne) et ont été cultivées de la même manière que les cellules B tumorales primaires. La lignée de cellules HS-5 a été achetée auprès de l'ATCC (Manassas, VA, États-Unis) et a également été cultivée comme les cellules B tumorales primaires.

Lors des expériences de cocultures, les cellules stromales HS-5 et les cellules B-LLC ont été cultivées en contacts directs. Les cellules HS-5 ont étéensemencées 24 heures avant la coculture pour leur permettre d'adhérer. Les cellules B-LLC sont ensuite rajoutées à un ratio cellules HS-5/B-LLC de 1 :10 (sauf indication contraire) pour des durées variables selon les expériences. A l'issue des cocultures, les cellules de la fraction non-adhérente (cellules B-LLC) sont collectées directement. Les cellules de la fraction adhérente (mélange de cellules HS-5 et B-LLC) sont détachées des puits de culture à l'aide de Trypsine. Les cellules sont ensuite directement utilisées dans divers protocoles expérimentaux. Selon les besoins expérimentaux, le mélange de cellules stromale-BLLC retrouvé dans la fraction non-adhérente des cocultures est soumis à un tri magnétique pour séparer les cellules HS-5 des cellules B-LLC.

Un comptage cellulaire à l'aide du test d'exclusion au Bleu de Trypan a été utilisé pour établir les différentes cultures de manière standardisée. Après les cocultures, les cellules HS-5 et B-LLC ont été récoltées et remises en suspension dans du milieu de culture. Un volume égal d'une solution de Bleu de Trypan (0,4%), préparée dans notre laboratoire en conditions stériles, a été mélangé à la suspension cellulaire (dilution 1:1). Les cellules viables (non colorées) et non viables (colorées en bleu) ont été comptées manuellement à l'aide d'une cellule de comptage de Malassez, sous microscope optique. Dans certains cas, le comptage a été réalisé de manière automatique par l'analyseur de viabilité cellulaire Vi-Cell® XR (Beckman Coulter), selon les recommandations du fabricant.

UPN	Genre	Age (au diagnostic)	Lymphocytose (10 <sup>9</sup> /L)	Statut mutationnel IGHV
438	H	44	94,24	UM
095	H	58	39,01	M
421	H	74	164,88	UM
334	H	53	81,59	M
198	H	60	66,68	UM
298	H	70	167,01	M
108	H	41	190,35	M
298	H	70	185,95	M
277	F	71	206,19	-
455	F	60	233,29	M
055	H	75	128,05	M
435	F	58	118,83	UM
441	F	48	104,3	UM
053	H	46	115,55	UM
388	F	61	116,16	M
412	H	67	83,00	M
446	H	61	151,93	M
181	H	70	121,92	UM

*Table 1 : Caractéristiques des patients LLC. H : Homme ; F : Femme ; M : Muté ; UM : Non Muté.*

## Lignée HS-5 stables (pLKO, shYAP, YAP 5SA)

Pour la génération de lignées cellulaires stables, nous avons utilisé des vecteurs lentiviraux et rétroviraux. Les productions virales ont été faites dans les 293-LTV par une triple transfection au PEI (Polyéthylèneimine) d'un des plasmides de transfert (pLKO.1 ou pQCXIH), d'un des plasmides d'emballage (Pax2 (Addgene #35002) ou pUMVC (Addgene #8449)) et du plasmide d'enveloppe pCMV-VSV-G (Addgene #8454). Après filtration (0.45µm) et ultracentrifugation (82700g) les HS5 ont été infecté à 1 MOI (Multiplicity of infection) en présence de polybrene (6 µg/mL). Ensuite les cellules ont été sélectionnées à l'aide de puromycine (1 µg/mL pour les plasmides pLKO.1) ou d'hygromycine B (200 µg/mL pour le plasmide pQCXIH), jusqu'à obtention de lignées stables. Par la suite, les lignées transgéniques ont toutes été maintenues dans des conditions de culture identiques aux cellules HS-5 précédemment décrites. Néanmoins, l'ajout d'antibiotique est effectué une fois par semaine pour maintenir les clones transgéniques en culture. 72h avant chaque expérience, les cellules sont remises en culture sans antibiotiques afin que cela n'altère pas les différentes conditions expérimentales.

Le plasmide pQCXIH-Myc-YAP-5SA (Addgene #30093), permettant l'expression de la forme constitutivement active de YAP (mutant YAP-5SA), a été utilisé avec les plasmides pUMVC et pCMV-VSV-G pour générer la lignée HS-5 YAP 5SA.

Le vecteur pLKO.1 Puro (Addgene #8453) a été utilisé d'une part avec les plasmides Pax2 et pCMV-VSV-G pour générer la lignée de contrôle vide HS-5 PLKO et d'autre part pour la construction de pLKO.1-shYAP. Ce dernier a été obtenu par sous-clonage d'une séquence codant un shRNA dirigé spécifiquement contre YAP. Les expériences de sous-clonage, la digestion enzymatique, la ligation, ainsi que la validation par séquençage, ont été réalisées et vérifiées au sein de notre laboratoire.

## Tri magnétique

Afin d'étudier spécifiquement les cellules HS-5 après cocultures en contacts directs et d'éviter une contamination des signaux par les cellules B-LLC, un protocole de tri magnétique a été mis au point. La suspension cellulaire contenant la fraction adhérente des cocultures, contenant des cellules stromales HS-5 et des cellules B-LLC, est triée à l'aide de billes magnétiques CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec, #130-050-301). Les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes à 300g puis resuspendues dans le tampon de tri magnétique (PBS, 0,25M EDTA, 2mM BSA) contenant les billes couplées à un anti-CD19. L'ensemble du processus de tri est réalisé

sur colonne MACS MS/LS (Miltenyi Biotec) placée sur un support aimanté, selon le protocole du fabricant et à 4°C pour un meilleur rendement. Ce tri magnétique permet une sélection négative des cellules HS-5 dans une fraction dite « non-retenue » tandis que les cellules B-LLC sont récupérées en retirant le support aimanté dans une fraction dite « retenue » à l'aide d'un piston. Après chaque tri, les cellules sont comptées pour estimer l'enrichissement en cellules HS-5. Les cellules triées sont ensuite utilisées dans différentes approches expérimentales ou stockées sous forme de culot sec à -80°C pour une utilisation ultérieure.

## Détection de la forme active de RhoA par Pull-Down

L'activité de la GTPase RhoA a été évaluée à l'aide du kit Active Rho Pull-Down and Detection Kit (Thermo Scientific, #16116), basé sur la capture sélective de la forme active (liée au GTP) de Rho via son interaction spécifique avec le domaine RBD (Ras-Binding domain) de la protéine Rhotekin fusionné à la GST. Le protocole a été suivi conformément aux recommandations du fabricant.

Les cellules ont été lavées à l'aide de PBS froid, puis lysées sur glace dans le tampon de lyse fourni dans le kit, complété avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (décrit dans la section « western blot »). Après une incubation de 15 minutes sur glace, les lysats ont été clarifiés par centrifugation à  $16\ 000 \times g$  pendant 15 minutes à 4°C. La concentration protéique a été déterminée par le test BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific).

Pour chaque condition expérimentale, une quantité de 500 µg de protéines totales a été incubée avec 40 µL de résine Glutathion-Agarose couplée au GST-Rhotekin-RBD, préalablement lavée, dans une colonne (fournie). L'incubation a été réalisée à 4°C pendant 1 heure sous agitation douce. Après incubation, les colonnes ont été lavées trois fois à l'aide du tampon de lavage fourni, afin d'éliminer les protéines non spécifiquement liées.

Les complexes liés à la résine ont été élués à l'aide du tampon d'éluion fourni dans le kit puis chauffés à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons ont par la suite été séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 4-15% puis transférés sur membrane de nitrocellulose. La détection de Rho actif a été réalisée par Western blot en utilisant l'anticorps pan-Rho primaire (fourni dans le kit, dilution 1 :1000), suivi d'un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (HRP) également fourni (dilution 1 :10000). La révélation a été effectuée par chimiluminescence, en utilisant un substrat ECL (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad, #1705061, non inclus dans le kit).

Un contrôle expérimental a été réalisé en traitant certains lysats avec du GTP $\gamma$ S (maintenant la forme active de RhoA), conformément aux recommandations du fabricant, pour valider la spécificité de la détection de Rho-GTP. Ce contrôle est inclus dans le kit.

## Fractionnement cytoplasmique et nucléaire

L'extraction des fractions cytoplasmique et nucléaire a été réalisée à l'aide du kit NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, #78835), selon les instructions du fabricant.

Les cellules ( $\sim 2 \times 10^6$  par condition) ont été récoltées par centrifugation à 500 x g pendant 5 minutes à 4°C, lavées une fois avec du PBS froid, puis resuspendues dans le réactif CER I (Cytoplasmic Extraction Reagent I). Après une incubation de 10 minutes sur glace, le réactif CER II a été ajouté, suivi d'une courte agitation au vortex (5 secondes) et d'une incubation supplémentaire de 1 minute sur glace. Le lysat a ensuite été centrifugé à 16 000 x g pendant 5 minutes à 4°C pour séparer la fraction cytoplasmique (surnageant), collectée immédiatement et stockée à -80°C.

Le culot, contenant les noyaux intacts, a été lavé au PBS (pour limiter les contaminations croisées cytoplasme/noyau) et resuspendu dans le réactif NER (Nuclear Extraction Reagent). Après agitation vigoureuse au vortex pendant 15 secondes toutes les 10 minutes pendant un total de 40 minutes sur glace, le mélange a été centrifugé à 16 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant, représentant la fraction nucléaire soluble, a été soigneusement collecté et stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

La concentration protéique des différentes fractions a été déterminée par le test BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Les différents lysats ont été préparés avec du Laemmli 4X et dénaturés 5 minutes à 95°C. Les échantillons ont ensuite été utilisés selon le protocole complet de Western blot décrit dans la section appropriée. La pureté des fractions cytoplasmique et nucléaire a été contrôlée par Western blot à l'aide de marqueurs spécifiques : Tubuline (cytoplasmique) et Histone H3 (nucléaire).

## Western Blot et analyse densitométrique

Les cellules ont été collectées et lysées, selon le type d'expérience, soit avec un tampon NP-40 (1% NP-40 dans Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) soit avec un tampon RIPA (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% désoxycholate de sodium, 0,1% SDS, 10% glycérol). Tous les tampons de lyse étaient supplémentés avec un mélange d'inhibiteurs de

protéases et de phosphatases : orthovanadate de sodium (10 mM), NaF (10  $\mu$ M), aprotinine (10  $\mu$ g/mL), leupeptine (5  $\mu$ g/mL), pepstatine A (1  $\mu$ g/mL) et PMSF (100 mM). La lyse a été effectuée à 4°C pendant 30 minutes sous agitation intermittente, suivie d'une sonication sur glace pendant 5 minutes. Les lysats ont été clarifiés par centrifugation à 10 000  $\times$  g pendant 10 minutes à 4°C. Les lysats protéiques ont été récupérés et dosés à l'aide du test BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific), conformément au protocole du fabricant.

Pour chaque condition, 30  $\mu$ g de protéines totales ont été mélangées avec du tampon Laemmli 4 $\times$ , chauffées à 95°C pendant 5 minutes, puis déposées sur gel SDS-PAGE. Selon les besoins expérimentaux, les protéines ont été séparées sur des gels polyacrylamide à 10% (coulés en laboratoire) ou sur des gels pré-coulés à gradient 4–15% Criterion™ TGX™ (Bio-Rad, #5671084). Le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose a été réalisé par transfert électrophorétique en conditions humides, à l'aide d'un système de transfert classique à cuve immergée. La qualité du transfert a été systématiquement vérifiée par coloration au Rouge Ponceau S.

Les membranes ont été bloquées pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de 5% de lait écrémé ou de BSA, selon l'anticorps cible, diluée dans TBST (Tris-buffered saline, 0,1% Tween-20). L'incubation avec les anticorps primaires a été effectuée à 4°C pendant la nuit. Après trois lavages dans TBST, les membranes ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante avec des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase (HRP), dirigés contre les IgG de souris (GAM-HRP) ou de lapin (GAR-HRP), selon la spécificité de l'anticorps primaire. Tous les anticorps ont été utilisés conformément aux recommandations des fabricants et sont détaillés dans le Tableau 2.

La détection a été réalisée par chimiluminescence en utilisant les substrats Clarity™ Western ECL ou Clarity Max™ Western ECL (Bio-Rad), selon les exigences de sensibilité. Les signaux ont été visualisés à l'aide du système ChemiDoc MP (Bio-Rad).

La quantification des signaux issus des Western blots a été réalisée par analyse densitométrique à l'aide du logiciel Bio-Rad Image Lab (version 6.1). Pour chaque membrane, l'intensité des bandes correspondant aux protéines d'intérêt a été mesurée après soustraction du bruit de fond local. Les valeurs obtenues ont été systématiquement normalisées à l'intensité du contrôle de charge correspondant. Les résultats ont été exprimés soit en niveaux absolus normalisés (rapport cible/contrôle de charge), soit en niveaux relatifs par rapport à une condition de référence (condition HS-5 seules). Les courbes et graphiques ont été construits à partir de ces

valeurs normalisées. La majorité des analyses ont été réalisées sur au moins trois expériences biologiques indépendantes.

<b>Cible</b>	<b>Clone</b>	<b>Source</b>	<b>Fabricant</b>	<b>Référence</b>
Alpha-catenin	G-11	Souris	Santa Cruz Biotechnology	SC-9988
Bêta-catenin	12F7	Souris	Santa Cruz Biotechnology	SC-59737
FAK	-	Lapin	Cell Signaling Technology	3285
pFAK (Y397)	-	Lapin	Cell Signaling Technology	3283
PAX	D9G12	Lapin	Cell Signaling Technology	12065
pPAX (Y118)	E9U9F	Lapin	Cell Signaling Technology	69363
Fibronectine	E5H6X	Lapin	Cell Signaling Technology	26836
YAP	-	Lapin	Cell Signaling Technology	4912
pYAP (S127)	D9W21	Lapin	Cell Signaling Technology	13008
CD19	-	Rabbit	Cell Signaling Technology	3574
HSP90	-	Lapin	Cell Signaling Technology	4874
Tubuline	Tub 2.1	Souris	Sigma - Aldrich	T5201
Actine	AC-15	Souris	Sigma - Aldrich	A5441
IgG de souris	-	Chèvre	Bio-Rad	170-5047
IgG de Lapin	-	Chèvre	Bio-Rad	170-5046

*Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés en western blot.*

## qRT-PCR

Les cellules stromales HS-5 ont été cocultivées pendant 24h avec la lignée B-LLC MEC dans les conditions standard (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). À l'issue de la co-culture, un tri magnétique a été réalisé afin de séparer les deux populations cellulaires. Les cellules HS-5 isolées ont ensuite été collectées pour l'extraction de l'ARN total.

L'ARN total a été extrait à l'aide du kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, #74104/6), selon les instructions du fabricant. La qualité et la concentration de l'ARN ont été évaluées à l'aide d'un Nanophotomètre N60-Touch (Implen), en mesurant les rapports d'absorbance A260/A280 et A260/A230.

La rétrotranscription a été réalisée à partir de 900 ng d'ARN total, en utilisant le kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad, #170-8891), conformément au protocole du fabricant. La réaction a été effectuée dans un thermocycleur selon le programme suivant :

- Priming : 5 minutes à 25°C
- Reverse transcription : 20 minutes à 46°C
- Inactivation : 1 minute à 95°C

L'ADNc obtenu a ensuite été dilué au 1/20<sup>e</sup> avant d'être utilisé pour la PCR quantitative.

Les réactions de qRT-PCR ont été réalisées sur un thermocycleur StepOnePlus (Applied Biosystems), en utilisant le PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, #A25741). Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 12,5 µL, contenant 5 µL d'ADNc dilué, 6,25 µL de Master Mix, et des amorces à une concentration finale de 1,25 µM chacune.

Les amorces ont été conçues à l'aide des logiciels Perl Primer, Ensembl et NCBI BLAST, selon les critères suivants :

- (i) présence de 3 à 5 bases GC en 3',
- (ii) température de fusion comprise entre 58 et 60°C,
- (iii) contenu GC compris entre 20 % et 80 %,
- (iv) longueur des amorces entre 17 et 25 nucléotides.

Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 3. Toutes les expériences ont inclus un contrôle négatif sans ADNc (NTC) pour vérifier l'absence de contamination.

Les niveaux d'expression génique ont été analysés selon la méthode comparative du Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). L'expression relative des gènes cibles a été normalisée à celle d'un gène de référence (Beta-2-Microglobuline) puis aux cellules HS-5 seules comme échantillon de référence. Chaque condition expérimentale a été analysée en réplicats techniques et biologiques, et les valeurs de Ct ont été moyennées.

Cibles	Amorce sens (F)	Amorce anti-sens (R)
FN1 (Fibronectine)	5'-GCAACTCTGTCAACGAAGG-3'	5'-GCATAATGGGAACTGTGTAGG-3'
CCN1 (CYR61)	5'-AGTGTACAGCAGCCTGAAA-3'	5'-CGTAAGTAAACCTGACTGGTTC-3'
CCN2 (CTGF)	5'-CTGGAAGAGAACATTAAGAAGGG-3'	5'-CTCAAACCTTGATAGGCTTGGAG-3'
B-2-M (Beta-2-Microglobuline)	5'-CTCCGTGGCCTTAGCTGTG-3'	5'-TTTGGAGTACGCTGGATAGCCT-3'

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour la qPCR.

## Immunofluorescence

Les cellules stromales HS-5 ont étéensemencées sur des lamelles de verre stériles (coverslips) et incubées à 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 24 à 48 heures, selon le protocole expérimental, afin de permettre leur adhésion. Pour certaines conditions, une coculture avec des cellules B-LLC a été réalisée à un rapport de 1:10 (HS-5 : B-LLC) durant 24 heures, avant fixation.

À l'issue de l'incubation ou de la coculture, les cellules ont été lavées à l'aide de PBS (Phosphate-Buffered Saline), puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4 % et de sucre à 4 % pendant 20 minutes à température ambiante. La réaction de fixation a été neutralisée par une incubation avec du chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl) pendant 10 minutes.

Les cellules ont ensuite été perméabilisées à l'aide d'une solution de Triton X-100 à 0,02 % pendant 15 minutes, puis les sites non spécifiques ont été bloqués avec une solution de gélatine de peau de poisson à 1 % pendant 60 minutes à température ambiante.

Le marquage du cytosquelette d'actine a été effectué à l'aide d'un conjugué Phalloïdine-Alexa Fluor 546 (Invitrogen, #22283), incubé pendant 60 minutes à température ambiante. Une contre-coloration nucléaire a été réalisée avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) pendant 15 minutes.

Après les étapes de marquage, les lamelles ont été montées sur lames à l'aide du milieu de montage anti-atténuation ProLong™ Glass (Invitrogen, #P36980), puis conservées à 4 °C à l'abri de la lumière jusqu'à l'observation.

L'imagerie a été effectuée à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence Axio Observer D.1 (Zeiss). Les signaux ont été capturés dans les canaux DAPI (excitation 350/50 nm et émission 460/50 nm) et Texas Red (Phalloïdine) (excitation 545/25 nm et émission 605/70 nm). Pour les besoins de certaines expériences, des images en lumière blanche (Bright Field) ont été également acquises à l'aide du même microscope.

## Cytométrie en flux

Les analyses par cytométrie en flux ont été réalisées afin de caractériser les populations cellulaires, d'évaluer l'expression de marqueurs spécifiques de surface ou d'évaluer spécifiquement la viabilité cellulaire. Après les conditions expérimentales définies, les cellules ont été récoltées, lavées deux fois avec du tampon phosphate-buffered saline (PBS, Gibco) contenant 2% de SVF (Gibco). Les cellules ont été resuspendues à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/mL. L'ensemble des anticorps utilisés en cytométrie en flux sont indiqués dans le Tableau 4.

Pour l'identification des sous-populations cellulaires, un marquage en surface a été réalisé en incubant les cellules pendant 20 minutes à 4°C à l'abri de la lumière avec des anticorps conjugués anti-CD90 (cellules HS-5) et anti-CD19 (cellules B-LLC). L'ensemble du processus de marquage a été réalisé dans du tampon de marquage (PBS + 2% SVF). Après incubations, les cellules ont été lavées deux fois avec ce tampon.

Pour l'étude de l'expression membranaire de protéines d'adhésion, les cellules ont été incubées pendant 20 minutes à 4°C dans l'obscurité avec les anticorps conjugués aux fluorochromes appropriés (concentrations définies par le fabricant), dilués dans du tampon de marquage (PBS + 2% SVF). Après incubation, les cellules ont été lavées deux fois à l'aide du même tampon et resuspendues dans 300µL de PBS 2% SVF pour l'acquisition. L'exclusion des cellules mortes a été effectuée à l'aide du colorant de viabilité BD Horizon™ Fixable Viability Stain 440UV (BD Biosciences, #566332), selon les recommandations du fabricant.

Pour les expériences de viabilité cellulaire, le marquage des sous-populations cellulaires a été suivi d'un marquage Annexin V / 7-AAD. Les cellules ont été incubées pendant 15 minutes à température ambiante, à l'obscurité, dans un tampon de liaison composé de 0,1 M d'Hepes (pH

7,4), 1,4 M de NaCl et 25 mM de CaCl<sub>2</sub>. Après marquage, les cellules ont été lavées une fois dans le même tampon de liaison, puis resuspendues dans ce tampon pour l'acquisition. L'Annexin V a été utilisée pour marquer spécifiquement les cellules en apoptose précoce et le 7-AAD les cellules en apoptose tardive (ou nécrotiques). Les cellules doublement négatives pour ces deux marqueurs ont été considérées comme viables.

L'acquisition des données a été effectuée à l'aide d'un cytomètre BD FACS Symphony A3™ (BD Biosciences). Un minimum de 10 000 événements a été enregistré par échantillon. L'exclusion des débris et des doublons cellulaires a été réalisée en utilisant les paramètres FSC/SSC et l'analyse de la largeur et de l'aire du FSC.

Les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo v10 (BD Biosciences). Les populations d'intérêt ont été définies par des stratégies de gating basées sur des témoins non marqués, des isotypes, et des contrôles FMO (Fluorescence Minus One).

<b>Cible</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Isotype</b>	<b>Fabricant</b>	<b>Référence</b>
7-AAD	PerCP-Cy5.5	-	BD biosciences	559925
Annexin V	APC	-	BD biosciences	550475
CD5	BUV737	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD biosciences	612842
CD19	APC-Cy7	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD biosciences	557791
CD19	BV786	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD biosciences	563325
CD29	BB515	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD biosciences	564565
CD49d	BV421	Mouse IgG1, κ	BD biosciences	565277
CD54	APC	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD biosciences	559771
CD90	BUV395	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD biosciences	563804
CD90	PE-Cy5	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD biosciences	555597
Isotype	APC	Mouse IgG1, κ	BD biosciences	555751

Isotype	BB515	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD biosciences	564416
Isotype	BV421	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD biosciences	562438

Tableau 4 : *Liste des anticorps utilisés en cytométrie en flux.*

## Système rapporteur Hippo (HIP/HOP)

Les cellules stromales HS-5 ont étéensemencées 24h avant transfection puis transfectées à l'aide du réactif JetPrime (Polyplus-Sartorius, #POL101000046), conformément aux recommandations du fabricant. Un système rapporteur basé sur la luciférase a été utilisé pour évaluer l'activité transcriptionnelle dépendante de YAP/TEAD. Deux plasmides contenant des éléments de réponse TEAD ont été utilisés : HOP-flash (Addgene, #83467) et HIP-flash (Addgene, #83466) codant pour la luciférase Firefly, en association avec un plasmide de contrôle REN codant pour la luciférase Renilla (Addgene, #27163) afin de normaliser l'efficacité de transfection.

Les cellules ont été doublement transfectées avec les plasmides rapporteurs (HOP-flash ou HIP-flash) et le plasmide RNE. Quatre heures après la transfection, le milieu de transfection a été remplacé afin d'éliminer le transfectant et les plasmides excédentaires. Suite au changement de milieu, des cocultures avec des lignées B-LLC ont été initiées pour une durée de 24 heures. Les ratios HS-5 : B-LLC utilisés dans ces cocultures sont de 1:5 (cocultures MEC) et 1 :10 (cocultures B-LLC primaires).

À l'issue des cocultures (24h post transfection), les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été quantifiée en deux étapes successives à l'aide du kit Dual-Glo Luciferase Assay (Promega, #E2920), selon les instructions du fabricant. La luminescence de la luciférase Firefly a d'abord été mesurée, suivie de celle de la luciférase Renilla, permettant une normalisation interne.

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de microplaque multimode Tristar 2 (Berthold). L'activité relative de transcription induite par YAP a été exprimée comme le rapport Firefly/Renilla, puis comparée à la condition contrôle (HS-5 seules).

## Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques ainsi que la représentation graphique des données analysées ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism (v8 ou supérieure). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM).

Les tests statistiques ont été choisis en fonction du type de données et du design expérimental. Le test de Student (t-test) a été utilisé pour comparer deux groupes, en version appariée lorsque les mesures étaient répétées sur les mêmes échantillons, et non appariée pour les comparaisons entre groupes indépendants. Le test de Mann-Whitney a été appliqué lorsque les données ne suivaient pas une distribution normale ou en cas de petits effectifs. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour les comparaisons appariées non paramétriques. La normalité des distributions a été vérifiée lorsque nécessaire à l'aide des tests intégrés dans GraphPad Prism. Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative pour toutes les analyses.

Les comparaisons multiples ou analyses de variance (ANOVA) ont été évitées dans ce contexte, ou remplacées par des tests appropriés pour des comparaisons simples entre deux conditions.

# Résultats

## I. Reprogrammation métabolique (Reverse Warburg Effect) des cellules stromales par les cellules B-LLC

L'environnement tumoral joue un rôle central dans la progression de la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Il est désormais bien établi que les cellules tumorales isolées de LLC entrent rapidement en apoptose en l'absence d'un support stromal ou de signaux dérivés d'autres cellules du microenvironnement<sup>512,513</sup>. Ce dialogue cellulaire, reposant sur des contacts directs et des signaux solubles, permet non seulement de soutenir la survie des cellules tumorales mais favorise également leur rétention dans les organes lymphoïdes et leur expansion clonale.

Les stratégies thérapeutiques modernes, telles que les inhibiteurs de la tyrosine kinase de Bruton (BTK) – par exemple l'ibrutinib, l'acalabrutinib ou le zanubrutinib – visent précisément à interrompre cette communication délétère et à entraîner la redistribution des cellules tumorales depuis les organes lymphoïdes (ganglions principalement) vers le sang périphérique<sup>514,515</sup>. Toutefois, au-delà de ce soutien, des travaux récents ont mis en évidence que les cellules de LLC sont également capables de reprogrammer activement leur microenvironnement en leur faveur, notamment en altérant la composition et l'organisation du stroma lymphoïde<sup>484,508</sup>.

Dans l'étude présentée ci-après, nous avons cherché à caractériser cette reprogrammation/éducation stromale par les cellules de LLC sous un angle métabolique, en particulier à travers l'induction d'un métabolisme glycolytique accru dans les cellules stromales. Contrairement à d'autres types de cellules tumorales qui exploitent la glycolyse aérobie pour leur propre métabolisme (effet Warburg), les cellules de LLC dépendent principalement de la glutaminolyse et de l'oxydation des acides gras<sup>516</sup>. Toutefois, nous avons émis l'hypothèse que ces cellules tumorales pourraient induire la glycolyse dans les cellules stromales afin d'utiliser les métabolites générés, notamment le lactate.

A l'aide d'un modèle de coculture sans contact (chambre de Boyden) constitué de la lignée de cellules stromales humaines HS-5 et des cellules de LLC de patients ou issues de la lignée MEC-1, nous avons précédemment identifié par des approches multiomiques une reprogrammation transcriptionnelle (RNA-seq) et protéique (spectrométrie de masse) dans les cellules HS-5 en présence de cellules de LLC. Les résultats mettent en évidence une surexpression de gènes et de protéines liés à la glycolyse, comme ENO2, HK2, PGM1 ou GFPT2, ainsi qu'une activation des voies de signalisation inflammatoire médiées par NF- $\kappa$ B et

mTORC1 – voies connues pour leur rôle dans la réponse stromale induite en présence de cellules tumorales<sup>60,508</sup>.

Les données fonctionnelles obtenues au cours de ce travail de thèse ont permis de confirmer que cette reprogrammation ne s'accompagne pas d'une augmentation de la prolifération stromale. Elle se traduit en revanche par un accroissement de l'activité métabolique, caractérisé par une augmentation de la consommation de glucose, de la production de ROS et de l'acidification du milieu. L'utilisation de l'analyse métabolique Seahorse a révélé une augmentation significative du taux de glycolyse (ECAR) ainsi que de la respiration mitochondriale (OCR) dans les cellules HS-5 en contact avec le milieu conditionné par les cellules de LLC.

Nous avons ensuite démontré que le lactate produit par les cellules HS-5 peut être capté activement par les cellules de LLC, comme en témoigne la diminution du lactate marqué au <sup>13</sup>C dans le milieu après incubation avec des cellules de LLC. L'expression du transporteur MCT4 (export lactate) dans les cellules HS-5 ainsi que la capacité des cellules de LLC à internaliser le lactate suggèrent la mise en place d'un mécanisme métabolique de type « Reverse Warburg effect » au profit des cellules tumorales<sup>517,518</sup>.

Les effets fonctionnels du lactate sur les cellules de LLC ont été étudiés. Les résultats montrent une amélioration de la survie cellulaire (test MTT), ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation des kinases BTK et ERK, accompagnée d'une induction de c-Myc, témoignant d'une activation accrue de la signalisation du BCR en réponse au lactate.

Enfin, dans un modèle de xénotransgreffe CAM (chorioallantoic membrane), nous avons mis en évidence une augmentation significative de la proportion de cellules tumorales humaines CD19<sup>+</sup> en réponse à la présence de lactate, confirmant le rôle favorable de ce métabolite dans l'expansion tumorale *in vivo*.

En résumé, ce travail montre que les cellules de LLC induisent une reprogrammation du métabolisme des cellules stromales qui se traduit par une augmentation de la production/export de lactate. Ce dernier peut ensuite être utilisé par les cellules tumorales comme source métabolique pour renforcer leur propre survie. Ces résultats mettent en lumière un nouveau mécanisme d'adaptation métabolique au sein du microenvironnement tumoral de la LLC et suggère que la voie métabolique du lactate pourrait constituer une potentielle cible dans le cadre de nouvelles stratégies thérapeutiques combinées. L'ensemble de ces données sont présentées dans la section suivante sous la forme d'un manuscrit en cours de finalisation pour prochaine

soumission à Nature Communications (titre de l'article : CLL cells educate stromal cells to enhance glycolysis and produce lactate to fuel their metabolism).

## **CLL cells educate stromal cells to enhance glycolysis and produce lactate to fuel their metabolism**

Jordan Ferreira, Emeline Saindoy, Abir Ben Amor, Lotfi Chemali, Antonin Oudar, Laure Aubard, Merieme Bensalah, Ian Morilla, Valeria Bisio, Karl Balabanian, Florence Poirier, Nuria Profitos Peleja, Gael Roué, Dominique Ledoux, Fanny Baran-Marszak, Nadine Varin-Blank, Gregory Lazarian\* and Laura Gardano\*

\* Co-Corresponding and co-senior authors of this paper these authors are both seniors of this paper

Abbreviations: CLL (chronic lymphocytic leukaemia), TCA (tricarboxylic acids cycle, Krebs cycle), OxPhos (Oxidative phosphorylation), ECAR (extracellular acidification rate), OCR (Oxygen consumption rate)

Keywords: CLL, microenvironment, metabolism, glycolysis, lactate, stromal cells

### **Abstract**

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is characterized by the accumulation of mature B cells in the blood and secondary lymphoid organs, such as lymph nodes and bone marrow. The bi-directional communication of CLL cells with the microenvironment, constituted of immune and stromal cells, is crucial for tumor development and maintenance. Also, tumor cells shape the microenvironment to their advantage leading to an altered trafficking and enhanced CLL cells retention within lymph nodes and bone marrow. As part of the education induced by CLL cells to stromal cells, we describe a metabolic reprogramming that increases stromal glycolysis to produce lactate that can be metabolized by CLL cells, known for their scarce use of glucose as C source to produce cellular energy. Lactate increases survival of CLL cells and the BCR signalling response. In addition, we show that lactate favours CLL B cells expansion in cultures over chick embryo chorioallantoic membrane (CAM), suggesting that this metabolite generates a microenvironment proficient to tumour development. Interference with lactate metabolism by inhibition of its transporter increases CLL cell apoptosis and opposes to the BCR-dependent

apoptosis inhibition. These findings demonstrated that lactate could represent an interesting metabolic vulnerability in CLL that can be targeted as an alternative therapeutic strategy.

## Introduction

The cross-talk of tumor cells with their microenvironment has become a major area of research as it is central to the tumor bulk expansion and maintenance. In chronic lymphocytic leukaemia (CLL), the isolation of tumor B-cells lead to their rapid apoptosis *in vitro* in absence of a supportive feeder layer of stromal or other immune cells<sup>1</sup>. The communication between CLL cells and the surrounding cells passes through direct contact and soluble factors that regulate signalling pathways to increase the survival and activity of tumor cells<sup>2</sup>. Ibrutinib and latest derivatives, such as Acalabrutinib and Zanubrutinib, represent one of the main current strategies of treating CLL, whereby the dialogue CLL-microenvironment is interrupted causing the release of tumor cells into the blood<sup>3,4</sup>. In addition to the support that the microenvironment offers to CLL cells, tumor cells modify the microenvironment to their advantage<sup>5,1</sup>. Sign of this education is a structural disorganisation of the lymph nodes, one of the major sites of CLL cells accumulation, together with the bone marrow, and preferred location of proliferation<sup>6,7</sup>. Lymph nodes, invaded by CLL cells, lose the definition of the germinal centres (GC) where B and T cells encounter to organize the immune response. Also, the stroma, composed of fibroblastic reticular cells (FRC) and Follicular Dendritic cells (FDC) is reorganised as FDC are not detected and FRC lose their characteristic morphology that offers a support to the immune cells nodal trafficking<sup>8,9</sup>. Monocytes derived Nurse-like cells (NLC) contribute to the retention and support to the tumor bulk by acquiring the capacity of secreting chemokines such as CCL21 and displaying markers of M2 macrophages, known to be pro-tumoral<sup>8</sup>. Modifications of the stroma are evidenced even in simple co-cultures model systems, used to mimic the microenvironment<sup>10</sup>. Although, co-cultures with bone marrow derived stromal cells (BMSC), are closer to the medullar microenvironment, the BMSC high degree of plasticity can be employed to model the reprogramming of the stromal component of the microenvironment. Such models showed that BMSC acquire cancer associated fibroblasts (CAFs) properties when in co-culture with CLL cells<sup>11,12</sup>. The regulation of signalling pathways such as NF- $\kappa$ B generate an inflammatory microenvironment known to support CLL cells survival<sup>5</sup>. In addition, the remodelling of the extracellular matrix (ECM), a typical feature of CAFs contribute to explain

the structural nodal disorganisation and likely the altered trafficking of CLL cells between the blood and the LN or BM <sup>9,12</sup>.

In this manuscript, we focused on the metabolic reprogramming of stromal cells under the influence of CLL cells. We found that glycolysis is increased in stromal cells when co-cultured with CLL cells to produce metabolites to fuel the survival of tumor cells. The metabolic features of CLL cells have been explored in several works showing that these cells do not rely on glycolysis as major source of cellular energy <sup>13</sup>. Glutamine and fatty acids are very important C sources that feed the TCA and OxPhos for energy production <sup>14</sup>. In this work we show that CLL cells enhance stromal glycolysis to produce lactate that can be utilized by tumor cells to fuel their own metabolism. Lactate contributes to CLL cell expansion in the chick embryo chorioallantoic membrane patient-derived xenograft (CAM-PDX) model revealing to be an important metabolite in the cross-talk with the microenvironment. In addition, interference with lactate metabolism by inhibition of its transporter resulted in CLL cell apoptosis in presence or absence of BCR stimulation.

## Results

### 1. Transcriptional reprogramming of stromal cells by CLL cells

The bidirectional communication between tumor cells and the stroma affects both elements : the tumour gains a survival advantage, while the stromal component undergoes a molecular reprogramming that, in turns, supports the development of the tumor <sup>1,5</sup>. Establishing co-cultures of CLL cells with stromal cells provides a straightforward model to reproduce the molecular cross-talk between tumor cells and the microenvironment <sup>10</sup>.

To assess the transcriptional impact of CLL cells on stromal cells, we performed RNA sequencing (RNA-seq) using a co-culture model comprising primary CLL cells or the cell line Mec-1 with the bone marrow stromal cell lines (HS-5). The two cell types were separated by a transwell membrane to avoid the mixing of the transcriptomes. **Figure 1A** shows a heatmap comparing the normalized expression of transcripts significantly dysregulated in HS-5 mono-culture versus co-cultures with CLL cells purified from 6 different patients' samples. The results of co-cultures with the CLL cell line Mec-1 cells are shown in **Supplementary Figure 1A** and

**1B.** Despite variability due to the heterogeneity, distinct transcriptional profiles can be distinguished between co-cultures and HS-5 mono-cultures.

Setting a cutoff of 1.5-fold change, the volcano plot in **Figure 1B** highlights 107 transcripts down-regulated and 80 upregulated in stromal cells following co-culture with primary CLL cells. Among the most up-regulated genes, *GPAM* encodes a glycerol-3-phosphate acyl transferase involved in the synthesis of glycerophospholipids<sup>15</sup>. *CYP11B1* encodes a monooxygenase involved in the lipids and cholesterol biosynthesis<sup>16</sup>. *BTG1* is an anti-proliferative factor that regulates cell proliferation and differentiation<sup>17</sup>.

Gene set enrichment analysis (GSEA) further clustered the dysregulated transcripts (**Figure 1C and D**), showing signalling pathways most affected by co-cultures. Inflammatory response pathways, such as those linked to TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B or IL-6 signalling are highly enriched in the stromal component by the co-culture as previously reported. Interestingly, metabolism related pathways such as glycolysis are also enriched together with mTORC1 signalling pathways, a major metabolic signal transducer (**Figure 1D**). Interestingly, similar GSEA results were obtained from HS-5 cells co-cultured with Mec-1 cells (**Supplementary Figure 1C, D**). To validate these findings, we performed RT-qPCR on human mesenchymal stromal cells (MSCs) from healthy donors (n=4) cultured alone or with Mec-1 cell line to confirm upregulation of several genes identified in the RNA-seq. Those targets are relevant in the cross-talk of stromal with CLL cells, such as *CXCL8* and *CXCL3* secreted by several elements of the tumor microenvironment, they favour the tumoral immune escape<sup>18, 19</sup>. *ICAM1*, *PIMI*, *TNFRSF1B* and *NFKB2*, all related to NF- $\kappa$ B signalling pathway, are known to be modulated by CLL cells in the stromal compartment and play a crucial role in tumor cells survival<sup>5, 20, 21</sup>. *ENO2*, encoding a glycolytic enzyme, reflects the increase glycolytic flux that we further characterized later in this work.

Overall, co-culture with CLL cells induces a reprogramming of the stromal compartment, to generate an inflammatory supportive environment accompanied by a metabolic reshaping that was further explored in the next sessions.

## 2. Proteomics analysis confirms metabolic reshaping of stromal cells upon co-culture

In parallel with the transcriptomic analysis, we conducted a proteomic screening to identify proteins regulated in HS-5 cells following co-culture with CLL cells line Mec-1. Overall, applying a fold change  $>2$  and adjusted p-value  $< 0.05$ , we identified 738 upregulated and 270 downregulated proteins (**Figure 2A and Supplementary Figure 2A**). As observed in the RNA-seq data, GSEA analysis revealed that metabolic pathways such as fatty acid metabolism and glycolysis are highly represented even in the differential proteome. (**Figure 2B**). Similarly, key metabolic regulators, such as mTORC1 signaling, clustered several upregulated hits, underscoring the metabolic reprogramming of stromal cells in response to co-culture.

We then integrated transcriptomic and proteomic datasets obtained from HS-5 cells cultured alone or with Mec-1 cell line. As shown in the heatmap (**Figure 2C**), this integration enables visualization of concordant and divergent expression profiles at both the transcript and protein levels. Each column corresponds to a sample, annotated by condition (HS-5 or HS5-Mec) and omics type (RNA or protein), while each row represents a gene or protein differentially expressed in at least one of the 2 datasets. Altogether, we found the two sets of data overlapped to a large extent with 18 hits upregulated both at the transcript and protein levels and 46 were downregulated (**Figure 2D and 2E**). Among the upregulated hits, four belonged to metabolic pathways, i.e. IDH2, HK2, GFPT2 and PGM1. At the exception of IDH2, which participates to the TCA, the other three enzymes are involved in the metabolism of sugars, either directly in glycolysis (HK2) or in pathways that indirectly affecting glycolytic flux (PGM1 and GFPT2)<sup>22,23</sup>. Altogether, the network enrichment of the 18 upregulated genes and proteins highlights their pivotal roles in metabolic pathways (**Figure 2E**).

Moreover, three out of these hits are implicated in ECM remodeling, i.e. PLOD1 and P4HA2, enzymes involved in collagen metabolism and LGAL3(Galectin 3), a protein mediating cell adhesion and cell interaction with the ECM<sup>24</sup>. As mentioned earlier, ECM remodeling and altered stromal interactions are a common feature in the reprogramming of the microenvironment by tumor cells, especially in the differentiation of stromal cells into CAFs<sup>9</sup>. Overall, the integrated transcriptomic and proteomic data sets convey at indicating a metabolic reprogramming of stromal cells upon co-culture, hinting to a higher glycolytic flux.

### 3. Analysis of metabolic parameters in HS-5 cells in presence of CLL cells

To further explore the metabolic reprogramming of the stromal component, we measured the metabolic activity by the MTS assay, which measures the reduction of the tetrazolium salt to formazan, reflecting mainly the mitochondrial activity. As shown in **Figure 3A**, upon a 24 hours culture in the presence of conditioned medium issued from Mec-1 cells culture, or direct contact with either Mec-1 cells or CLL primary cells, the relative MTS signal in HS-5 cells alone significantly increased compared to HS-5 monoculture (**Figure 3A**). However, in the same time period, the number of HS-5 cells decreased in the co-culture condition, suggesting that the increased metabolic in response to CLL cells does not enhance the proliferation of stromal cells (**Figure 3B**). To further investigate the metabolic response of HS-5 to CLL cells, we used the Seahorse technology to measure the glycolytic flux, inferred from the extracellular acidification rate of the medium and (ECAR) and the O<sub>2</sub> consumption rate (OCR) as an indicator of oxidative phosphorylation (OxPhos) (**Supplementary Figure 2A**). To ascertain that the acidification and O<sub>2</sub> consumption reflected only stromal cells metabolic performance, the experiments were conducted with HS-5 cells exposed for 24 hours to CLL conditioned medium.

The analysis showed that CLL cells increased the glycolytic rate of HS-5 cells (**Figure 3C** and **3E**) and, simultaneously, enhanced maximal respiration and spare respiratory capacity (SPR). The latter parameter is a measure of the cellular response to metabolic stress, which corresponds to the cellular adaptation to a higher metabolic requirement<sup>25</sup>. Similar results were obtained by incubation of primary MSC cells 24 hours with conditioned medium from Mec-1 cells. (**Figure 3D** and **3F**).

As the ATP yield, determined by subtracting the OCR after inhibition of the complex V (ATP synthase) via oligomycin injection from the basal OCR remained unchanged, we analyzed the production of reactive oxygen species (ROS), which are mainly produced in the process of respiratory chain as byproducts of an incomplete O<sub>2</sub> reduction<sup>26</sup>. In the presence of both CLL or Mec-1 cells, HS-5 produced a higher amount of ROS indicating increased stromal oxidative stress caused by the presence of tumor cells<sup>27, 28</sup> (**Figure 3G**). In addition, using Mitotracker to label active mitochondria, we also found an increased signal confirming the higher mitochondrial activity of HS-5 cells in presence of CLL cells (**Figure 3H**).

Overall, these results demonstrate that CLL cells enhance stromal cell metabolism without increasing their proliferation rate. The higher metabolic rate likely favors the production of metabolites that support CLL cells survival or metabolic performance.

#### 4. Lactate produced by stromal cells can be consumed by CLL cells

The catabolic pathway glycolysis consumes glucose to produce pyruvate, which integrates the tricarboxylic acid (TCA) cycle upon oxidative decarboxylation to Acetyl-CoA. Alternatively, for a rapid ATP production or in limiting condition of O<sub>2</sub>, pyruvate is reduced to lactate that can be secreted in the cellular medium. To assess metabolic changes associated with enhanced glycolysis in HS5 cells co-cultured with CLL cells, we measured the levels of glucose and lactate by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in 24 hours co-cultures of primary CLL cells and stromal cells. **Figure 4A** and **4B** shows the concentrations of glucose and lactate in the media (RPMI+10% FBS) without cells, in HS-5 cell monoculture, CLL cell monoculture or in co-culture. As previously reported, CLL cells alone did not consume glucose in contrast to HS-5, whose medium showed a decrease in the amount of glucose<sup>14</sup>. In the co-culture conditions, the consumption of glucose was significantly increased by HS-5 cells, as evidenced by a greater decrease in glucose levels compared to HS5- monocultures (**Figure 4A**). The lower glycolytic flux of CLL cells alone was further confirmed by the lower lactate production (**Figure 4B**). However, in the co-culture conditions, despite higher glycolysis in HS-5 cells, the lactate level remained unchanged, suggesting that lactate could be consumed by the cell. As CLL cells showed weak propensity to use glucose, they may instead take up lactate to bypass glycolysis and fuel the TCA and OxPhos.

Thus, we evaluated whether CLL cells are able to uptake lactate from the culture medium. We incubated CLL cells with 10 mM <sup>13</sup>C-lactate and observed a significant decrease in labeled lactate upon 24- and 48-hours cultures (**Figure 4C**). Next, we investigated the capacity of HS-5 cells to feed CLL cells with lactate. As shown in the workflow in **Figure 4D**, HS-5 cells were incubated with <sup>13</sup>C-glucose for 48 hours, allowing the production of labeled lactate, which accumulated in the conditioned medium. This medium was then used to culture primary CLL cells from 6 patients. Upon 24 hours, the <sup>13</sup>C-lactate was measured in the culture medium (**Figure 4E**). The decrease of <sup>13</sup>C-lactate in the CLL cultures as compared to the HS-5 conditioned medium indicated the capacity of tumor B-cells to take up stromal-derived lactate. Furthermore, the capacity of stromal cells to export lactate was verified by the protein expression of monocarboxylate transporter 4 (MCT4), which preferentially facilitates the export of lactate over its import<sup>27</sup>. HS-5 cells express MCT4, and its level appeared increased in presence of some primary CLL cells, although this observation was less pronounced in presence of HG-3 CLL cell line (**Figure 4F**).

Overall, these findings demonstrate that stromal cells express transporters enabling lactate secretion in the medium, and CLL cells are capable of import this metabolite, likely used to support their metabolic and functional purposes.

## 5. Functional role of lactate in CLL cells

Given that CLL cells are capable of consuming lactate, we next explored their ability to utilize it as a metabolic fuel. Lactate is metabolized to pyruvate by lactate dehydrogenase (LDH) and imported into the mitochondria where, upon oxidative decarboxylation to Acetyl-CoA, enters the TCA followed by OxPhos to produce energy as ATP. Accordingly, we incubated primary CLL cells (n=6) with increasing concentrations of lactate for 24 hours and observed a significant increase in the MTS signals, supporting the role of lactate in enhancing the metabolism and survival of these cells (**Figure 5A**).

To explore further this increase of cell survival, we analyzed the transcription of several genes known to be involved in CLL cells survival, such as *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL1- $\alpha$*  and *c-myc*. None of these genes resulted to be significantly enhanced by lactate treatment, except for *c-myc* which is known as a major metabolism regulator and also target of the BCR signaling<sup>29</sup>. (**Figure 5B**). Indeed, among the signals from the microenvironment, the BCR dependent response is recognized as one of the most prominent regulator of cell survival in CLL<sup>7,30</sup>. The antigenic response activates a series of kinases and culminates with the transcription of pro-survival genes. As shown in **Figure 5C**, BCR stimulation with anti-IgM antibodies for 15 and 30 minutes induced higher levels of phosphorylated BTK and ERK in HG-3 cells treated with lactate compared to untreated controls. These kinases serve as markers of early and late effectors in the BCR signaling cascade, respectively. This result indicates that lactate can potentiate BCR signaling. The pro-survival role of lactate was also confirmed by the increase of apoptosis when CLL cells are treated with an antibody against SLC5A12, a lactate transporter. As expected, BCR stimulation decreases apoptosis, and this effect was enhanced in presence of lactate (**Figure 5D**). In addition, treatment anti-SCL512A increases apoptosis in all conditions tested, i.e. presence or absence of lactate and upon BCR stimulation. Moreover, pre-treatment of the cells with anti-SLC5A12 reduced the phosphorylation induced by BCR stimulation, demonstrating the specific role of lactate import in potentiating BCR signaling (**Figure 5E**).

Finally, to further investigate the functional role of lactate on the CLL cells survival, we employed a xenograft model using the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM)<sup>31</sup>. Primary CLL cells from a patient were engrafted directly onto the CAM of 9-day-old chicken embryos, and tumor formation from patient derived xenograft (PDX) were collected, weighted and analyzed by flow cytometry at day 16. In parallel, 10 mM lactate was applied every 2 days to the engrafted cells (**Figure 5F** and **5G**).

Although the overall tumor weight was unchanged by lactate treatment, the abundance of CD19 positive cells was significantly higher in the lactate-treated tumors, indicating enhanced survival of tumor cells in presence of this metabolite and confirming its supportive role in CLL cell survival (**Supplementary Figure 3** and **Figure 5H**).

Overall, these data indicate that lactate contributes to generate a microenvironment proficient for CLL cell survival by enhancing BCR signaling response and, strengthening the exchanges with the surrounding cells.

## **Discussion**

The cross-talk of CLL cells with the microenvironment is crucial for the development and maintenance of the tumor bulk as it regulates tumor cell proliferation, survival and retention<sup>32</sup>. CLL cells proliferate mainly in the lymph node but consistent accumulation of tumor cells can also be observed in the bone marrow. In the microenvironment, CLL cells entail contact with other immune cells and the stromal component that provide soluble factors for tumor cell survival by activating pro-survival signaling such as the BCR, CD40L, Notch, among others. All these transduction pathways regulate the transcription of pro-survival genes such as anti-apoptotic agents, e.g. Bcl-2, pro-survival cytokines, e.g. IL-6 and enhance the metabolic response<sup>13</sup>. CLL cells do not rely on glucose consumption and glycolysis as much as they feed on fatty acids and glutamine metabolism used as C source to fuel energy production but also the anabolism<sup>14</sup>. Signals received from the microenvironment, mimicked by BCR and CD40 stimulation, causes a metabolic reprogramming of CLL cells that increase further consumption of glutamine and mitochondrial activity<sup>14,33</sup>. In this manuscript, we show that CLL cells cause an increase of metabolism in the stromal compartment, reproduced by the co-culture of primary cells with a stromal cell line, HS-5. As a results of CLL co-culture, stromal cells induce the transcription of genes and the translation of proteins involved in glycolysis and fatty acids metabolism. The acidification of the culture medium of HS-5 cells exposed for 24h to CLL cell conditioned medium, along with the increased OCR, further demonstrates the increase of the

metabolic rate, involving both glycolysis and mitochondrial activity in these cells. Surprisingly, the increase in metabolism does not coincide with enhanced proliferation of HS-5; instead, it is associated with a decrease. This suggests that the higher metabolic rate could be used to produce metabolites at the advantage of CLL energy intake. It is known that CLL cells are fond of glutamine, although we show in this work that they can also use lactate. Increase of lactate in the tumor microenvironment is well documented as the result of the Warburg effect, which is the increase of aerobic glycolysis typical of cancer cells<sup>34</sup>. Lactate increase is responsible for the generation of a tolerogenic environment by suppressing the immune response against cancer cells, thus promoting tumor expansion<sup>35</sup>. This is partly due to the capacity of Tregs and the pro-tumoral M2 macrophages to metabolize lactate and expand in a lactate-rich microenvironment<sup>36,37</sup>. However, the capacity of tumor cells to increase glycolysis of the stromal component has been defined as the “Reverse Warburg effect” and it has been associated with the differentiation of stromal cells into CAFs<sup>38</sup>. This process associates with a metabolic switch in the stromal compartment characterized by increased glycolysis and ROS generation and it is promoted by TGF- $\beta$  signaling<sup>39,40</sup>. The involvement of TGF- $\beta$  signaling in our model is supported by the transcriptomic data analysis, whereby TGF- $\beta$  signaling ranked high in the clustering of upregulated genes. Furthermore, CLL cells are known to secrete high level of TGF- $\beta$  that can contribute to reshape the tumor microenvironment and favor CAFs differentiation<sup>41</sup>.

The capacity of CLL cells to use lactate is demonstrated by the MTS assay and the enhancement BCR signaling. The latter is shown by the increase of phosphorylation of BTK and ERK and the induction of *c-myc*, one of the major targets of this signaling pathway that regulates survival and metabolic response. In addition, inhibition of lactate import affects cell survival both in presence or absence of BCR stimulation. These results support the exploration of interfering with lactate metabolism to control CLL cells expansion.

Further proof of the benefit exerted by lactate on CLL development is demonstrated by the higher CD19+ cells retrieved in the CAM system upon 7 days of culture. This technology has been used for decades as a valid method to generate PDX on chick embryo chorioallantoic membrane that is vascularized and benefit from the chick’s lymphatic system during the embryonic development<sup>31</sup>. It represents an elaborated alternative to simple co-cultures systems as more cell types are at play to recreate the dialogue of tumor cells with the microenvironment<sup>42</sup>. In this context, lactate-dependent expansion of CLL cells could be the result of an increased vascularization or expansion of other chick’s cells that in turn support CLL cell survival.

Therapeutically, our findings suggest that lactate metabolism represents a targetable vulnerability in CLL. While current treatments predominantly focus on BCR signaling inhibition (BTK inhibitors such as ibrutinib, acalabrutinib, or zanubrutinib) or the mitochondrial apoptotic pathway (BCL-2 inhibition by venetoclax), the lactate enhancement of BCR signaling might be targeted in combinatorial approaches against signaling pathways and metabolic processes. Similar approaches are already being explored in other B-cell malignancies, notably with AZD3965, an MCT1 inhibitor currently undergoing phase I clinical trials in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) <sup>43</sup>. This strategy aims to induce metabolic stress by blocking lactate transport, thereby limiting the ability of tumor cells to sustain energetic homeostasis. Other potential targets, such as LDHA, could also be investigated to further restrict intracellular lactate utilization. By disrupting the permissive metabolic microenvironment of CLL, inhibition of lactate transport or metabolism may enhance the efficacy of targeted therapies, mitigate resistance, and promote tumor cell apoptosis.

## **Materials and Methods**

### **Cell Cultures**

The primary CLL B cells were collected from patients after receiving informed consent during routine workup at the Avicenne Hospital (APHP, Bobigny, France). All patients gave written consent, validated by the Ethics Committee of the Avicenne Hospital in accordance with the Declaration of Helsinki. The information on the patient samples used in this manuscript is summarized in Supplementary Table 1. Primary CLL B cells were isolated from fresh blood samples using the Pan B Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech, Teterow, Germany) according to the manufacturer's instructions. The isolated B cells were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco), cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> or stored frozen in liquid nitrogen in a medium containing of 10% DMSO in FCS.

Mec-1 and HG-3 cells were purchased from DSMZ (Berlin, Germany) and cultured as described for the primary tumor B cells. HS-5 cells were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) and cultured as described for the primary tumor B cells.

Human mesenchymal stromal cells (h-MSC) were derived from BM samples and separated from other hematopoietic cells through their plastic adherence after 2-3 weeks of in vitro culture. Bone marrow (BM) samples were obtained from patients, free of hematological disease

and coming to the Orthopedic and Trauma surgery Department of Lariboisiere Hospital (Paris, France) for a total hip replacement surgery. All the patients provided written informed consent, in accordance with the Helsinki Declaration. Approval from the Institutional Review Board Paris-Nord was obtained before the use of the clinical materials for research purposes. Mononuclear cells were purified from the BM or blood samples with a Ficoll gradient (Pancoll Human, PAN-BIOTECH). H-MSC were then expanded in  $\alpha$ MEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma), 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (Gibco). When the h-MSC reached 80-90% confluence, the cells were detached with Trypsin (Gibco) and cryopreserved before use. Four different h-MSCs were used in this study.

In co-culture experiments, HS5 stromal cells and B-CLL cells were cultured in a Transwell system (0.4  $\mu$ m pore size, Corning). HS5 cells were seeded in the lower chamber 24 hours prior to co-culture to allow adherence. B cells were added to the upper chamber at a stromal:B cell ratio of 1:10, unless otherwise specified. When conditioned media was used HS5 cells were incubated with media previously issued from a 24 hours CLL cells culture. Sodium DL-lactate (Sigma-Aldrich, Cat. No. L4263) was diluted in complete medium and used at a final concentration of 10 mM for variable durations. To activate B cell receptor (BCR) signaling, anti-IgM antibodies (Jackson ImmunoResearch) were applied either in soluble form (10  $\mu$ g/ml) or as plate-bound stimuli (20  $\mu$ g/ml), depending on the specific experimental design. Anti-SLC5A12 antibody was used at a 1:500 dilution to inhibit the lactate transporter (#PA5-110389, Invitrogen).

### **RNA sequencing Library preparation and sequencing**

RNA-seq libraries were prepared using the Ion Ampliseq Transcriptome Human Gene expression kit (Thermo Fisher Scientific), following the manufacturer's instructions. All library preparation steps were performed automatically using the Ion Chef System. Briefly, for each sample, 10 ng of total RNA was reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA), followed by target amplification and barcoding using two primer pools designed to detect 20,802 transcripts, covering more than 95% of the human RefSeq transcriptome. Each pair targets a specific region of the transcript, generating a simple amplicon per gene corresponding to the exon shared by multiple isoforms. The resulting amplicons are all 150 base pairs in length. After amplification, the barcoded libraries were diluted to 100 pM, pooled, and subjected to emulsion PCR, before being loaded onto an Ion 540 chip and sequenced using the Ion S5 XL Semiconductor Sequencer (Thermo Fisher Scientific). In total, approximately 80 million reads

were generated per chip, corresponding to about 10 million reads per samples for an 8-sample run.

### **Proteomic Analysis by Label-Free LC-MS/MS**

The cells were collected and washed three times in PBS. Then 200 $\mu$ L of the solubilization solution (urea 7 M, thiourea 2 M, CHAPS 4% w/v, NP-40 0.5% w/v and the protease inhibitor Mix from GE Healthcare) were added. After incubation for 1 h and sonication for 30 min, both on ice, the lysate was centrifuged at 150,000 $\times$ g for 30 min at 10°C, and the supernatant (protein sample) was collected. Protein concentrations were determined using the 2D Quant kit (GE Healthcare). For enzymatic digestion, 25  $\mu$ g of proteins were recovered in 25 mM ammonium bicarbonate buffer. Proteins were then reduced with 20 mM DTT for 45 min, alkylated for 30 min with 55 mM iodoacetamide, precipitated in ice-cold acetone/methanol (8:1), and finally digested by trypsin overnight at 37°C. After digestion, peptide samples were diluted to a concentration of 1  $\mu$ g/ $\mu$ L. The digests (5  $\mu$ g) were desalted by StageTips prepared manually (3 layers of C18 phase stacked in a P10 cone). The peptide samples were analyzed quantitatively by “Label Free” mass spectrometry on a timsTOF Pro type instrument (Bruker) equipped with PASEF technology, upstream of which is coupled liquid nano-chromatography (nanoElute, Bruker) using a nano column C18 (IonOpticks, 75  $\mu$ m ID, 25 cm, 1.6  $\mu$ m). This column made it possible to separate the peptides from the complex sample according to their hydrophobicity on an increasing gradient of acetonitrile (3-32%) of 100 min. Each sample was analyzed three times in a row in the same way. The mass spectrometry data of the “Control” and “Treated” samples were then analyzed using the MaxQuant software (1.6.5.0 version) At the end of the analysis, a table was generated with the name of the identified proteins and their normalized intensities in each sample. This table was then analyzed by the ProStar package (1.16 version) to compare the mean intensities of each protein between the 2 “Control” and “Treated” groups. Partially missing data in a group were imputed by the Structured Least Squares Algorithm (SLSA) method, totally missing data in a group were imputed by a minimum value calculated by the DetQuantile method. A Limma statistical test was used to compare the mean protein intensities between the 2 groups. A post-hoc correction (Adaptive Benjamini Hochkberg) was applied to estimate the p-value threshold for which the false positive rate (FDR) does not exceed 1%. Only the proteins having a p-value < 0.01 and presenting a ratio > 1.5 were retained.

### **Bioinformatics analysis**

The process of transcriptomic data and creation gene quantification matrices from FASTQ and BAM files was done by Galaxy (v22.05). DESeq2 and limma were used to perform differential

expression analysis in R (v4.3.1), with thresholds of  $|\log_2FC| > 0.5$  and adjusted p-value  $< 0.05$ . After being processed with MaxQuant and acquired by label-free mass spectrometry (timsTOF Pro), proteomic data was treated with Student's t-test with thresholds of  $|\log_2FC| > 1$  and adjusted p-value  $< 0.05$ . Venn diagrams, heatmaps, volcano plots, and PCA were all used in the visualization. Overlapping differentially expressed genes were found by cross-omics integration, and these were then examined using functional enrichment (clusterProfiler, ReactomePA, GSEA) to reveal common dysregulated pathways at the transcriptome and proteomic levels.

### **Cell Survival and Apoptosis Analysis**

The MTS assay (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega, Cat. No. G3581) relies primarily on the activity of the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase, which reduces the MTS tetrazolium compound to a formazan product. Cells were seeded in 96-well plates at appropriate densities depending on the experimental conditions. After treatment, 20  $\mu\text{L}$  of MTS reagent was added directly to each well containing 100  $\mu\text{L}$  of culture medium, and cells were incubated at 37 °C in 5%  $\text{CO}_2$  for 1–4 hours, depending on the cell type and treatment. Absorbance was measured at 490 nm using a microplate reader (Thermo Scientific Multiskan™ FC). All conditions were tested in triplicate, and background absorbance from media-only wells was subtracted. Results were expressed as either an MTS reduction signal normalized by control or as a percentage of control.

Cell proliferation was assessed using the Trypan Blue exclusion assay. After cocultures, stromal cells were harvested and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). An equal volume of 0.4% Trypan Blue solution, freshly prepared in-house using sterile conditions, was mixed with the cell suspension (1:1 dilution). Viable (unstained) and non-viable (blue-stained) cells were counted manually using a Malassez counting chamber under a light microscope. Cell counts were performed in duplicate for each condition, and total viable cell numbers were calculated. Results were expressed as absolute viable cell counts.

Cell apoptosis was assessed using flow cytometry (FACSCanto™ II Becton Dickinson) on purified primary CLL cells using Annexin V-FITC and propidium iodide staining (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Percentage of apoptosis corresponded to % of annexin V-positive cells, including PI-negative and PI-positive cells. All measurements were done in duplicate.

### **Seahorse Metabolic Flux Analysis**

Extracellular oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were measured using a Seahorse XFp Analyzer according to the manufacturer's instructions. All reagents and compounds were obtained from Agilent Technologies.

One day prior the experiment,  $2 \times 10^5$  HS-5 cells or primary human MSCs were seeded into each well of an 8-well Seahorse Microplate. Cells were incubated overnight with conditioned media prepared from  $5 \times 10^6$  primary CLL cells or  $2 \times 10^6$ , cultured for 24h in RPMI supplemented with 10% FBS. On the day of the assay, the culture medium was replaced by a complete Seahorse media (XF DMEM supplemented with 2 mM glutamine, and 1 mM pyruvate). OCR and ECAR were assessed using the Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (Agilent Technologies). Oxygen consumption was recorded under basal conditions and after sequential injections of oligomycin at 1 mM (an ATP synthase (complex V) inhibitor), FCCP at 1.5 mM rotenone at 100 nM + antimycin A at 1 mM. Basal respiration was calculated as the difference between basal OCR and the OCR after the addition of rotenone and antimycin A. Maximal respiration was defined as the difference between the OCR after FCCP injection the OCR after rotenone and antimycin A. Spare respiratory capacity was calculated as the difference maximal and basal OCR. ATP-linked respiration was determined by subtracting the OCR after oligomycin injection from the basal OCR. Glycolysis function was evaluated in the same experiment. Glycolysis was calculated as the increase in ECAR following glucose injection relative to basal ECAR. Glycolysis capacity was determined by the difference between ECAR after oligomycin injection and basal ECAR.

### **ROS and Mitochondrial Mass Analysis (Flow Cytometry)**

Intracellular total ROS levels were measured using the Total Reactive Oxygen Species (ROS) Assay Kit 520 nm (Invitrogen, Cat. No. 88-5930), following the manufacturer's instructions. After coculture, cells were collected, washed, and incubated with the ROS detection reagent provided in the kit at 37 °C for 60 minutes in the dark. Following ROS staining, cells were washed and subsequently labelled with antibodies against CD90 (anti-CD90 BUV395, BD Biosciences, Cat. No. 563804) and CD19 (Anti-CD19 BV786, BD Biosciences, Cat. No. 563325) to distinguish stromal (CD90<sup>+</sup>) and CLL (CD19<sup>+</sup>) populations, respectively. Staining was performed at 4 °C for 20 minutes in the dark, followed by washing and resuspension in PBS for acquisition. Cells were analyzed using a BD FACS Symphony A3™ flow cytometer, and the mean fluorescence intensity (MFI) of the ROS signal (FITC channel, excitation/emission: ~488/520 nm) was quantified in the CD90<sup>+</sup> gated populations. Data were

processed using FlowJo software (v10 or later). At least 10,000 events were collected per sample. Mitochondrial content was assessed using MitoTracker™ Green FM (Invitrogen, Cat. No. M7515), which accumulates in mitochondria independently of membrane potential. After transwell cocultures, stromal cells were incubated with 50 nM MitoTracker Green FM in complete growth medium at 37 °C for 30 minutes, protected from light. Following staining, cells were washed, resuspended in PBS, and immediately analyzed by flow cytometry. Mitochondrial mass was quantified based on FITC channel MFI (excitation/emission: ~490/516 nm). Cells were analyzed using a BD FACS Symphony A3™ flow cytometer, and data were analyzed with FlowJo software (v10 or later). At least 10,000 events were collected per sample, and dead cells and debris were excluded based on forward/side scatter properties.

### **mRNA Quantification by qRT-PCR**

Total RNA was extracted with Trizol and purified with RNeasy Mini kit (Qiagen) by a Qiacub extractor (Qiagen, Les Ulis, France). At least 500 ng of total RNA were retro-transcribed with iSCRIPT (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. The expression of c-myc using TaqMan Gene Expression Assays probes (ThermoFischer Scientific, Courtaboeuf, France) (MYC Hs00153408\_m1) on a 7500 Real-time PCR system (Life Technologies Saint-Aubin, France). Target gene expression was normalized to the mean Ct values of the housekeeping gene GAPDH (Hs02786624\_g1), then normalized to unstimulated control cells to determine the fold change. Relative fold change expression was calculated by the  $\Delta\Delta C_t$  method and the values are expressed as  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . All points were performed in duplicate.

To check the expression of upregulated genes identified in the RNA-seq, a custom PCR array of 32 genes was design to assess the expression of the selected transcripts in MSC cells. The PCR array was design and analyze using the RT2 profiler PCR system kit (ID 330231, QIAGEN). The targeted transcripts included: CSF2, NAMPT, ICAM1, IRF2BP2, IL1A, ENO2, DUSP5, TGFB1, IL6, GAPDH, PIM1, NF2, TNFAIP3, CCN2, CXCL5, PPC, CXCL8, FYN, EGR1, CXCL3, IL1B, SOD2, HPRT1, JUNB; NFKBIZ, ITGA2, NFKB2, TNFRSF1B, CSF3, HGDC, DUSP1, RTC. Target gene expression was normalized to the mean Ct values of the housekeeping gene GAPDH, then normalized to unstimulated control cells to determine the fold change. Relative fold change expression was calculated by the  $\Delta\Delta C_t$  method and the values are expressed as  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . All points were performed in duplicate.

## Western Blot Analysis

Total protein extracts were prepared from CLL cells (primary or Mec-1) and HS5 stromal cells following stimulation (5 to 30min for both Lactate and anti-IgM) or co-culture (24h). Cells were lysed using a non-denaturing lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% glycerol) supplemented with a protease and phosphatase inhibitor cocktail (10 mM Orthovanadate, 10  $\mu$ M NaF, 10  $\mu$ g/mL Aprotinin, 5  $\mu$ g/mL Leupeptin, 1  $\mu$ g/mL Pepstatin, 0,1M PMSF). Protein concentration was determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), and absorbance was measured using a microplate reader (Thermo Scientific Multiskan™ FC).

Equal amounts of protein (30 $\mu$ g) were resolved on pre-cast 10% or 4-15% SDS-PAGE gels (Bio-Rad), transferred to nitrocellulose membranes, and processed for immunoblotting using standard procedures. Membranes were blocked in 5% BSA in TBS-Tween and incubated with specific primary antibodies (Table Antibodies) overnight at 4 °C, followed by HRP-conjugated secondary antibodies. Immunoreactive bands were visualized using the Clarity™ Western ECL Substrate and ECL Max (Bio-Rad), and chemiluminescent signals were acquired using the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Antibody dilutions and incubation conditions were optimized according to the manufacturers' recommendations. Densitometric analysis was conducted using Image Lab software (Bio-Rad). Phospho-ERK and total ERK (Cell signaling technology) band intensities were normalized to tubulin. The antibodies that were used in this work were: anti-ERK (Cell signaling technology #9102, 1/1000 dilution) anti-phosphoERK (Cell signaling technology #4370, 1/1000 dilution), anti-BTK (Cell signaling technology, 1/1000 dilution) anti-phosphoBTK (Cell signaling technology, 1/1000 dilution), anti-tubulin (Sigma, #T4026, 1/10000 dilution), anti-Vinculin (Cell signaling technology #13901, 1/1000 dilution).

## NMR Metabolomics Analysis

HS5 cells and primary B-CLL were cultured in six well plate in RPMI supplemented with 10% FBS. In certain experiments, the medium was further supplemented with either [U-<sup>13</sup>C] glucose (Cambridge Isotope Laboratories, #CLM-1396-PK) or [U-<sup>13</sup>C] lactate (Cambridge Isotope Laboratories, #CLM-1579-PK) to enable stable isotope tracing. Culture supernatants were collected after either 24 or 48 hours of incubation, depending on the experimental condition. All supernatants were centrifuged at 13,000 rpm to remove cellular debris and stored at -20°C until NMR analysis.

Supernatants from the culture were prepared as follows: 60  $\mu\text{L}$  of a 10 mM trimethyl-silyl propionate (TMSP) with  $\text{D}_2\text{O}$  solution was added to 540  $\mu\text{L}$  supernatant samples. Solutions were mixed thoroughly, and 550  $\mu\text{L}$  of the mixture was then transferred to 5 mm NMR tubes. NMR experiments were carried out using a Bruker 500 MHz NMR spectrometer equipped with a 5 mm PAQXI probe and a cooled SampleCase (RS232) autosampler, enabling high-throughput data acquisition for large collections of samples. The temperature was controlled at 298K throughout the experiments. Standard 1H 1D NMR pulse sequence nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) with z-gradient (Bruker pulse program noesygppr1d) was applied on each sample to obtain the corresponding metabolic profiles. A total of 64 transient free induction decays (FID) were collected for each experiment with a spectral width of 14 ppm. The relaxation delay was set to 4 s. The 90° pulse length was automatically calibrated for each sample at around 10  $\mu\text{s}$ . The NOESY mixing time was set to 10 ms. The total acquisition time for each sample was 19 min 11 s.

All FIDs were multiplied by an exponential function corresponding to a 0.3 Hz line broadening factor prior to Fourier transformation.  $^1\text{H}$  NMR spectra were manually phased, baselined, and referenced to the TMSP signal ( $\delta = 0$  ppm) using Topspin software version 4.0.5 (Bruker GmbH, Rheinstetten, Germany). Signals at 5.25 ppm ( $\alpha$ -glucose), 4.66 ppm ( $\beta$ -glucose), 1.33 ppm ( $^{12}\text{C}$  signal of lactate carbon 3 and  $^{13}\text{C}$  of lactate carbon 3) and 1.05 ppm (valine) were integrated in order to calculate the metabolite concentrations. Concentrations of glucose and lactate were directly determined by calculation considering the known valine concentration in RPMI medium at 171  $\mu\text{M}$ .

### **Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) model**

Fertilized white Leghorn chicken eggs were purchased from Granja Santa Isabel, S. L. (Córdoba, Spain), and incubated for 9 days at 37°C at 55% humidity. At day 9 of their embryonic development, a window of an  $\sim 2$  cm-diameter was drilled on top of the air chamber of the eggshell. Then, 1 million of primary CLL cells were suspended in 25  $\mu\text{L}$  RPMI medium containing 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and streptomycin, and 25  $\mu\text{L}$  Matrigel. The mix was incubated for 15 minutes at 37°C and subsequently implanted into the CAM of each egg. 10 mM of lactate (day 12 and 14) were administered topically on the tumor-bearing CAMs. Seven days after implantation (day 16), chick embryos were killed by decapitation. Tumors were excised and carefully weighed to determine their mass or analyzed by flow cytometry using a CD45+CD19+ staining to determine the proportion of CLL cells within the tumor derived xenograft.

## Statistical Analysis

For non-omics experiments, statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 8 or higher). Depending on the experimental design, comparisons between groups were conducted using either the paired t-test or the Mann–Whitney U test (for unpaired data). For all tests, a p-value < 0.05 was considered statistically significant. Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM), unless otherwise specified. All experiments were performed in at least three biological replicates unless stated otherwise.

## References

1. Mangolini, M., and Ringshausen, I. (2020). Bone Marrow Stromal Cells Drive Key Hallmarks of B Cell Malignancies. *IJMS* 21, 1466. <https://doi.org/10.3390/ijms21041466>.
2. Gardano, L., Ferreira, J., Le Roy, C., Ledoux, D., and Varin-Blank, N. (2024). The survival grip—how cell adhesion promotes tumor maintenance within the microenvironment. *FEBS Letters*, 1873-3468.15074. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.15074>.
3. Byrd, J.C., Furman, R.R., Coutre, S.E., Flinn, I.W., Burger, J.A., Blum, K.A., Grant, B., Sharman, J.P., Coleman, M., Wierda, W.G., et al. (2013). Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 369, 32–42. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215637>.
4. Tissino, E., Benedetti, D., Herman, S.E.M., Ten Hacken, E., Ahn, I.E., Chaffee, K.G., Rossi, F.M., Dal Bo, M., Bulian, P., Bomben, R., et al. (2018). Functional and clinical relevance of VLA-4 (CD49d/CD29) in ibrutinib-treated chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Experimental Medicine* 215, 681–697. <https://doi.org/10.1084/jem.20171288>.
5. Lutzny, G., Kocher, T., Schmidt-Supprian, M., Rudelius, M., Klein-Hitpass, L., Finch, A.J., Dürig, J., Wagner, M., Haferlach, C., Kohlmann, A., et al. (2013). Protein Kinase C-β-Dependent Activation of NF-κB in Stromal Cells Is Indispensable for the Survival of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells In Vivo. *Cancer Cell* 23, 77–92. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.12.003>.
6. Herishanu, Y., Pérez-Galán, P., Liu, D., Biancotto, A., Pittaluga, S., Vire, B., Gibellini, F., Njuguna, N., Lee, E., Stennett, L., et al. (2011). The lymph node microenvironment

- promotes B-cell receptor signaling, NF- $\kappa$ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* *117*, 563–574. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-284984>.
7. Stevenson, F.K., and Caligaris-Cappio, F. (2004). Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood* *103*, 4389–4395. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4312>.
  8. Zaaboub, R., Vimeux, L., Contremoulins, V., Cymbalista, F., Lévy, V., Donnadieu, E., Varin-Blank, N., Martin, A., and Dondi, E. (2022). Nurselike cells sequester B cells in disorganized lymph nodes in chronic lymphocytic leukemia via alternative production of CCL21. *Blood Advances* *6*, 4691–4704. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006169>.
  9. Vom Stein, A.F., Rebolledo-Rios, R., Lukas, A., Koch, M., Von Lom, A., Reinartz, S., Bachurski, D., Rose, F., Bozek, K., Abdallah, A.T., et al. (2023). LYN kinase programs stromal fibroblasts to facilitate leukemic survival via regulation of c-JUN and THBS1. *Nat Commun* *14*, 1330. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36824-2>.
  10. Adamo, A., Delfino, P., Gatti, A., Bonato, A., Takam Kamga, P., Bazzoni, R., Ugel, S., Mercuri, A., Caligola, S., and Krampera, M. (2020). HS-5 and HS-27A Stromal Cell Lines to Study Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Support to Cancer Development. *Front. Cell Dev. Biol.* *8*, 584232. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.584232>.
  11. Paggetti, J., Haderk, F., Seiffert, M., Janji, B., Distler, U., Ammerlaan, W., Kim, Y.J., Adam, J., Lichter, P., Solary, E., et al. (2015). Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood* *126*, 1106–1117. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-618025>.
  12. Apollonio, B., and Ramsay, A.G. (2015). Exosomes and CAFs: partners in crime. *Blood* *126*, 1053–1055. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-655233>.
  13. Simon-Molas, H., Montironi, C., Kabanova, A., and Eldering, E. (2024). Metabolic reprogramming in the CLL TME; potential for new therapeutic targets. *Seminars in Hematology* *61*, 155–162. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2024.02.001>.

14. Chen, Z., Simon-Molas, H., Cretenet, G., Valle-Argos, B., Smith, L.D., Forconi, F., Schomakers, B.V., Van Weeghel, M., Bryant, D.J., Van Bruggen, J.A.C., et al. (2022). Characterization of metabolic alterations of chronic lymphocytic leukemia in the lymph node microenvironment. *Blood* *140*, 630–643. <https://doi.org/10.1182/blood.2021013990>.
15. Endo, Y., Kanno, T., Nakajima, T., Ikeda, K., Taketomi, Y., Yokoyama, S., Sasamoto, S., Asou, H.K., Miyako, K., Hasegawa, Y., et al. (2023). 1-Oleoyl-lysophosphatidylethanolamine stimulates ROR $\gamma$ t activity in TH17 cells. *Sci Immunol* *8*, eadd4346. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.add4346>.
16. Maguire, M., Larsen, M.C., Vezina, C.M., Quadro, L., Kim, Y.-K., Tanumihardjo, S.A., and Jefcoate, C.R. (2020). Cyp1b1 directs Srebp-mediated cholesterol and retinoid synthesis in perinatal liver; Association with retinoic acid activity during fetal development. *PLoS One* *15*, e0228436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228436>.
17. Hwang, S.S., Lim, J., Yu, Z., Kong, P., Sefik, E., Xu, H., Harman, C.C.D., Kim, L.K., Lee, G.R., Li, H.-B., et al. (2020). mRNA destabilization by BTG1 and BTG2 maintains T cell quiescence. *Science* *367*, 1255–1260. <https://doi.org/10.1126/science.aax0194>.
18. Lin, C., He, H., Liu, H., Li, R., Chen, Y., Qi, Y., Jiang, Q., Chen, L., Zhang, P., Zhang, H., et al. (2019). Tumour-associated macrophages-derived CXCL8 determines immune evasion through autonomous PD-L1 expression in gastric cancer. *Gut* *68*, 1764–1773. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316324>.
19. Bao, Y., Tong, C., and Xiong, X. (2024). CXCL3: A key player in tumor microenvironment and inflammatory diseases. *Life Sci* *348*, 122691. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122691>.
20. Bui, T.M., Wiesolek, H.L., and Sumagin, R. (2020). ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol* *108*, 787–799. <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0220-549R>.
21. Chen, X., Zhou, J., Wang, Y., Wang, X., Chen, K., Chen, Q., Huang, D., and Jiang, R. (2024). PIM1/NF- $\kappa$ B/CCL2 blockade enhances anti-PD-1 therapy response by modulating macrophage infiltration and polarization in tumor microenvironment of NSCLC. *Oncogene* *43*, 2517–2530. <https://doi.org/10.1038/s41388-024-03100-6>.

22. Zhang, W., Bouchard, G., Yu, A., Shafiq, M., Jamali, M., Shrager, J.B., Ayers, K., Bakr, S., Gentles, A.J., Diehn, M., et al. (2018). GFPT2-Expressing Cancer-Associated Fibroblasts Mediate Metabolic Reprogramming in Human Lung Adenocarcinoma. *Cancer Res* 78, 3445–3457. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2928>.
23. Curtis, M., Kenny, H.A., Ashcroft, B., Mukherjee, A., Johnson, A., Zhang, Y., Helou, Y., Batlle, R., Liu, X., Gutierrez, N., et al. (2019). Fibroblasts Mobilize Tumor Cell Glycogen to Promote Proliferation and Metastasis. *Cell Metab* 29, 141-155.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.08.007>.
24. Rajasekaran, S., Thangavel, C., Djuric, N., Raveendran, M., Soundararajan, D.C.R., Nayagam, S.M., Matchado, M.S., Sri Vijay Anand, K.S., and Venkateshwaran, K. (2021). Profiling extra cellular matrix associated proteome of human fetal nucleus pulposus in search for regenerative targets. *Sci Rep* 11, 19013. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97620-w>.
25. Marchetti, P., Fovez, Q., Germain, N., Khamari, R., and Kluza, J. (2020). Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *FASEB j.* 34, 13106–13124. <https://doi.org/10.1096/fj.202000767R>.
26. Kowaltowski, A.J., De Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 47, 333–343. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004>.
27. Pértega-Gomes, N., Vizcaíno, J.R., Attig, J., Jurmeister, S., Lopes, C., and Baltazar, F. (2014). A lactate shuttle system between tumour and stromal cells is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer* 14, 352. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-352>.
28. Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Trimmer, C., Flomenberg, N., Wang, C., Pavlides, S., Pestell, R.G., Howell, A., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2011). Cancer cells metabolically “fertilize” the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: implications for PET imaging of human tumors. *Cell Cycle* 10, 2504–2520. <https://doi.org/10.4161/cc.10.15.16585>.
29. Yeomans, A., Thirdborough, S.M., Valle-Argos, B., Linley, A., Krysov, S., Hidalgo, M.S., Leonard, E., Ishfaq, M., Wagner, S.D., Willis, A.E., et al. (2016). Engagement of the B-

- cell receptor of chronic lymphocytic leukemia cells drives global and MYC-specific mRNA translation. *Blood* *127*, 449–457. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-660969>.
30. Stevenson, F.K., Forconi, F., and Packham, G. (2014). The Meaning and Relevance of B-Cell Receptor Structure and Function in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Seminars in Hematology* *51*, 158–167. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2014.05.003>.
31. Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., and Iruela-Arispe, M.L. (2014). The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* *17*, 779–804. <https://doi.org/10.1007/s10456-014-9440-7>.
32. Vom Stein, A.F., Hallek, M., and Nguyen, P.-H. (2024). Role of the tumor microenvironment in CLL pathogenesis. *Semin Hematol* *61*, 142–154. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2023.12.004>.
33. Chen, Z., Cretenet, G., Carnazzo, V., Simon-Molas, H., Kater, A.P., Windt, G.J.W. van der, and Eldering, E. (2024). Electron transport chain and mTOR inhibition synergistically decrease CD40 signaling and counteract venetoclax resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* *109*, 151–162. <https://doi.org/10.3324/haematol.2023.282760>.
34. Daverio, Z., Kolkman, M., Perrier, J., Brunet, L., Bendridi, N., Sanglar, C., Berger, M.-A., Panthu, B., and Rautureau, G.J.P. (2023). Warburg-associated acidification represses lactic fermentation independently of lactate, contribution from real-time NMR on cell-free systems. *Sci Rep* *13*, 17733. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44783-3>.
35. Llibre, A., Kucuk, S., Gope, A., Certo, M., and Mauro, C. (2025). Lactate: A key regulator of the immune response. *Immunity* *58*, 535–554. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2025.02.008>.
36. Yang, K., Xu, J., Fan, M., Tu, F., Wang, X., Ha, T., Williams, D.L., and Li, C. (2020). Lactate Suppresses Macrophage Pro-Inflammatory Response to LPS Stimulation by Inhibition of YAP and NF- $\kappa$ B Activation via GPR81-Mediated Signaling. *Front. Immunol.* *11*, 587913. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.587913>.
37. Kumagai, S., Koyama, S., Itahashi, K., Tanegashima, T., Lin, Y., Togashi, Y., Kamada, T., Irie, T., Okumura, G., Kono, H., et al. (2022). Lactic acid promotes PD-1 expression in

- regulatory T cells in highly glycolytic tumor microenvironments. *Cancer Cell* 40, 201-218.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.01.001>.
38. Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Frank, P.G., Casimiro, M.C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., et al. (2009). The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 8, 3984–4001. <https://doi.org/10.4161/cc.8.23.10238>.
39. Hou, X., Zhang, J., Wang, Y., Xiong, W., and Mi, J. (2017). TGFBR-IDH1-Cav1 axis promotes TGF- $\beta$  signalling in cancer-associated fibroblast. *Oncotarget* 8, 83962–83974. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20861>.
40. Avagliano, A., Granato, G., Ruocco, M.R., Romano, V., Belviso, I., Carfora, A., Montagnani, S., and Arcucci, A. (2018). Metabolic Reprogramming of Cancer Associated Fibroblasts: The Slavery of Stromal Fibroblasts. *BioMed Research International* 2018, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/6075403>.
41. Mékinian, A., Quinquenel, A., Belkacem, K.A., Kanoun, F., Dondi, E., Franck, E., Boubaya, M., Mhibik, M., Baran-Marszak, F., Letestu, R., et al. (2023). Immuno-regulatory malignant B cells contribute to Chronic Lymphocytic Leukemia progression. *Cancer Gene Ther.* <https://doi.org/10.1038/s41417-023-00602-5>.
42. Decombis, S., Bellanger, C., Le Bris, Y., Madiot, C., Jardine, J., Santos, J.C., Boulet, D., Dousset, C., Menard, A., Kervoelen, C., et al. (2023). CARD11 gain of function upregulates BCL2A1 expression and promotes resistance to targeted therapies combination in B-cell lymphoma. *Blood* 142, 1543–1555. <https://doi.org/10.1182/blood.2023020211>.
43. Noble, R.A., Thomas, H., Zhao, Y., Herendi, L., Howarth, R., Dragoni, I., Keun, H.C., Vellano, C.P., Marszalek, J.R., and Wedge, S.R. (2022). Simultaneous targeting of glycolysis and oxidative phosphorylation as a therapeutic strategy to treat diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Cancer* 127, 937–947. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01848-w>.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1. CLL cells alter the transcriptome of HS-5 bone marrow stromal cells in co-culture**

A) Heatmap showing normalized expression of significantly deregulated genes in HS-5 cells cultured alone or in co-culture with primary CLL cells (n = 5 per group). B) Volcano plot displaying the Log<sub>2</sub> fold change (Log<sub>2</sub>FC) versus -log<sub>10</sub> p-value of differentially expressed genes. FC: fold change. The cut-off was set to 0.5 to visualize the differentially expressed genes. C) Gene set enrichment analysis (GSEA) of the top upregulated pathway in HS5 cells cultured alone versus in co-culture with primary CLL cells. D) GSEA showing enrichment of glycolysis, hypoxia, mTORC1 signaling, and MYC target pathways in HS-5 cells cultured alone versus in co-culture with primary CLL cells. E) Gene expression analysis by qPCR in human mesenchymal stromal cells (MSC) from healthy donors (n = 4) cultured alone or in co-culture with the Mec-1 CLL cell line. Results are normalized to GAPDH expression and expressed as fold change. Statistical analyses were performed with Mann-Whitney test. \*P < .05, \*\*P < .01, \*\*\*P < .001, \*\*\*\*P < .0001

### **Figure 2. CLL cells increase the expression of proteins involved in metabolic processes.**

A) Volcano plot displaying fold change (Log<sub>2</sub>FC) versus -log<sub>10</sub> p-value of differentially expressed proteins. FC: fold change. The cutoff used to represent the data was set at 0.5. B) GSEA of the proteome of HS-5 cells upon 24 hours co-culture with Mec-1 cells. C) Heatmap showing all the omic data (RNA-seq and proteome) of the HS-5 alone or in co-culture with Mec-1 cells. D) Venn diagram of the crossed analysis of the RNA-seq and proteome data set from HS-5 cells alone versus co-culture with Mec-1 cells. E) List of the 18 hits that were found upregulated both at the transcript and protein level in HS-5 cells alone versus co-culture with Mec-1 cells. Log<sub>2</sub>FC is represented for the protein (light blue) and rose (transcripts). F) Clustering of the 18 hits of panel E to show the main biological processes that are upregulated in HS-5 by the co-culture with Mec-1 cells.

### **Figure 3. CLL cells enhance glycolysis in bone marrow stromal cells**

A) MTS assay in HS5 cells cultured for 24h with conditioned media from Mec-1 cell line, Mec-1 cells, or primary CLL cells. Statistical analysis was performed using the paired t-test. B) HS-5 cell counts in standard media, after starvation, or in co-culture with primary CLL cells

for 24h. C) Extracellular acidification rate (ECAR) measured using a Seahorse XF analyzer in HS-5 cells cultured for 24 h in conditioned media from primary CLL cells or in standard media. Glycolysis and glycolytic capacity were calculated from six independent experiments. D) ECAR measured in mesenchymal stromal cells (MSC) cultured for 24 h in conditioned media from Mec-1 CLL cells or in standard media. Glycolysis and glycolytic capacity were calculated from six independent experiments. E) Representative oxygen consumption rate (OCR) profiles from HS5 cells cultured for 24 h in conditioned media from primary CLL cells or in standard media. Maximal OCR and spare respiratory capacity were calculated from six independent experiments. F) Representative OCR profiles from MSCs from healthy donors cultured for 24 h in conditioned media from Mec-1 cells or in standard media. Maximal OCR and spare respiratory capacity were calculated from six independent experiments. G) Reactive oxygen species (ROS) production measured by flow cytometry in HS-5 cells cultured alone or in co-culture with Mec-1 or primary CLL cells for 24h. MFI: mean fluorescence intensity. H) Mitochondrial mass measured by flow cytometry in HS-5 cells cultured alone or in co-culture with Mec-1 or primary CLL cells for 24h. MFI: mean fluorescence intensity. For all panels, data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of the indicated individual values. For panels (B-H), statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test.

**Figure 4. CLL are able to consume the lactate produced by stromal cells.** A) NMR assay of Glucose in the culture medium HS-5, primary CLL cells cultured and 24 hours co-culture. The data are presented as ratio of the Glucose content in the RPMI medium. B) NMR assay of Lactate in the culture medium as in panel A. C) NMR assay of  $^{13}\text{C}$ -lactate (U- $^{13}\text{C}$ 3) measured in the medium of 3 CLL patients' cells upon 24- and 48-hours culture. The data are presented as ratio to the  $^{13}\text{C}$ -lactate at time 0 which corresponded to 10 mM  $^{13}\text{C}$ -lactate. D) workflow of the experiment used to analyse whether CLL cells are capable to uptake the  $^{13}\text{C}$ -lactate produced upon incubation of HS-5 cells with  $^{13}\text{C}$ -glucose. Details are given in the main text. E) NMR assay to measure the  $^{13}\text{C}$ -lactate concentration in the medium of HS-5 cells and co-culture of HS-5 cells with 6 different CLL patients' cells. The  $^{13}\text{C}$ -lactate (U- $^{13}\text{C}$ 3) concentration measure in the HS-5 condition correspond to the lactate produced upon incubation of stromal cells with 11,1mM of  $^{13}\text{C}$ -Glucose (U- $^{13}\text{C}$ 6). F) Western blot of whole cell lysates of HS-5 cell culture alone or after co-culture with either HG-3 cells or primary CLL cells. The image is representative of 2 independent experiments. For panels A, B and E, data

are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of the indicated individual values. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test. \*\*P<.005

**Figure 5. Lactate increases CLL cells survival and enhances BCR signaling pathway.** A) MTS assay of CLL primary cells purified from 5 patients' blood samples and treated for 24 hours with the indicated doses of Lactate. The % MTS was calculated as described in the M&M section. B) Analysis of c-myc transcription by RT-qPCR of CLL cells treated with 10mM Lactate for 24 hours. Primary CLL cells from 5 patients' blood samples were used. Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The Mann-Whitney statistical test was used. C) Western blot of whole cell lysates of Hg-3 cells stimulated for 15 and 30 min with XX anti-IgM. Specific antibodies against pBTK and pERK along with the total proteins were used to assess BCR signaling activation. Tubulin was used as loading control. D) Apoptosis analysis by Annexin V/7AAD and flow cytometry of primary CLL cells treated with 10mM lactate, stimulated or not with anti-IgM and treated or not with anti-SLC5A12. Mann-Whitney was used to assess statistical significance. 3) Western blot analysis of whole cell lysate of primary CLL cells treated or not with anti-SLC5A12 in presence of absence of BCR stimulation by anti-IgM. pERK was used to assess BCR activation. Tubulin is used as loading control. F) Workflow for CAM system. Details are given in the M&M section and the main text. G) Representative pictures of engrafted tumors in CAM at day 16 with or without addition of 10 mM Lactate during tumor growth H) Histogram representing the % of CD19 positive cells in the patient's derived CLL xenograft on the CAM after 16 days culture. 6 replicates from one patient were used in this experiment. Statistical significance was calculated with the Mann-Whitney \*\*P<.005.

## Supplementary materials

**Supplementary Table 1: Biological and Molecular Characteristics of Study patients.** NA: not available. 1 IGHV homology was calculated as the percentage of homology to the closest germ line VH gene. Unmutated (UM): IGHV homology  $\geq 98\%$ ; Mutated (M): IGHV homology  $< 98\%$ . 2 NGS sequencing a panel of 12 lymphoid genes associated with CLL including: TP53, ATM, NOTCH1, SF3B1, FBXW7, XPO1, POT1, BIRC3, IKZF3, RPS15, BTK, PLCG2. 3 FISH analysis includes: del(17p), del(11q), del(13q) and trisomy 12.

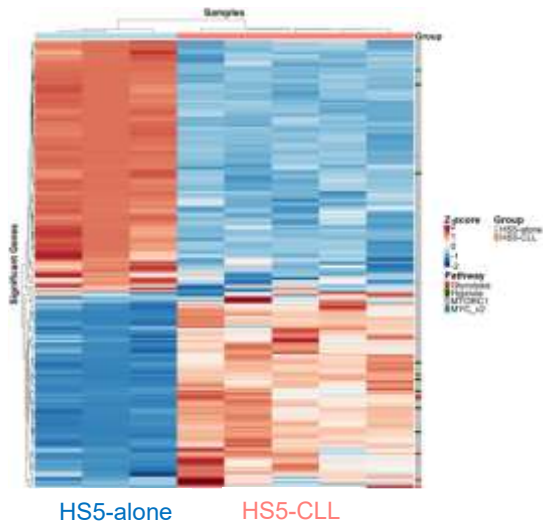
**Supplementary Figure 1: Transcriptomic analysis by RNA-seq of HS-5 cells in co-culture with Mec-1 cells.** A) Heat map of the differentially expressed genes in HS-5 cells upon 24 hours co-culture with Mec-1 cells. B) Volcano plot of the RNA-seq data set representing the Log<sub>2</sub>FC versus Log<sub>10</sub>Pvalue. The cut-off was set to 0.5 to visualize the differentially expressed genes. C) GSEA analysis of the RNA-seq data set to show the mostly regulated signalling pathways or biological processes. The colour code is based on the FDR and the dot size is based on the P-value. D) Enrichment plots of the most regulated pathways based on the GSEA analysis.

**Supplementary Figure 2: Proteome of HS-5 upon co-culture with Mec-1 cells.** A) Heatmap of the protein hits identified by mass spectrometry in HS-5 cells upon 24 hours co-cultures with Mec-1 cells. B) Enrichment plots of the mostly regulated biological processes based on the GSEA analysis of the proteome data set.

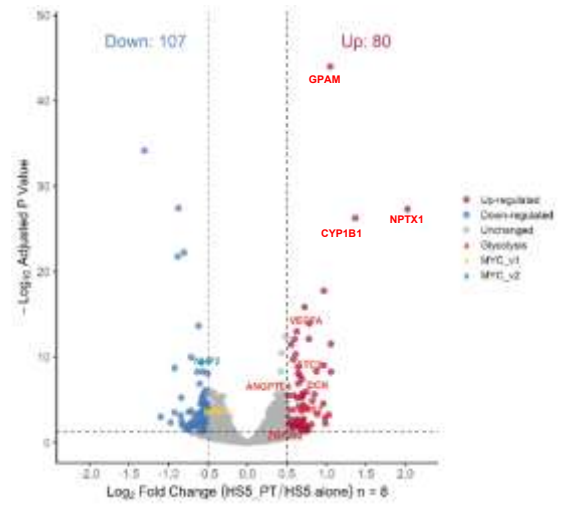
**Supplementary Figure 3 Seahorse assay and CLL cells analysis within the CAM system.** A) Representation of the metabolic inhibitors used to evaluate the OCR (oxygen consumption rate) and ECAR (extracellular acidification rate) parameters during the Seahorse assay. B) cytometry plots and gating strategy to analyse the human CD45/CD19 positive cell population (CLL cells) cultured on the CAM. The CAM without human cells (bottom panels) has been used as negative control to place the gate for the positivity (top panels). C) Histogram representing the weight variation of the patients derived CLL xenograft on the in presence and absence of lactate treatment. One patient was analysed in 6 replicates D) Representative cytometry plots and gating strategy of CD19 positive CLL cells within the CAM system in presence and absence of lactate after 16 days culture.

# Figure 1

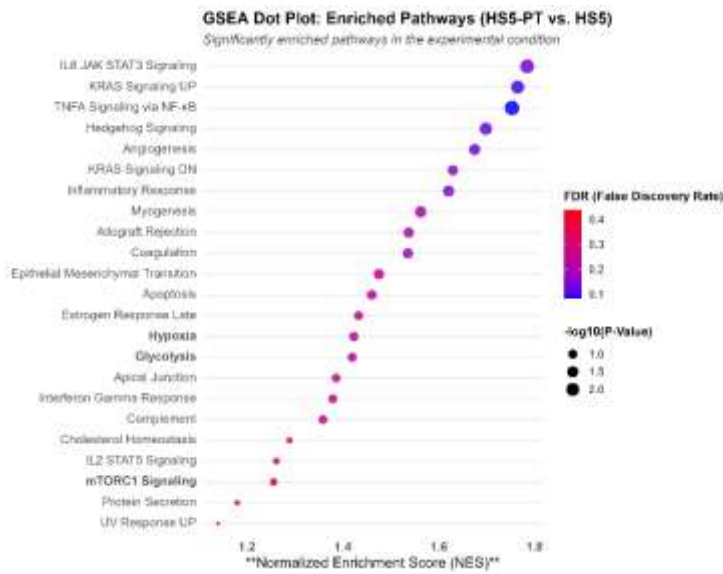
**A**



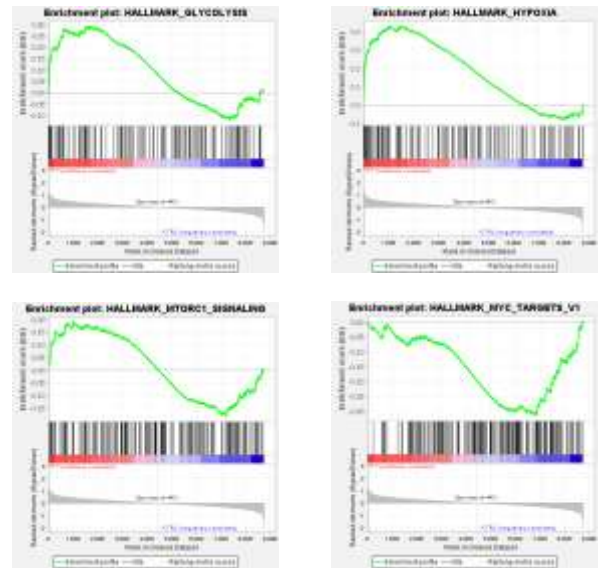
**B**



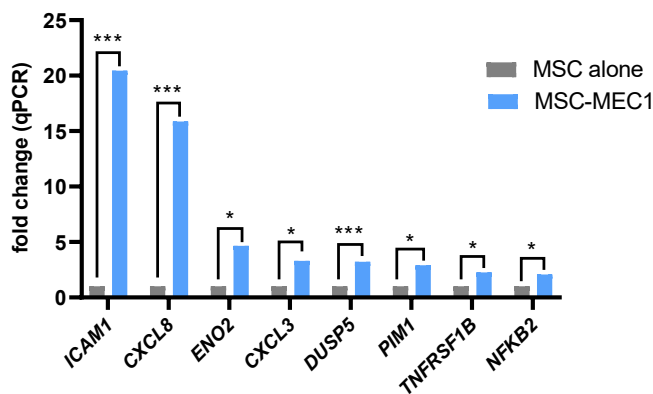
**C**



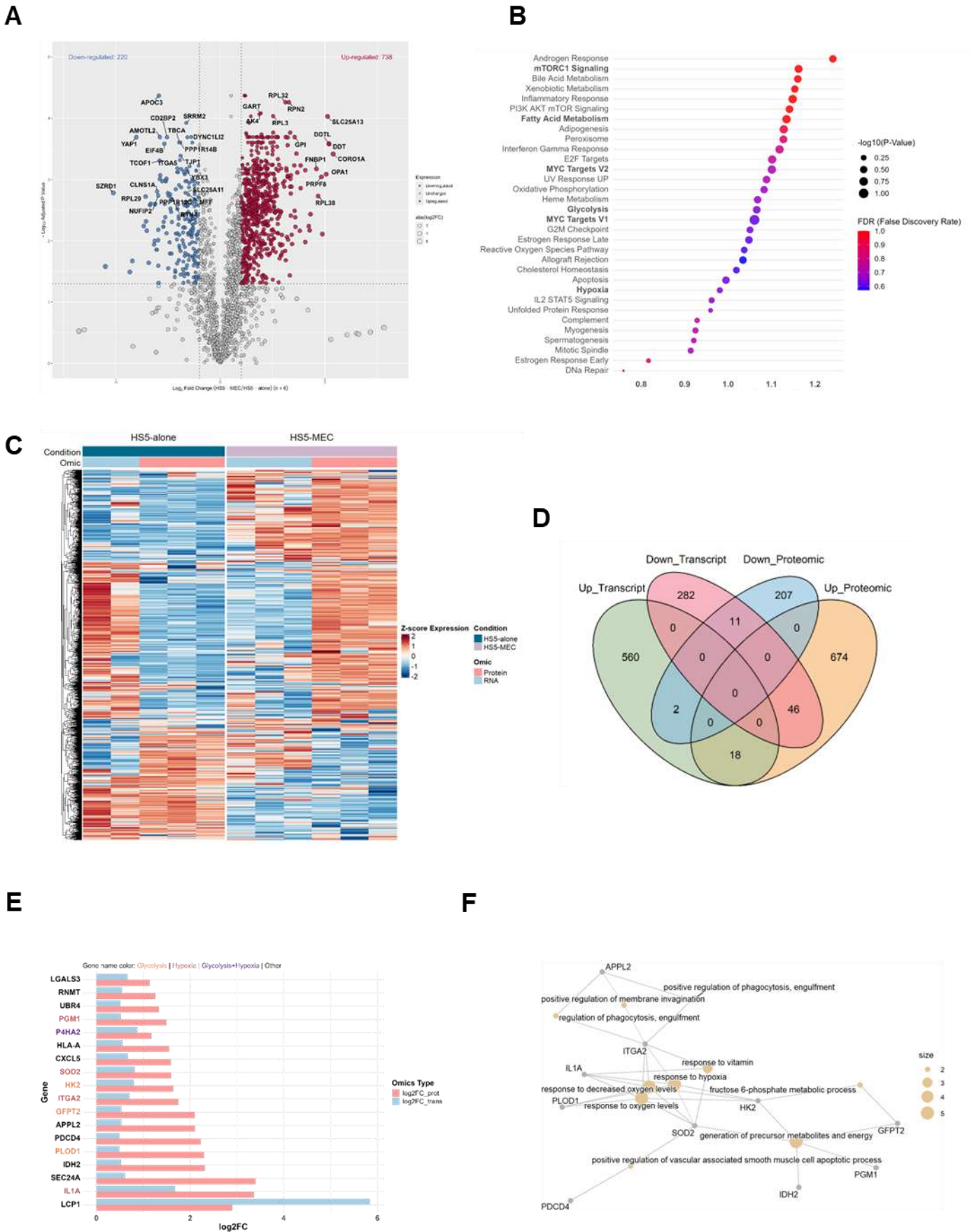
**D**



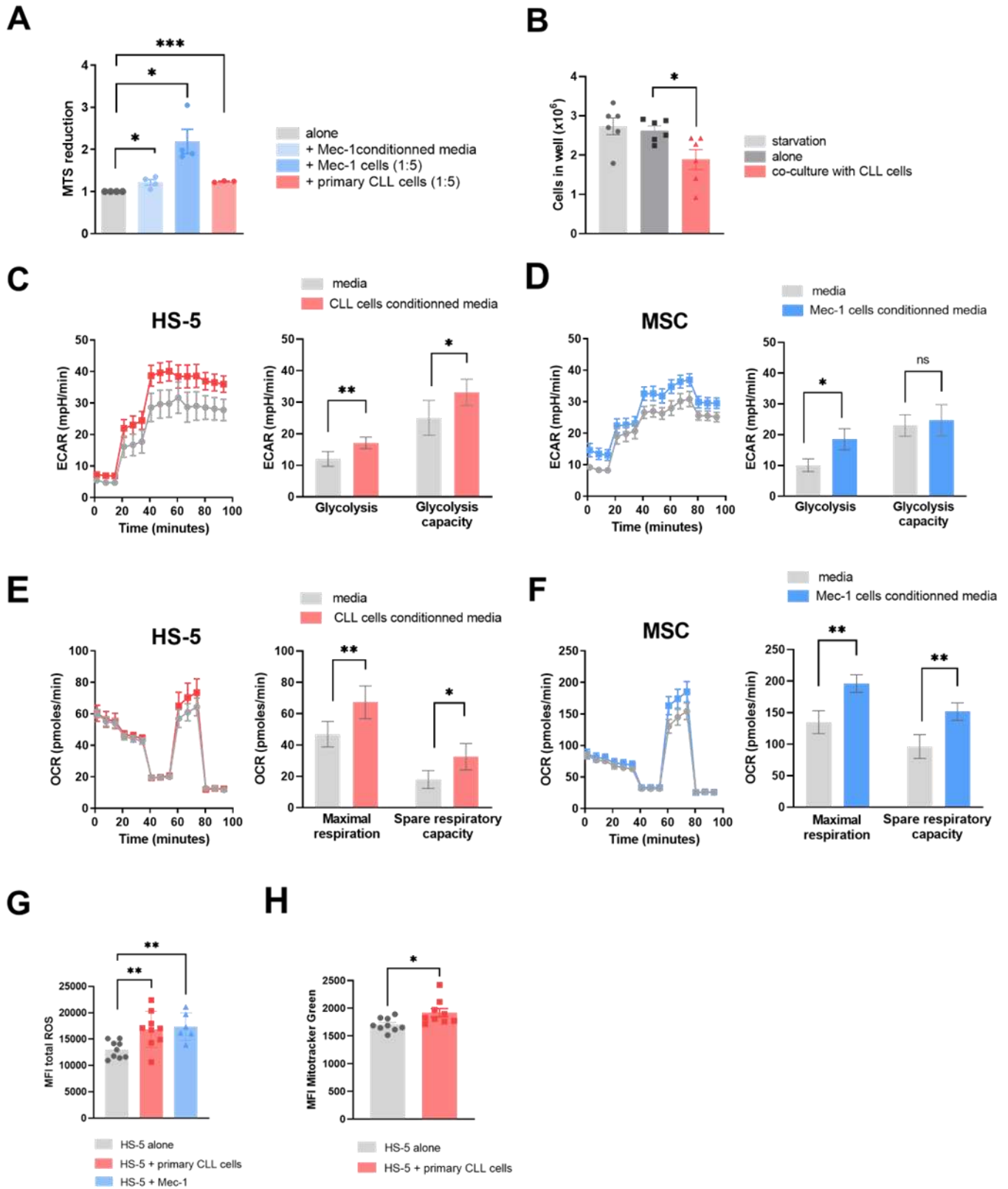
**E**



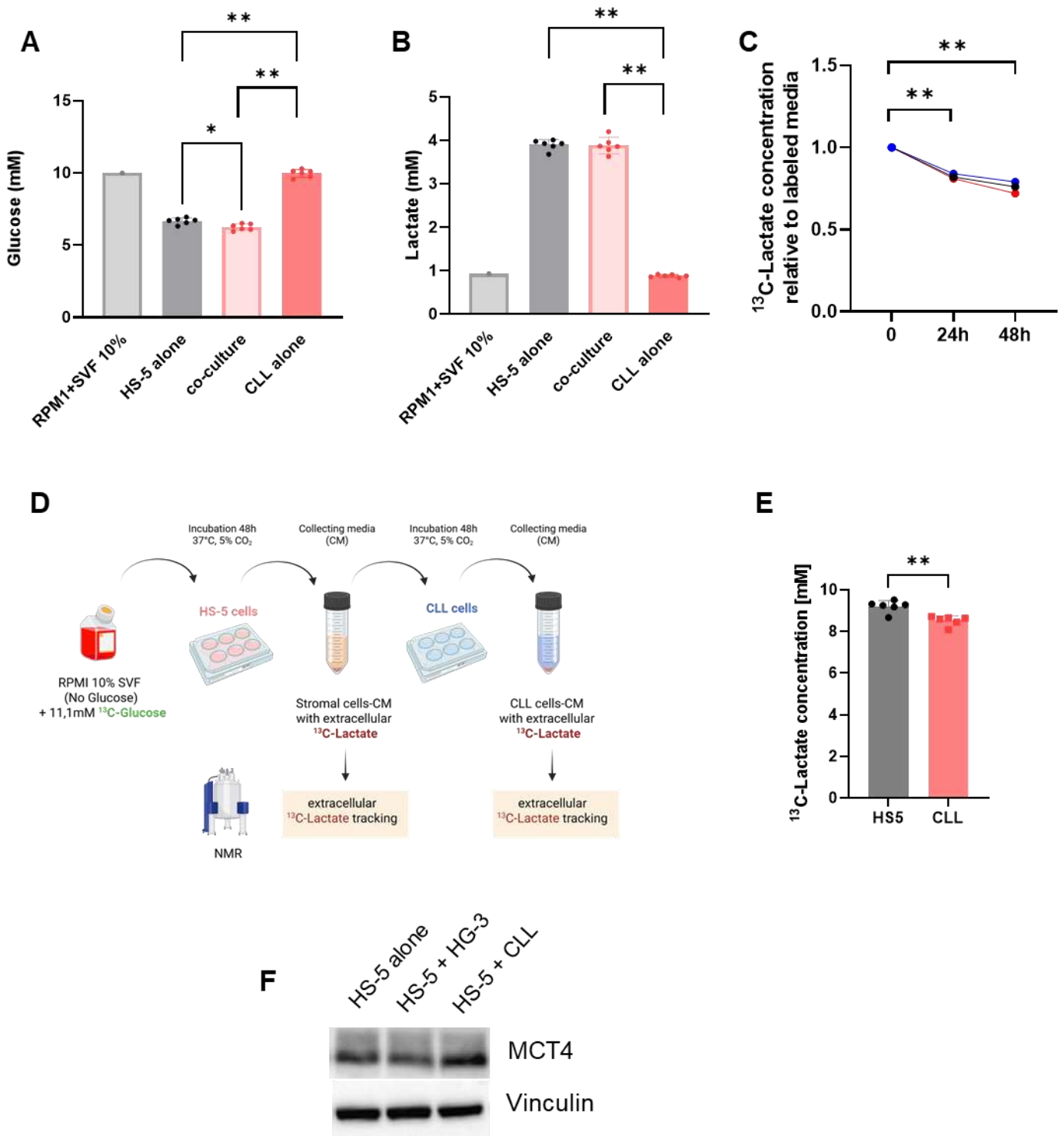
# Figure 2



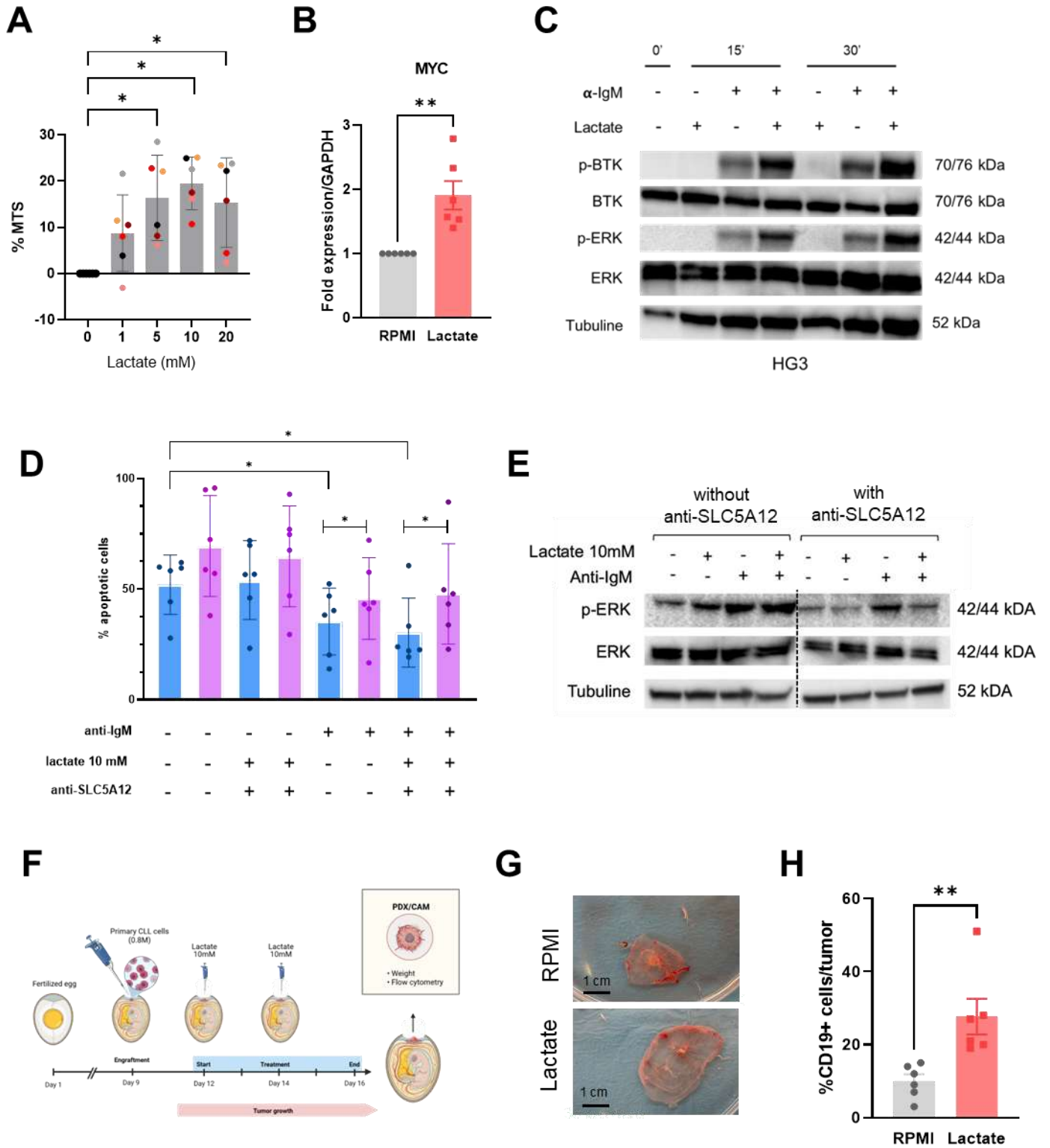
**Figure 3**



**Figure 4**

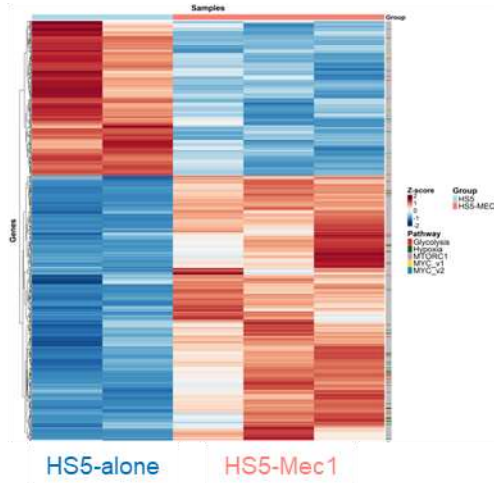


**Figure 5**

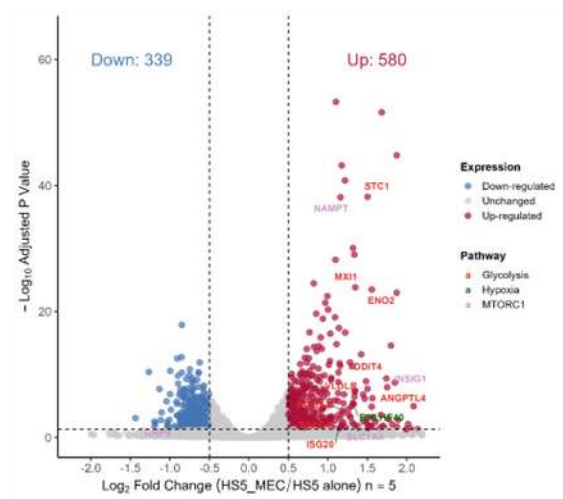


# Supplementary Figure 1

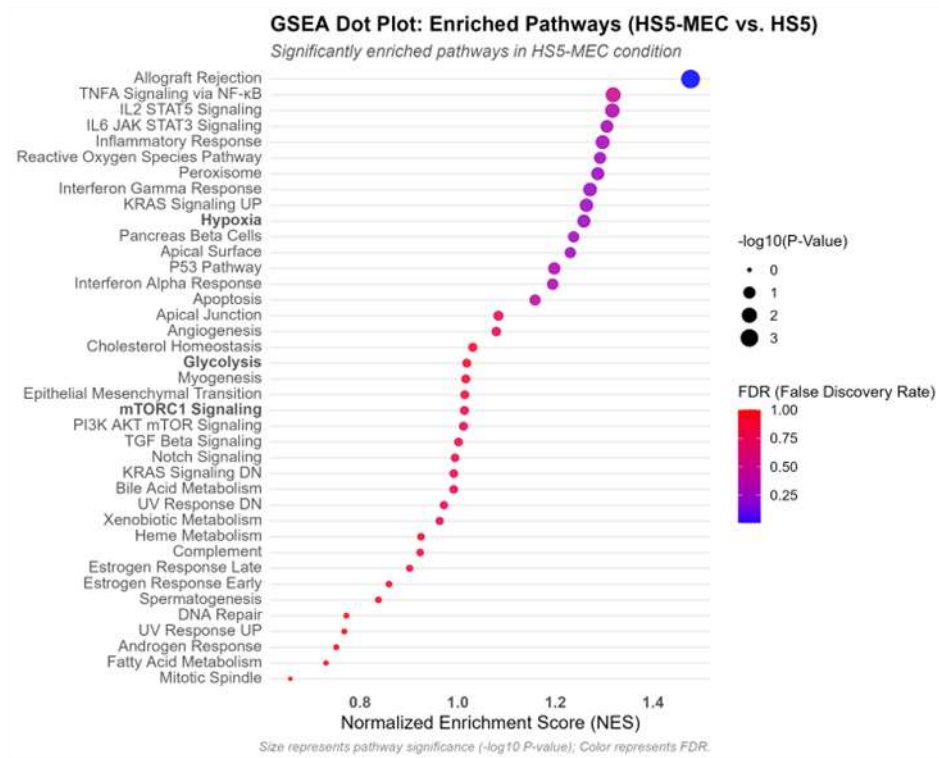
**A**



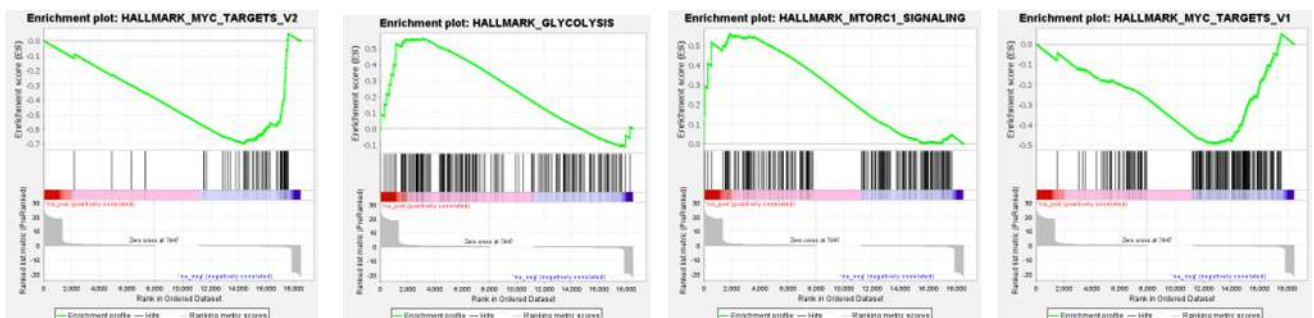
**B**



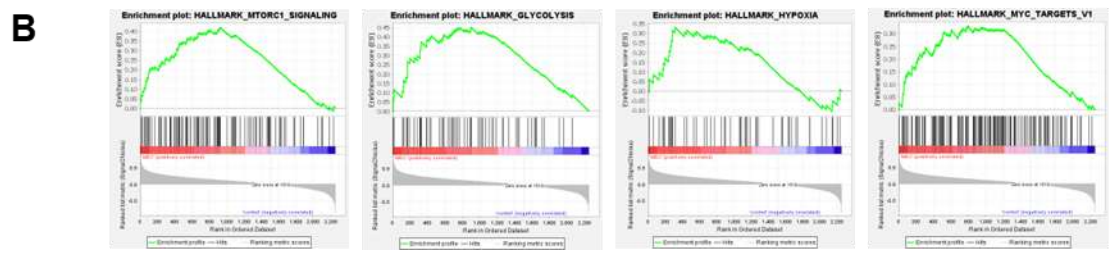
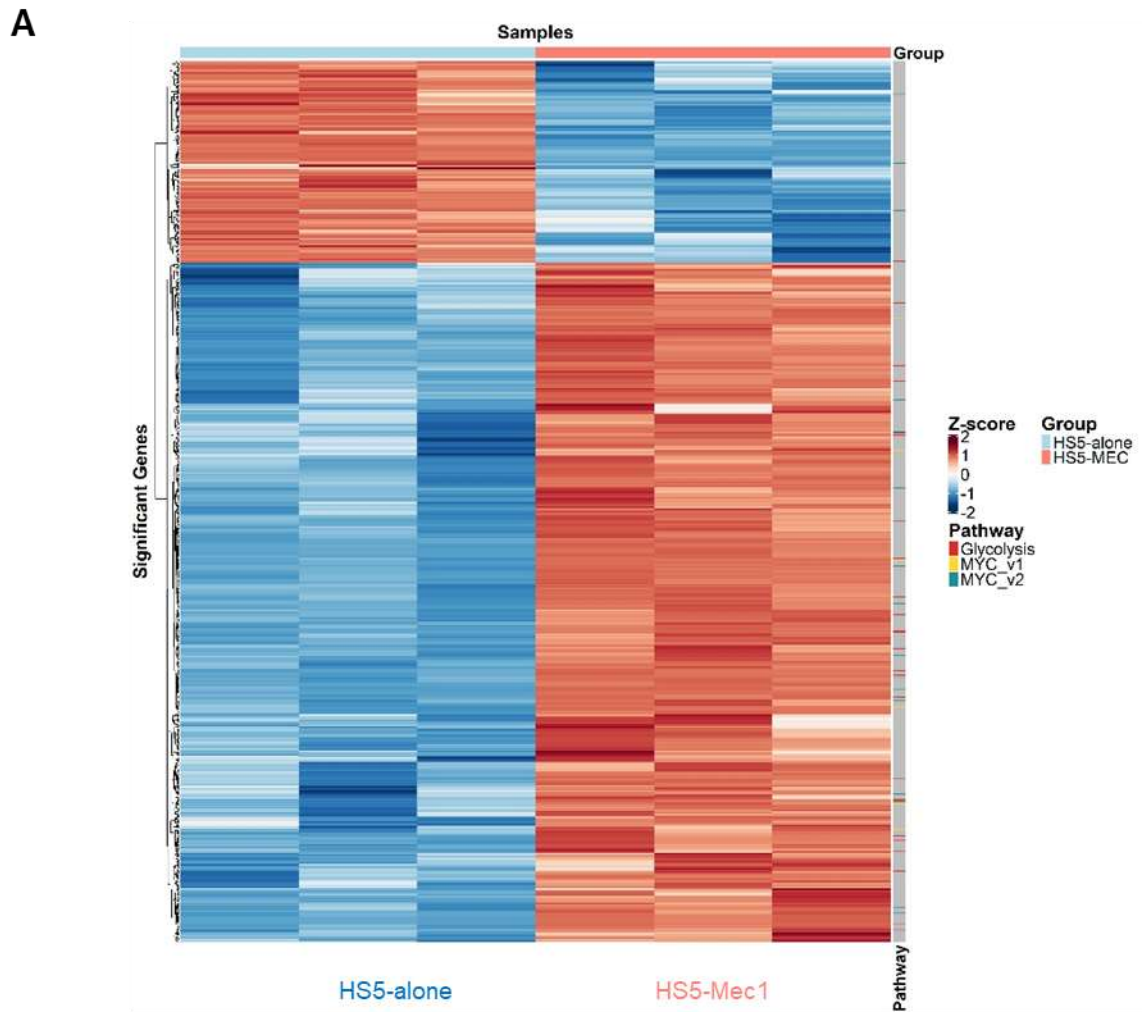
**C**



**D**

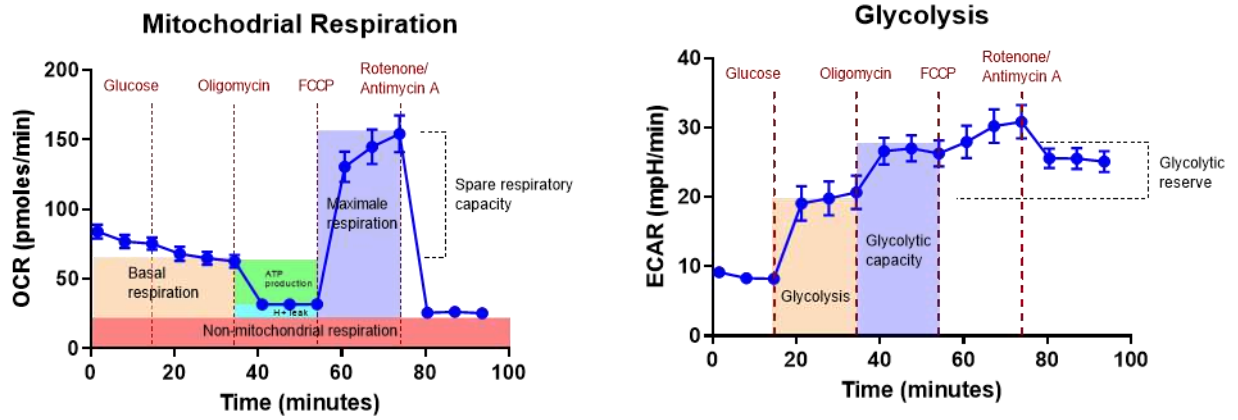


# Supplementary Figure 2

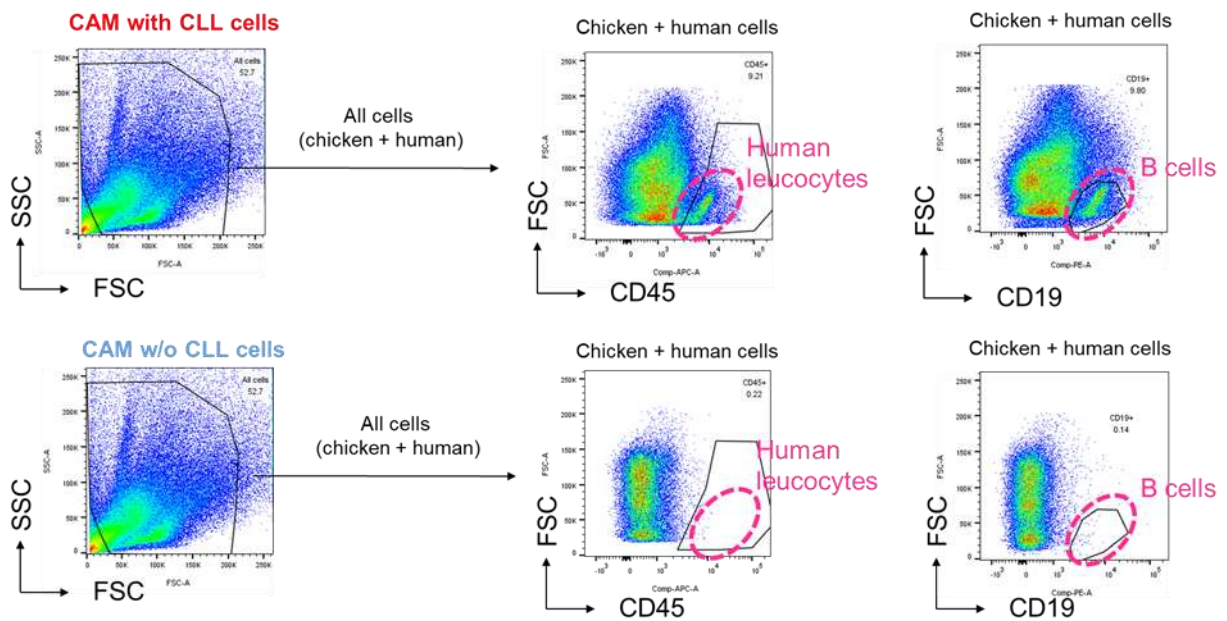


# Supplementary Figure 3

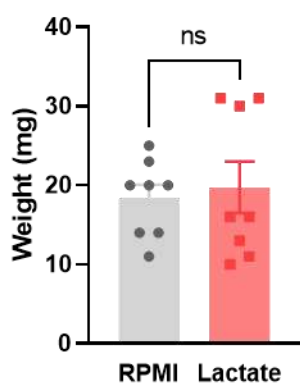
**A**



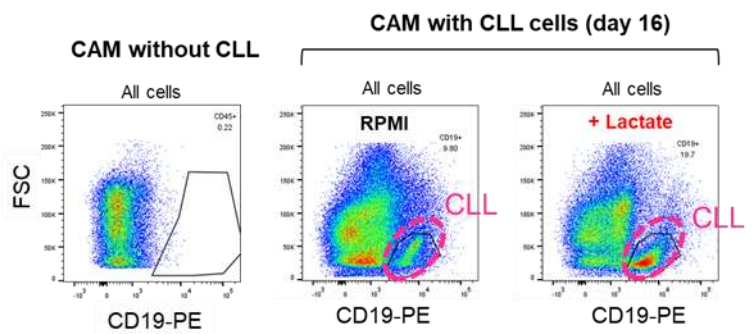
**B**



**C**



**E**



## Supplementary Table 1

UPN	Gender	Age	IGHV status <sup>1</sup>	Mutation (NGS) <sup>2</sup>	FISH <sup>3</sup>	Experiments
397	F	76	Unmutated	Notch1, BIRC3	trisomy 12	MTS
059	M	68	Unmutated	NA	trisomy 12, del13q	MTS
412	M	67	Mutated	SF3B1	None	Apoptosis, MTS, Mitotracker, NMR, Western Blot
095	M	58	Mutated	NA	del13q	NMR
172	M	66	Unmutated	NOTCH1, TP53	trisomy 12, del17q	Seahorse, NMR
187	M	60	Mutated	Unmutated	None	Seahorse, NMR
239	M	73	Mutated	NA	del13q	NMR
337	F	49	Mutated	NA	None	NMR
388	F	61	Mutated	RPS15, IKZF3	NA	Apoptosis, NMR, ROS, Mitotracker, Western Blot
061	M	67	Mutated	NA	del13q	ROS
285	M	63	Mutated	NA	del13q	ROS
262	M	44	Unmutated	TP53	None	ROS
249	F	55	Unmutated	FBXW7	None	Apoptosis, ROS
331	F	70	Mutated	SF3B1	None	ROS, MTS
053	M	46	Unmutated	NA	None	ROS
435	M	58	Unmutated	ATM, SF3B1	None	Apoptosis, ROS, Mitotracker, MTS
449	F	67	Unmutated	NA	NA	ROS, MTS
207	M	65	Mutated	NA	NA	Mitotracker
438	M	44	Unmutated	Unmutated	del13q	Mitotracker, MTS
161	M	70	Mutated	NA	None	Mitotracker
446	M	61	Mutated	NA	TP53	Mitotracker, MTS
079	M	77	Unmutated	Unmutated	None	Seahorse, Mitotracker
263	F	69	Mutated	Unmutated	None	Mitotracker, MTS
412	M	67	Mutated	SF3B1	None	NMR
426	M	73	Mutated	Unmutated	NA	NMR, MTS
445	M	58	Unmutated	NA	NA	NMR, MTS
013	M	55	Mutated	NA	trisomy 12	MTS
457	F	60	NA	NA	NA	MTS
112	F	70	Mutated	NA	None	MTS
455	F	60	Mutated	SF3B1, XPO1	None	Apoptosis, MTS
433	M	63	NA	Unmutated	NA	MTS
277	F	71	NA	NA	NA	MTS
441	M	48	Unmutated	NOTCH1	trisomy 12	RNA-seq
198	M	67	Unmutated	NA	NA	RNA-seq
307	F	65	Mutated	Unmutated	NA	RNA-seq
203	M	85	Mutated	Unmutated	NA	RNA-seq
341	M	58	Unmutated	NOTCH1, XPO1	del13q	RNA-seq
248	M	64	Unmutated	Unmutated	None	Seahorse
428	F	60	Mutated	Unmutated	None	Seahorse
075	M	91	Unmutated	NOTCH1	None	Seahorse
411	M	90	Mutated	Unmutated	NA	Apoptosis

## II. Etude de la voie de signalisation Hippo dans les cellules stromales en coculture avec les B-LLC

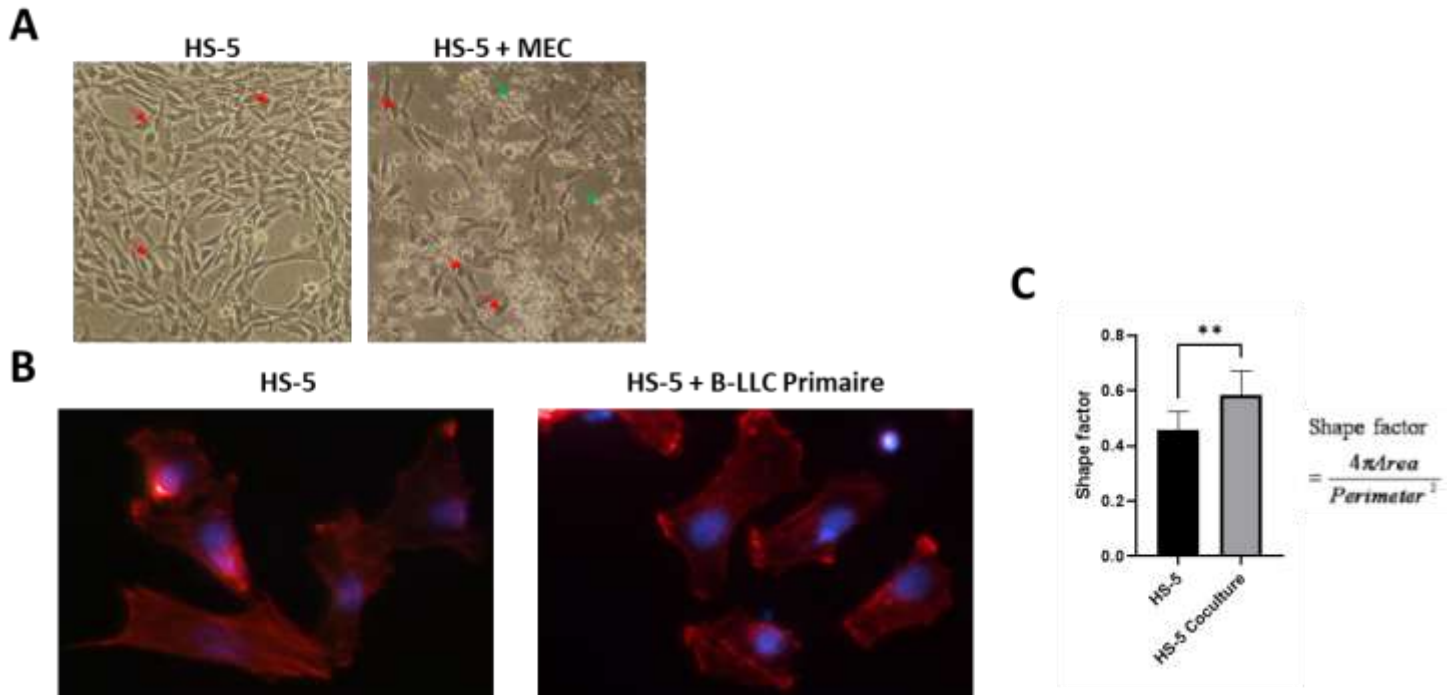
### A. Modifications morphologiques des HS5 en coculture

Les cellules B-LLC dépendent étroitement de leur microenvironnement pour assurer leur survie et leur prolifération. Afin de mimer ce dialogue tumoral inter-cellulaire en laboratoire, un modèle de coculture a été développé, dans lequel des cellules B-LLC primaires sont déposées directement sur une monocouche de cellules stromales de type HS-5, établissant ainsi des contacts directs intercellulaires<sup>497</sup>. De précédentes expériences réalisées au sein de notre laboratoire ont mis en évidence la capacité des cellules B-LLC à adhérer à cette monocouche stromale. Ces observations suggèrent également que l'adhérence des cellules B-LLC aux cellules stromales est un phénomène dynamique et qu'il implique l'établissement de contacts cellulaires directs et transitoires entre cellules leucémiques et stromales<sup>445</sup>.

Ces contacts physiques entre cellules représentent un stress mécanique sur les cellules stromales, notamment via des forces de traction exercées au point d'adhésion. Ce stress mécanique provoque des remaniements morphologiques importants, modifiant la tension du cytosquelette, la forme cellulaire, la polarité et l'organisation des jonctions intercellulaires et des adhérences focales<sup>265,519</sup>.

La lignée HS-5 utilisée dans nos modèles de coculture est une lignée de cellules adhérentes à l'aspect fibroblastique. Nous avons pu constater que l'établissement des cocultures entraînait de manière systématique une modification de la forme des cellules HS-5 par microscopie optique. Plus précisément, les cellules HS-5 semblent moins allongées et présentent une forme plus arrondie (Figure 13A). Afin de caractériser plus finement ce changement de morphologie, nous avons utilisé l'immunofluorescence afin de marquer le cytosquelette d'actine des cellules HS-5 et leucémiques dans les cocultures (Figure 13B). Le marquage spécifique du cytosquelette d'actine nous permet de déterminer certains paramètres géométriques des cellules tels que leur périmètre et leur surface à l'aide du logiciel ImageJ. Ces éléments sont utilisés pour calculer le Shape Factor, un paramètre géométrique sans dimension permettant de comparer la forme réelle d'un objet à une forme de référence idéale. Ainsi, une cellule parfaitement circulaire aura une valeur de Shape Factor proche de 1 et plus la valeur tendra vers 0, plus la cellule sera allongée. Comme montré dans la figure 13C, la coculture pendant 24 heures des cellules stromales HS-5 avec des cellules B-LLC entraîne une augmentation du Shape Factor des cellules HS-5, ce qui suggère une transition vers une forme cellulaire plus sphérique. Ces modifications

morphologiques suggèrent un possible remodelage du cytosquelette des cellules HS-5 lorsqu'elles sont en contact avec des cellules B-LLC.



**Figure 13. Changement de forme des cellules stromales HS5 en présence de B-LLC.** (A) Observation des cellules HS-5 au microscope optique après 24h de culture en présence ou non de cellules B-LLC (MEC). Les flèches rouges mettent en évidence le changement morphologique en présence de B-LLC. Les flèches vertes indiquent les cellules B-LLC. Photographies prises numériquement à partir d'un grossissement x10. (B) Marquage du cytosquelette d'actine par phalloïdine dans les cellules stromales HS-5 à l'issue de 24h de culture en présence ou non de cellules B-LLC primaire. Le cytosquelette d'actine est marqué en rouge à l'aide de Phalloïdine et les noyaux cellulaires en bleu à l'aide du DAPI. Chaque image correspond à un champ représentatif de la forme des cellules observées. (C) Calcul du Shape Factor (ImageJ) des cellules HS-5 à partir des images obtenues en immunofluorescence. La condition HS-5 seule représente le Shape Factor moyen pour 32 cellules différentes et 16 cellules différentes pour la condition HS-5 + cellules B primaires (n = 1). Test statistique Mann-Whitney. Les barres d'erreurs indiquent la moyenne ± SEM. P-value \*\* < 0.01.

Le cytosquelette d'actine étant un acteur central de la morphologie et de la dynamique cellulaire, sa régulation fait intervenir plusieurs voies de signalisation intracellulaires, dont celle des petites GTPases de la famille Rho. Ces GTPases sont connues pour moduler la polymérisation et l'organisation des filaments d'actine<sup>178</sup>. Parmi celles-ci, RhoA joue un rôle bien établi dans la formation de fibres de stress, la contractilité cellulaire et la régulation de la forme cellulaire<sup>229</sup>.

Afin d'évaluer l'état d'activation de RhoA dans les cellules HS-5 en contact avec les cellules B-LLC, nous avons mis au point un protocole de tri négatif pour isoler les cellules HS-5 des cellules B-LLC à la suite de leur coculture. Ce système est basé sur l'utilisation de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD19 qui retient les cellules B et permet d'isoler les cellules HS-5 (Figure 14A).

L'efficacité du tri magnétique a tout d'abord été évalué par cytométrie en flux en déterminant la proportion de cellules HS-5 et de cellules B-LLC présentes dans les différentes fractions des cocultures (Figure 14B). Au regard des différentes cocultures avec les lignées de B-LLC (MEC) et les B-LLC primaires, l'enrichissement des cellules HS-5 récupérées est estimé à environ 90%.

Les très faibles quantités de cellules B CD19<sup>pos</sup> détectées dans les échantillons triés de coculture (fraction adhérente) est confirmé par western blot. Le niveau du signal du CD19 est en dessous de la limite de détection dans les échantillons protéiques issus de cellules HS-5 triées (Figure 14C). Ainsi, ce système de tri magnétique négatif nous permet de récolter spécifiquement les cellules stromales HS-5 après qu'elles aient établi en cocultures des contacts directs avec les cellules B-LLC.

L'état d'activation de RhoA, c'est-à-dire sa forme liée au GTP, a ensuite été mesuré à l'aide d'un test biochimique de type Pull Down qui permet de précipiter spécifiquement la fraction active de RhoA (RhoA-GTP) via sa capacité à se lier au domaine RBD de la Rhotekin. Cette approche a permis de mettre en évidence une diminution de la forme active de RhoA (RhoA-GTP) dans les cellules HS-5 triées après 24h de coculture avec les MEC-1 (Figure 15). Ainsi, la diminution de l'activité de RhoA induite par les cellules B-LLC pourrait contribuer à une dynamique cytosquelettique favorisant une morphologie cellulaire moins étalée et plus sphérique des cellules HS-5.

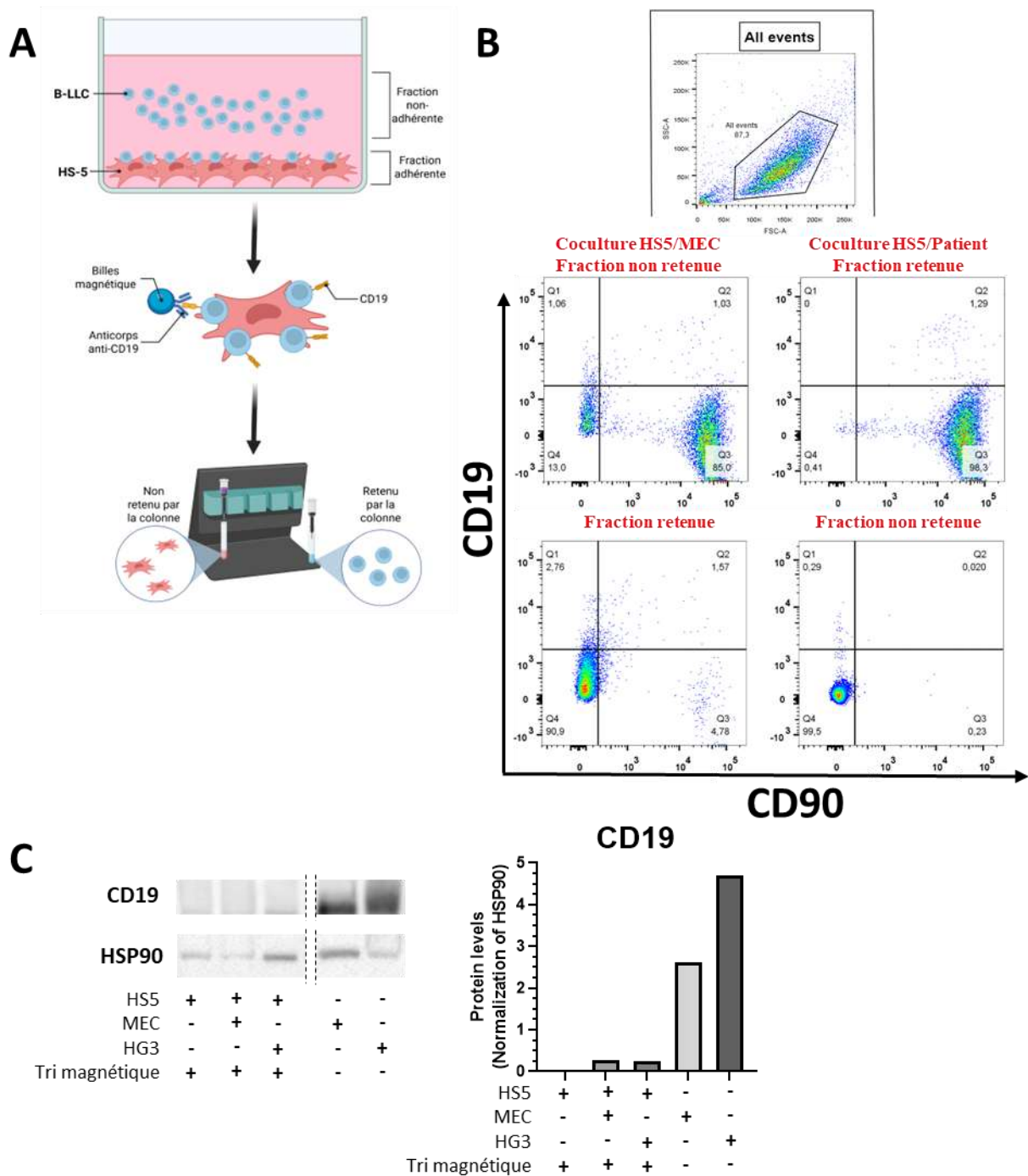


Figure 14. **Système de tri magnétique des cocultures.** (A) Schéma explicatif du fonctionnement du tri magnétique. La fraction adhérente des cocultures est collectée et mélangée avec des billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD19. Les cellules B-LLC (en bleue), exprimant le CD19, vont être retenues dans la colonne une fois cette dernière placée sur un support aimanté. Les cellules HS-5 (en rose) ne seront pas retenues par la colonne et seront collectées dans un tube. Suite à cela, le retrait du support aimanté permet de récolter les cellules B-LLC qui étaient retenues dans la colonne. Schéma réalisé sur Biorender.com. (B) Analyse par cytométrie en flux des proportions de cellules HS-5 (CD90+) et de cellules B-LLC (CD19+) dans les différentes fractions à l'issue d'un tri magnétique. Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes ( $n = 2$ ). (C) Analyse de l'expression de CD19 par Western

Blot dans différentes conditions de coculture (24h) avec ou sans tri magnétique. L'expression de CD19 a été détectée, et les niveaux de protéines ont été normalisés par rapport à HSP90, utilisé comme contrôle de charge. La figure de droite montre l'analyse densitométrique des bandes de CD19, exprimée en niveaux relatifs après normalisation sur HSP90. Expérience réalisée une fois ( $n = 1$ ).

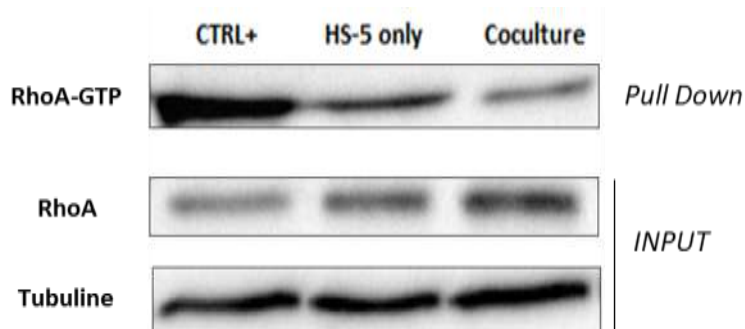


Figure 15. Analyse par pull-down de l'activité de RhoA (RhoA-GTP) dans les cellules HS-5 seules (HS5 only) ou en co-culture avec les cellules MEC-1 (coculture). Un contrôle positif avec le GTP- $\gamma$ S a été réalisé (CTRL+). Résultats représentatifs de 3 expériences indépendantes ( $n = 3$ ).

## B. Activation de la voie HIPPO dans les cellules stromales en coculture

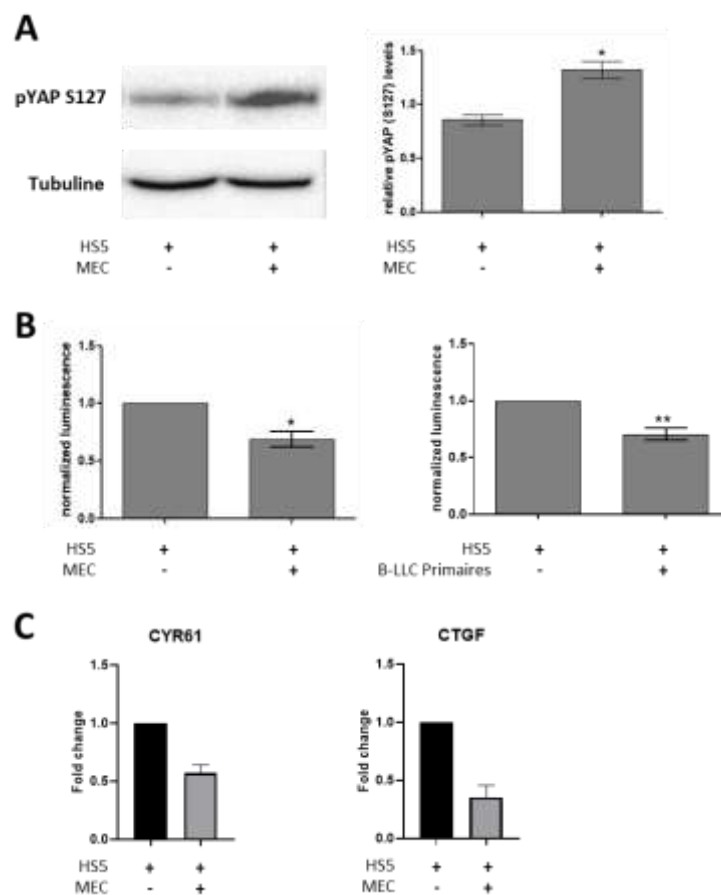
À la lumière des modifications morphologiques observées et de la diminution de l'activité de RhoA-GTP, nous nous sommes intéressés à la voie de signalisation Hippo qui est connue pour être un intégrateur clé des signaux mécaniques intracellulaires. Cette voie joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité des coactivateurs transcriptionnels YAP et TAZ en réponse à des stimuli tels que la forme cellulaire, la densité, ou encore la tension du complexe actomyosine<sup>265,295</sup>.

En condition de faible tension cytosquelettique ou de forme cellulaire restreinte, la voie Hippo est activée, entraînant la phosphorylation de YAP/TAZ par la kinase LATS et leur rétention dans le cytoplasme puis leur dégradation par le protéasome. La rétention cytoplasmique de YAP entraîne une diminution de l'expression de ses gènes cibles les plus connus, CYR61 et CTGF<sup>272</sup>. À l'inverse, des cellules étalées qui présente une forte contractilité — souvent dépendante de l'activité de RhoA–ROCK — favorisent la translocation nucléaire de YAP/TAZ et l'activation des gènes cibles<sup>265,267,295</sup>.

Après 24h de coculture suivi de l'isolement des cellules HS-5 par tri magnétique, le niveau de phosphorylation de YAP sur la sérine 127 a été analysé dans ces cellules par Western blot (Figure 16A). L'augmentation de la phosphorylation S127 de YAP dans les cellules HS-5 indique une activation de la voie Hippo. L'activation de cette voie a été confirmée en observant

une diminution de l'activité transcriptionnelle de YAP (Figure 16B). Cette activité a été évaluée à l'aide d'un système rapporteur spécifique, dans lequel le gène de la luciférase est sous contrôle d'un promoteur spécifique liant TEAD, l'un des principaux facteurs de transcription activés en aval de la voie Hippo<sup>520</sup>. Par ailleurs, l'étude par qRT-PCR de l'expression de certains gènes cibles de la voie Hippo (CYR61 et CTGF) dans des conditions similaires de cocultures sont également diminués (Figure 16C).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats mettent en évidence une activation de la voie Hippo dans les cellules HS-5 au contact des cellules B-LLC. L'activation de la voie Hippo dans notre modèle se traduit notamment par une augmentation de la phosphorylation S127 de YAP (phosphorylation inhibitrice) et une diminution de son activité transcriptionnelle.



**Figure 16. Activation de la voie Hippo dans les cellules stromales en coculture avec des B-LLC (A) Mesure des niveaux de phosphorylation de YAP sur la Sérine 127 dans les HS-5 à l'issue de coculture de 24h (triée) par Western Blot. La Tubuline est utilisée comme contrôle de charge. L'histogramme représente l'analyse densitométrique des bandes observées, exprimée en niveaux relatifs après normalisation sur la tubuline. Les données sont présentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. Un western blot représentatif de 3 expériences indépendantes est montré. ( $n = 3$ ,  $*p < 0.05$ ) (B) Système rapporteur HIP/HOP dans les cellules HS-5 en présence de MEC (gauche) ou de B-LLC primaire (droite). Ce ratio**

*est le reflet de l'activité transcriptionnel de YAP dans les cellules stromales HS-5. Chaque ratio a été normalisé par le signal des monocultures HS-5. Les données sont présentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. Le test statistique utilisé est le t-test de Student apparié ( $n = 6$ ,  $**p < 0.003$ ). (C) Expression relative des gènes *CYR61* (*CCN1*) et *CTGF* (*CCN2*) dans les cellules HS-5 en présence ou non de cellules B-LLC (MEC) à l'issu d'un tri magnétique. L'expression des gènes cibles a été mesurée par RT-qPCR et normalisée par rapport au gène de référence *B2M* (Beta-2 microglobulin) puis aux cellules HS-5 seules comme échantillon de référence (méthode  $\Delta\Delta Ct$ ). Les données sont présentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM ( $n = 2$ ).*

### C. Modulation de l'expression de YAP dans des lignées stables HS5

Les résultats précédents indiquent que les cellules B-LLC entraîne une activation de la voie Hippo dans les cellules HS-5 lorsqu'elles sont cultivées ensemble. Afin de mieux comprendre et caractériser le rôle de YAP dans les cellules HS-5, nous avons généré une lignée de cellules HS-5 stables caractérisée par la surexpression d'une forme mutée de YAP constitutivement active et dénommée YAP 5SA<sup>301</sup>. Le mutant YAP 5SA présente une substitution d'une sérine en alanine sur les positions 61, 109, 127, 164 et 381. Grâce à ces modifications, YAP 5SA ne peut plus être phosphorylé par LATS (phosphorylation S127) et échappe ainsi à la séquestration cytoplasmique par la protéine 14-3-3. De ce fait, ce mutant est constitutivement stabilisé, activé et pourra se transloquer dans le noyau pour y jouer son rôle de coactivateur transcriptionnel. A l'inverse, des stratégies d'inhibitions à base de siRNA ou de shRNA ont été développées par différentes sociétés pour cibler spécifiquement l'ARNm de YAP afin d'invalider son expression. Afin d'évaluer l'activité transcriptionnelle du mutant YAP 5SA, une transfection transitoire a d'abord été réalisée dans les cellules HS-5 en utilisant le système rapporteur HIP/HOP et les résultats ont confirmé l'augmentation de son activité transcriptionnelle (Figure 17A). Sur la base de ces résultats positifs, nous avons entrepris par le biais de transduction virale, la génération de lignées HS-5 stables exprimant soit YAP 5SA soit le shYAP. Les cellules HS-5 transduites avec le vecteur viral pLKO vide ont été utilisées comme lignée contrôle.

Afin de vérifier les niveaux d'expressions de YAP dans les lignées stables YAP 5SA et shYAP, un western blot a été réalisé (Figure 17B). L'augmentation du signal ( $\sim 5$ fois) observée par densitométrie confirme l'expression du mutant YAP 5SA dans les cellules. A l'inverse, une diminution du signal ( $\sim 4$ fois) est observée dans la lignée exprimant shYAP démontrant l'efficacité de l'invalidation de la protéine.

Afin d'analyser la localisation cellulaire de YAP dans les lignées générées, nous avons également réalisé un fractionnement cytoplasme/noyau (Figure 17C). Comme attendu, YAP

5SA est fortement enrichi dans le noyau mais il est également augmenté dans le cytoplasme par rapport aux cellules contrôles PLKO. A l'inverse, le niveau de YAP dans les cellules shYAP est faible dans le cytoplasme et non détecté dans le noyau. Une exposition prolongée de la membrane a néanmoins permis de visualiser YAP dans les fractions nucléaire des cellules PLKO et shYAP. De manière notable, l'intensité de ce signal nucléaire résiduel apparaît similaire entre les deux conditions. Ce résultat suggère que, malgré une diminution globale de l'abondance de YAP dans les cellules shYAP, la quantité relative détectée dans le noyau n'est pas significativement altérée, ce qui pourrait refléter une stabilité du transport nucléaire dans ce contexte. Ainsi, l'ensemble de ces résultats valident l'établissement de lignées stables HS-5 présentant une modulation de la stabilité (et de la localisation) de YAP et potentiellement de son activité transcriptionnelle.

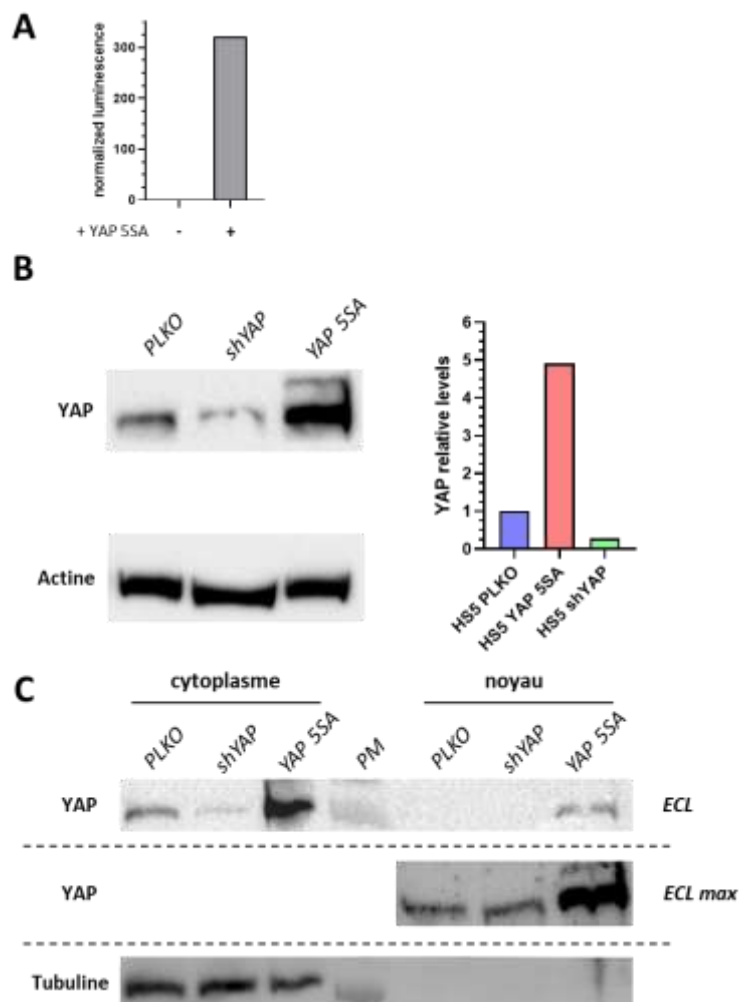


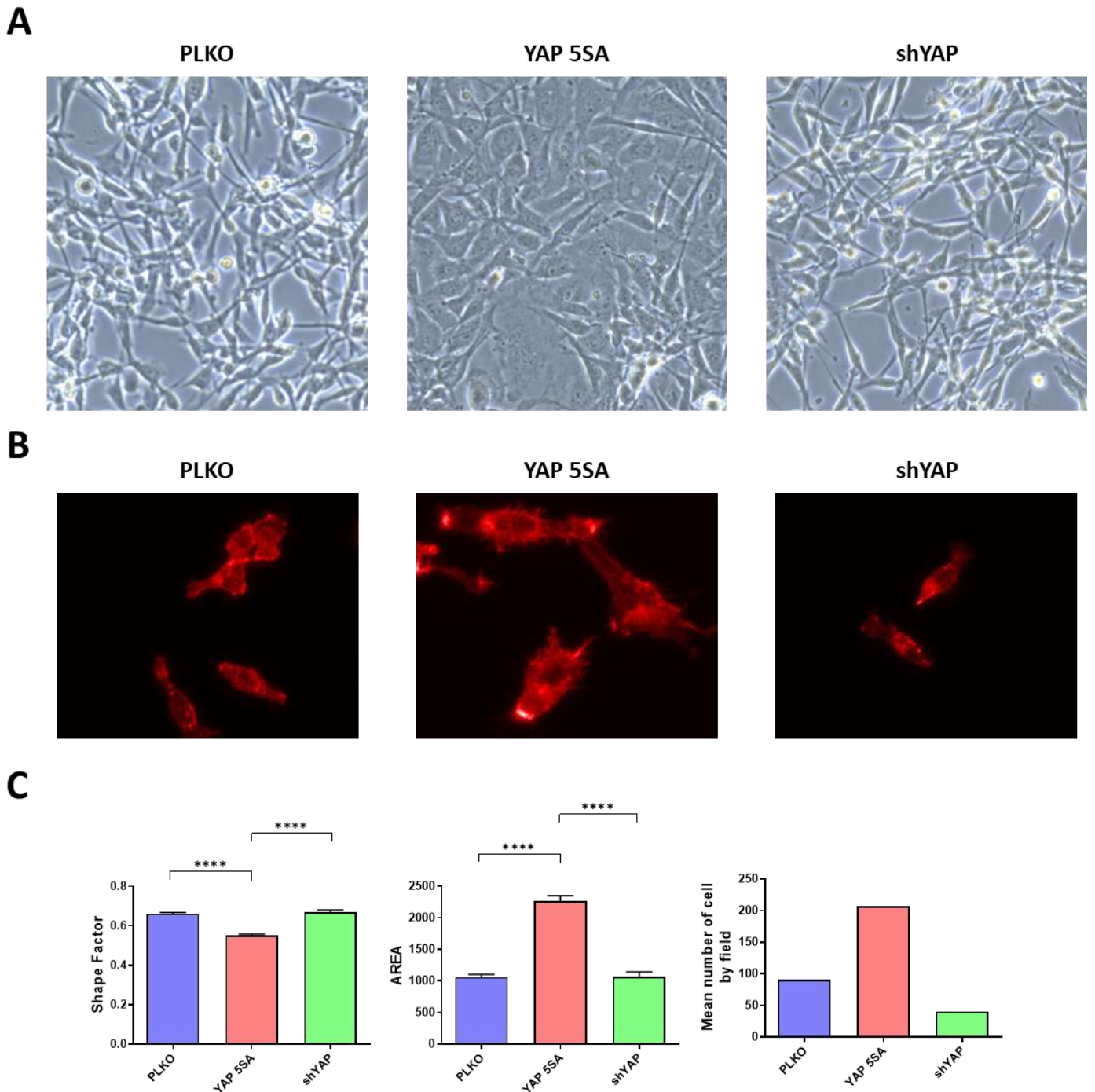
Figure 17. **Modulation de YAP dans les lignées stables HS-5.** (A) Système rapporteur HIP/HOP dans les cellules stromales HS-5 exprimant le mutant YAP 5SA. Le signal mesuré est le reflet de l'activité transcriptionnel de YAP dans les cellules HS-5. Le signal des HS-5 exprimant le mutant YAP 5SA (transitoire) a été normalisé par le signal des cellules HS-5 non transfecté. Expérience réalisée une fois

(n=1). **(B)** Mesure des niveaux de la protéine YAP dans des lysats totaux de cellules HS5 transduites avec différents vecteurs viraux. L'actine est utilisée comme contrôle de charge. La figure de droite montre l'analyse densitométrique des bandes observées, exprimée en niveaux relatifs après normalisation sur l'actine. **(C)** Etude de la localisation de YAP dans les lignées stables HS-5 PLKO, shYAP et YAP 5SA. Les niveaux de YAP ont été évalués par western blot à la suite d'un fractionnement cytoplasme/noyau. Les échantillons nucléaires ont été développés avec un réactif plus sensible (ECL MAX) pour améliorer la détection du signal faible de YAP. La membrane est identique à celle utilisée pour la détection cytoplasmique (ECL), exposée différemment. La tubuline a été utilisée comme contrôle cytoplasmique. L'image est représentative de trois expériences indépendantes (n=3).

#### D. Rôle de YAP sur la morphologie des cellules stromales HS-5

Après avoir mis en évidence dans les cocultures le changement de forme des cellules HS-5 et l'activation de la voie Hippo dans ces dernières, nous avons exploré le lien entre le niveau d'expression de YAP et le remodelage morphologique. Bien que les observations en microscopie optique n'aient pas révélé de différences morphologiques particulières entre les HS-5 PLKO et shYAP, les cellules HS-5 YAP 5SA présentent une morphologie plus aplatie et étendue que les cellules contrôles (Figure 18A). La réduction d'intensité lumineuse observée dans la condition YAP 5SA, en dépit de conditions d'acquisition identiques, suggère une modification des propriétés optiques locales du microenvironnement cellulaire. Ce phénomène pourrait résulter de changements dans la composition ou l'organisation de la matrice extracellulaire (MEC), connus pour influencer l'indice de réfraction et la diffusion de la lumière au sein des tissus. En effet, des études antérieures ont établi que des variations dans la densité fibrillaire, la teneur en collagène ou la réticulation de la MEC peuvent altérer la transmission optique et générer des contrastes en microscopie à lumière transmise<sup>521,522</sup>.

Afin d'apprécier plus finement les modifications morphologique et cytosquelettique, une approche par immunofluorescence a été effectuée et les paramètres de Shape Factor et Surface ont été évalués (Figure 18B).



**Figure 18. Rôle de YAP dans la morphologie des cellules stromales.** (A) Images en microscopie optique des cellules HS-5 PLKO, shYAP et YAP 5SA après 24h de monoculture. Photographies prises numériquement à partir d'un grossissement x10. (B) Coloration par phalloïdine des filaments d'actine (F-actine) dans les cellules HS-5 exprimant un vecteur contrôle (PLKO), un shRNA anti-YAP (shYAP) ou YAP 5SA. Les images montrent des variations morphologiques et organisationnelles du cytosquelette d'actine selon le niveau d'activité de YAP. Chaque image correspond à un champ représentatif de la forme des cellules observé lors d'une seule expérience (n = 1). (C) Calcul du Shape Factor, de la Surface (Area) et du nombre de cellules par champs (4 champs par conditions) des cellules HS-5 à partir des

*images obtenues en immunofluorescence (B). Le calcul des différents paramètres a été réalisé automatiquement à l'aide du logiciel ImageJ. Test statistique Mann-Whitney. Les barres d'erreurs indiquent la moyenne  $\pm$  SEM. P-value \*\*\*\*  $< 0.0001$ .*

Les cellules YAP 5SA présentent une morphologie plus étalée, récapitulée par un Shape Factor diminué et une surface (Area) augmenté de façon significative par rapport aux cellules contrôle (Figure 18C). Ainsi, ces observations confirment que la quantité et la distribution cellulaire de YAP affectent la morphologie et la surface des cellules.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que lors de la réalisation de ces expériences d'immunofluorescence, nous avons observé un nombre de cellules par champs plus important dans la condition HS5 YAP 5SA comparativement aux autres conditions (Figure 18C). Cette observation suggère que les cellules YAP 5SA adhèrent de façon plus stable au support en verre utilisé pour l'immunofluorescence, notamment par une régulation des molécules d'adhésion ou des constituants de la matrice extra cellulaire.

### E. Implication de YAP (stromal) dans la viabilité et l'adhésion des B-LLC

La LLC est caractérisée par une rétention des cellules tumorales par les cellules du microenvironnement, ce qui permet de prolonger la survie et favoriser la prolifération des cellules leucémiques au sein du microenvironnement<sup>483,484,523</sup>. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la rétention et l'adhésion des cellules B-LLC aux cellules HS-5, nous avons étudié l'impact de la modulation des niveaux d'expression de YAP dans les cellules HS-5 sur la survie et l'adhérence des cellules B-LLC. En effet, bien que les régulateurs en amont de la voie Hippo/YAP restent en grande partie méconnus, les phénomènes d'adhésion cellulaire sont aujourd'hui considérés comme des régulateurs majeurs de cette voie de signalisation<sup>271,325,524,525</sup>.

Après avoir mis les cellules HS-5 transgéniques (PLKO, shYAP et YAP 5SA) en coculture avec des cellules B-LLC primaires pendant 72h, nous avons évalué le pourcentage de cellules B-LLC vivantes dans chaque coculture par cytométrie en flux par mesure de l'Annexin V et du 7-AAD sur la sous-population CD90<sup>neg</sup>/CD19<sup>pos</sup> (Figure 19A). L'utilisation d'Annexin V et de 7-AAD permet de distinguer les cellules mortes (double positives) des vivantes (double négatives). La figure 19B montre que le taux de viabilité des cellules B-LLC en coculture avec les différentes cellules HS-5 ne varie pas de façon significative. Ces résultats suggèrent que les niveaux de YAP stromales n'ont pas d'impact sur la survie des cellules B-LLC.

Nous avons précédemment mis en évidence le caractère dynamique et rapide de l'adhésion des B-LLC sur les cellules HS-5<sup>445</sup>. Dans ce contexte, nous avons évalué la capacité d'adhésion des cellules B-LLC primaires sur les différentes cellules HS-5 transgéniques lors de cocultures de 4h. Pour cela, le nombre de B-LLC primaires présentes dans la fraction adhérente a été déterminé par comptage au bleu Trypan puis exprimé en pourcentage par rapport à la totalité des cellules B-LLC présente dans les puits (fraction adhérente + non adhérente) (Figure 19C). De manière intéressante, nous avons pu constater une augmentation significative du pourcentage de B-LLC ayant adhéré aux cellules HS-5 YAP 5SA comparativement aux cellules contrôles (PLKO). Ces résultats suggèrent que la localisation nucléaire de YAP favoriserait l'adhésion des cellules B-LLC. Néanmoins, des expériences complémentaires à l'aide de traceurs cellulaires fluorescent sont prévus pour confirmer ces résultats.

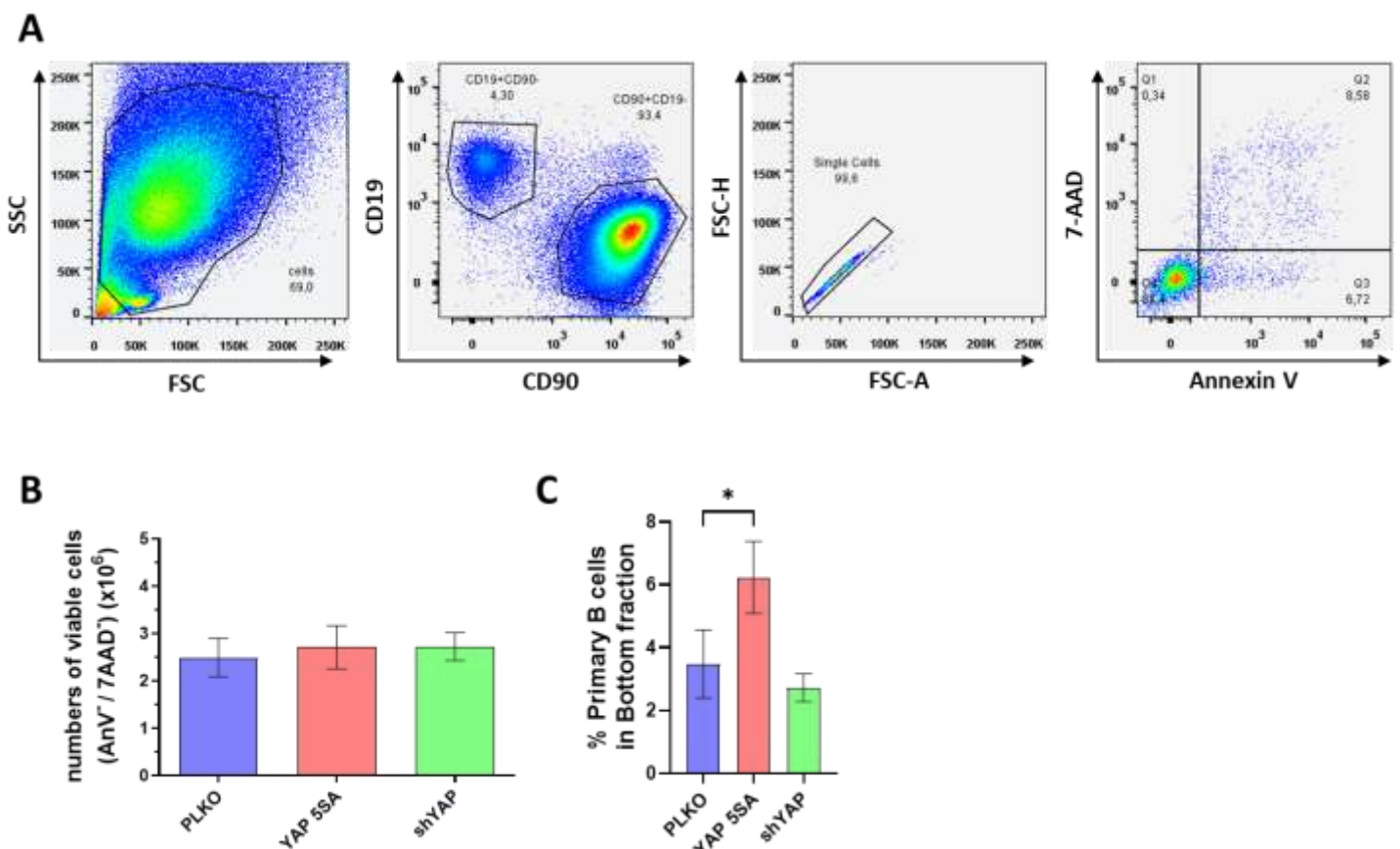


Figure 19. Rôle de YAP (stromal) dans la survie et l'adhésion des cellules B-LLC primaires. (A) Les cellules B-LLC primaires ont été cocultivées pendant 72 h avec des cellules stromales HS-5 PLKO, shYAP ou 5SA. Stratégie de gating représentative utilisée pour évaluer la viabilité des cellules B dans les différentes cocultures. La caractérisation des cellules B-LLC vivantes a été réalisée à partir de la taille des cellules (FSC/SSC), de l'expression du marqueur CD19 et de l'exclusion des doublets (FSC-

A/FSC-H). **(B)** Le nombre de cellules B vivantes (Annexin V<sup>-</sup> / 7-AAD<sup>-</sup>) a été déterminé à partir des proportions obtenues par cytométrie en flux et des comptages cellulaires réalisés au bleu Trypan dans les fractions adhérentes et non adhérentes des cocultures. Les données sont issues de six expériences biologiques indépendantes (n=6). Les barres d'erreurs indiquent la moyenne ± SEM. Aucune différence significative n'a été observée entre les conditions (test de Wilcoxon apparié). **(C)** Pourcentage de cellules B-LLC retrouvées dans la fraction adhérente après coculture avec différentes lignées de cellules HS-5. Des cocultures de 4 heures ont été réalisées entre des cellules B-LLC primaires et des cellules HS-5 PLKO, shYAP, ou YAP 5SA. Le pourcentage de cellules B-LLC retrouvées dans la fraction adhérente a été déterminé par comptage au bleu Trypan, en exploitant la différence de taille cellulaire pour discriminer les cellules B-LLC des cellules HS-5. Le pourcentage correspond à la proportion de cellules B-LLC adhérentes rapportée au nombre total de cellules B-LLC (adhérentes + non adhérentes) par puit. Les données sont issues de six expériences biologiques indépendantes (n=6). Test statistique Wilcoxon. Les barres d'erreurs indiquent la moyenne ± SEM. P-value \* < 0.05.

## F. Rôle de YAP et de la coculture dans l'expression des protéines d'adhésion par les cellules HS-5 transgénique

Suite à l'observation d'une meilleure adhérence des cellules B-LLC sur les cellules HS-5 exprimant la forme mutée YAP 5SA, nous avons émis l'hypothèse que cette mutation pouvait moduler l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules stromales, facilitant ainsi les interactions cellule-cellule. Afin d'explorer cette possibilité, nous avons évalué par cytométrie en flux dans les différentes cellules HS-5, l'expression membranaire de protéines d'adhésion clés telles que l'intégrine  $\beta$ 1 (CD29), l'intégrine  $\alpha$ 4 (CD49d), ICAM-1 (CD54) et Thy-1 (CD90). Ces molécules ont été choisies en raison de leur rôle bien établi dans l'adhésion cellulaire et l'interaction avec les cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral<sup>526,527,528,529</sup>.

Le niveau d'expression membranaire des intégrines  $\beta$ 1 (CD29) et  $\alpha$ 4 (CD49d) ainsi que celui d'ICAM-1 (CD54) ne montre pas de différence significative entre les différentes conditions, que les cellules HS-5 aient été cultivées seules ou en présence des cellules B-LLC (Figure 20A). En revanche, une augmentation significative du niveau d'expression membranaire de Thy-1 (CD90) est observé dans les cellules HS-5 YAP 5SA comparativement aux cellules HS-5 PLKO contrôle (Figure 20B). A l'inverse, des niveaux plus bas de CD90 ont été retrouvé dans les HS-5 shYAP comparativement aux cellules HS-5 contrôles. Ces résultats suggèrent que YAP pourrait moduler l'expression de CD90 et des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ce résultat et déterminer si cette régulation s'effectue au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Il est important de souligner que la molécule Thy-1

(CD90) est utilisé comme marqueur de cellules stromales. Ainsi la modulation de son niveau d'expression pourrait refléter un processus de différenciation qui serait dépendant de YAP.

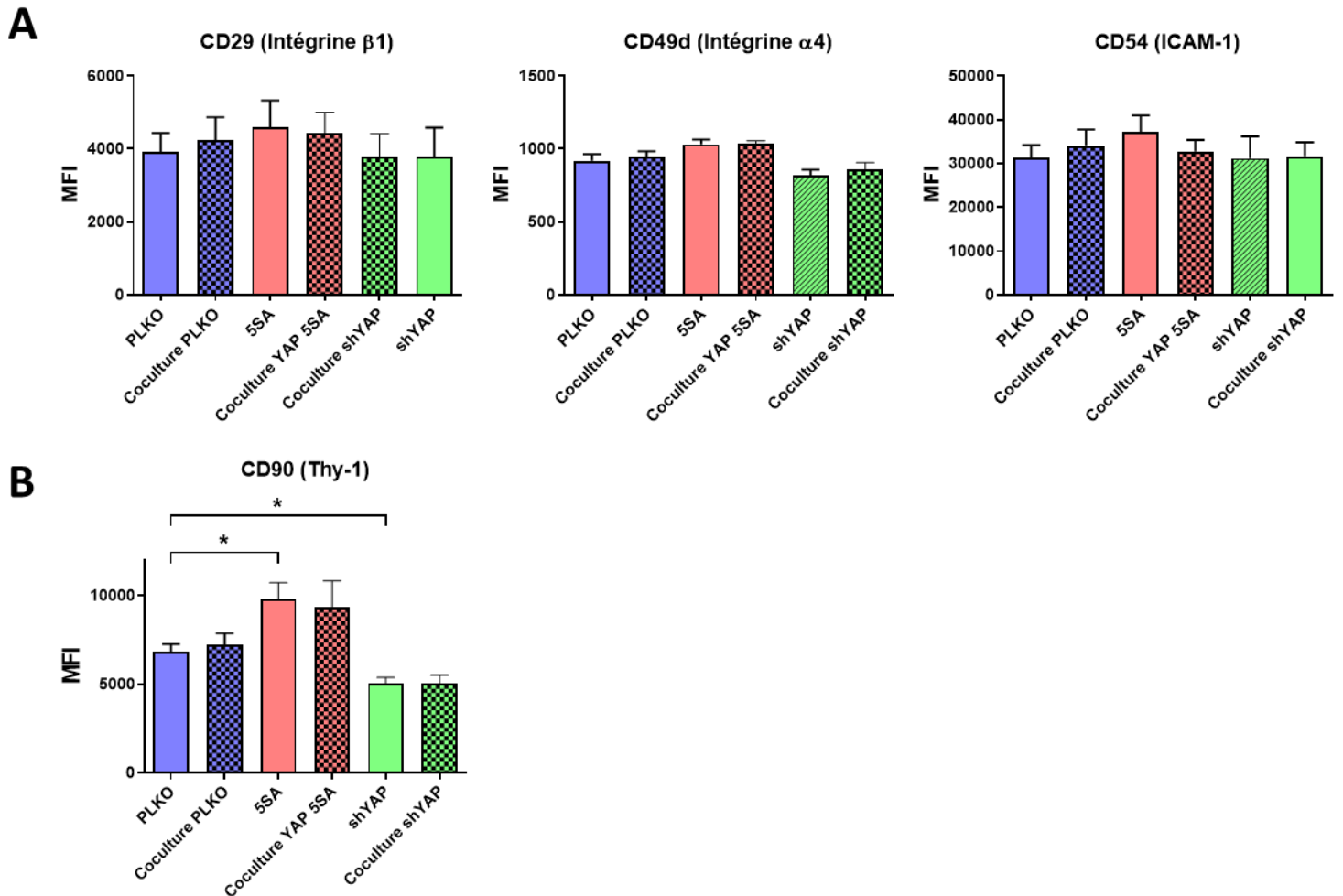


Figure 20. Analyse de l'expression membranaire des protéines d'adhésion dans les lignées HS-5 transgéniques en présence ou non de cellules B-LLC primaire (cytométrie en flux). (A) Expression de surface des intégrines CD29, CD49d et de la molécule d'adhésion CD54 dans les lignées HS-5 PLKO, shYAP et YAP 5SA, en culture seule ou après 24h de coculture avec des cellules B-LLC primaires (ratio 1 HS-5 : 10 B-LLC). Les résultats sont présentés sous forme de barplots de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI)  $\pm$  SEM mesurée par cytométrie en flux. (B) Expression membranaire de CD90 (Thy-1) analysée dans les mêmes conditions expérimentales. L'ensemble de ces données sont issues de 6 expériences biologiques indépendantes. Test statistique Mann-Whitney. Les barres d'erreurs indiquent la moyenne  $\pm$  SEM. P-value \* < 0.05.

## G. Modulation des complexes d'adhésion focaux dans les lignées HS-5 transgéniques

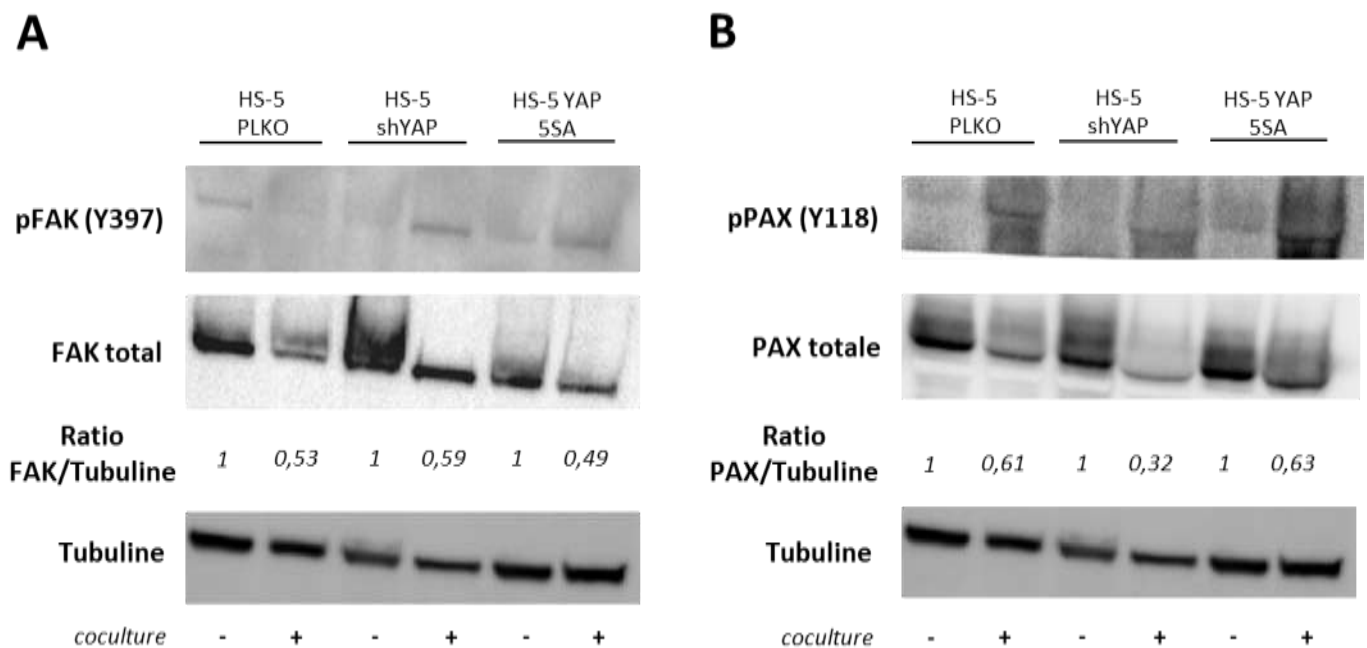
En parallèle de l'analyse des molécules d'adhésion membranaires, nous avons exploré les mécanismes intracellulaires pouvant sous-tendre les différences observées d'adhérence des cellules B-LLC sur les cellules HS-5 en fonction du statut d'activation de YAP dans ces dernières. Les complexes d'adhésion focaux, organisés autour des protéines FAK et Paxilin, assurent la liaison mécanique et fonctionnelle entre les intégrines membranaires et le cytosquelette d'actine<sup>329,330</sup>.

La phosphorylation de FAK sur le résidu tyrosine 397 (Y397) constitue un événement précoce et essentiel pour son activation, permettant notamment le recrutement de la kinase Src et la propagation du signal d'adhésion<sup>530</sup>. De même, la phosphorylation de la paxilline sur la tyrosine 118 (Y118) est impliquée dans la régulation de la dynamique des points focaux, en facilitant l'interaction avec d'autres composants du complexe et l'organisation du cytosquelette<sup>531,532</sup>.

Dans ce contexte, l'état d'activation ainsi que la forme totale des protéines FAK et PAX dans les cellules HS-5 shYAP et YAP 5SA, en présence ou non de cellules B-LLC, ont été évalués par western blot (Figure 21A-B). Les résultats montrent une diminution notable, d'environ deux fois, des niveaux de la forme totale de la protéine FAK dans les trois types de cellules HS-5 transgéniques cocultivées avec des cellules B-LLC (Figure 21A). Des résultats comparables ont été obtenus pour la protéine PAX (Figure 21B). Ces données suggèrent que la diminution de l'abondance des formes totales de FAK et de PAX serait principalement induite par la présence des cellules B-LLC, indépendamment du statut d'expression de YAP dans les cellules HS-5. Ainsi, la coculture semble exercer une influence directe sur l'organisation des complexes d'adhésion focale, traduisant possiblement un remodelage de ces structures en réponse aux signaux émis par les cellules leucémiques.

L'analyse des formes phosphorylées de FAK et PAX ne montre pas de modulation aussi nette que celle des formes totales (Figure 21A et 21B). Cependant, ces résultats laissent tout de même des indications sur une modulation subtile de l'état d'activation de ces protéines. Il n'est pas possible à ce stade de conclure avec certitude quant à une activation fonctionnelle des complexes d'adhésion focale dans ce contexte. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour explorer plus en détail cet aspect.

Néanmoins, l'ensemble de ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle le microenvironnement tumoral, notamment par l'intermédiaire des cellules stromales, contribuerait à la régulation fine des interactions entre les cellules leucémiques et le compartiment cellulaire du microenvironnement tumoral. Ce processus pourrait notamment impliquer une modulation quantitative des composants constituant les complexes d'adhésion, susceptible d'affecter leur dynamique et leur stabilité.

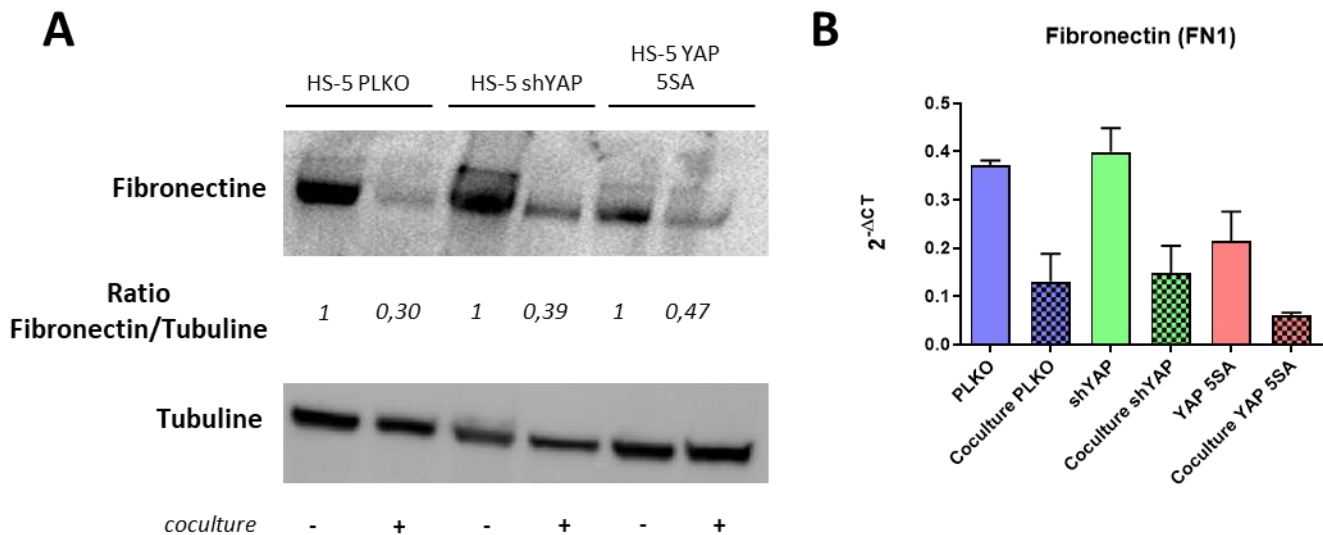


**Figure 21. Modulation des complexes d'adhésion focaux dans les lignées stromales HS-5 transgéniques après coculture avec des cellules B-LLC.** Analyse par Western blot de l'expression protéique de (A) FAK et phospho-FAK (Y397) et (B) de PAX et phospho-PAX (Y118) dans les cellules HS-5 PLKO, shYAP et YAP 5SA après coculture de 24h avec des cellules B-LLC (lignée MEC). Les cellules HS-5 ont été triées magnétiquement à l'issue de chaque culture. La tubuline est utilisée comme contrôle de charge dans l'ensemble des résultats présentés. Les valeurs sous chaque bande représentent la quantification par densitométrie de la protéine cible, normalisé par le contrôle de charge et exprimé relativement à la condition contrôle correspondante. Chaque condition de coculture a été normalisé par son équivalent en monoculture. L'ensemble des résultats de la figure sont représentatifs de 3 expériences indépendantes (n=3).

## H. Modulation de la fibronectine dans les cellules HS-5 transgéniques

Les travaux menés par l'équipe de Piccolo et al. en 2011 ont montré que YAP se localise dans le noyau et devient transcriptionnellement actif lorsque les cellules sont cultivées sur une matrice rigide, alors qu'il est retenu dans le cytoplasme à l'état inactif sur une matrice souple<sup>267</sup>. Les analyses protéomiques et transcriptomiques précédemment réalisés dans le laboratoire ont mis en évidence, dans les cellules HS-5 en coculture, une diminution de l'expression de certains constituant de la matrice extracellulaire tels que le collagène type VI alpha 2 (COL6A2) et la Fibronectine (FN1). De plus, une augmentation d'enzymes impliquées dans la maturation du collagène et, de manière plus globale, dans le remodelage de la matrice extracellulaire (COLGALT1, PLOD1, Tenascine) a également été observée dans ces études omiques. Nous avons donc analysé les niveaux d'expression de la fibronectine, une glycoprotéine majeure de la MEC, largement impliquée dans l'adhésion, la migration et la survie cellulaire. Elle interagit directement avec les intégrines, notamment VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ) et VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$ ) exprimées par les cellules hématopoïétiques, facilitant ainsi leur ancrage au stroma<sup>533,534</sup>.

Les figures 22A et 22B montrent une diminution de l'expression de la fibronectine, à la fois au niveau protéique et transcriptionnel, dans l'ensemble des cellules HS-5 transgéniques cocultivées avec les cellules B-LLC. De plus, en absence de coculture, les niveaux de fibronectine apparaissent plus faibles, à la fois au niveau protéique et transcriptionnel, dans les cellules HS-5 YAP 5SA comparativement aux cellules contrôles et shYAP (Figure 22A et 22B). Ces résultats suggèrent que l'activation constitutive de YAP pourrait contribuer à une réduction de l'expression basale de fibronectine. De plus, la diminution du niveau d'expression de la fibronectine induite par les cellules tumorales dans les cellules stromales sous-tend l'hypothèse d'un remodelage de la MEC qui pourrait être dépendant de YAP.



**Figure 22. Expression de la fibronectine dans les cellules stromales HS-5 transgéniques en présence ou non de cellules B-LLC. (A)** Analyse par Western blot des niveaux de fibronectine dans les lignées HS-5 PLKO, shYAP et YAP 5SA en culture seule ou après 24 h de coculture avec des cellules B-LLC (lignée MEC). Les cellules HS-5 ont été triées magnétiquement à l'issue de chaque culture. La tubuline est utilisée comme contrôle de charge. Les valeurs sous chaque bande représentent la quantification par densitométrie de la protéine cible, normalisée par le contrôle de charge et exprimé relativement à la condition contrôle correspondante. Résultat représentatif de trois expériences indépendantes (n=3). **(B)** Analyse par qRT-PCR du niveau d'expression transcriptionnelle de FN1 (Fibronectine) dans les mêmes conditions, après extraction de l'ARN des cellules HS-5 triées. L'expression a été normalisée au gène de référence B2M. Les résultats sont représentés sous forme de barplots (moyenne ± SEM) à partir de deux expériences biologiques indépendantes (n=2).

### I. Modulation des caténines dans les lignées HS-5 transgéniques

Dans le prolongement de notre exploration des mécanismes impliqués dans l'augmentation de l'adhésion des cellules B-LLC aux cellules HS-5 exprimant YAP 5SA, nous avons élargi notre analyse à un autre aspect fondamental de cette interaction. Nous nous sommes spécifiquement intéressés au remodelage mécanique et morphologique des cellules stromales induit par les contacts directs avec les cellules tumorales. Ces contacts mettent en jeu des interactions cadhérines-caténines intracellulaires qui assurent la jonction avec le cytosquelette<sup>535,536,537</sup>.

En l'absence de coculture, nous avons observé une tendance à l'augmentation du niveau basal de l' $\alpha$ -caténine et de la  $\beta$ -caténine dans les cellules HS-5 YAP 5SA comparativement aux cellules contrôles et shYAP (Figure 23A et 23B). De plus, aucune différence n'a été observé entre les conditions contrôle et shYAP. Lorsque les cellules HS-5 sont cocultivées avec des

cellules B-LLC, une tendance à la diminution des caténines  $\alpha$  et  $\beta$  dans toutes les cellules HS-5 transgéniques a également été observée (Figure 23C et 23D).

Ces résultats suggèrent que la surexpression de YAP dans les cellules HS-5 augmente le niveau basal d' $\alpha$ -caténine et de  $\beta$ -caténine. Cette observation est compatible avec l'idée que YAP pourrait moduler l'organisation des jonctions adhérentes, possiblement en renforçant leur stabilité ou leur fonctionnement moléculaire<sup>538,539,540</sup>. Plusieurs études ont démontré que la surexpression de YAP favorisait une stabilisation de l' $\alpha$ -caténine et de la  $\beta$ -caténine dans les jonctions adhérentes<sup>541,542</sup>. Par ailleurs, nos résultats montrent que la coculture avec les cellules B-LLC entraîne une diminution des niveaux d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -caténine dans toutes les conditions de cellules HS-5, indépendamment de l'expression de YAP. Cette tendance reflète un remodelage des jonctions d'adhérence induit par les contacts directs avec les cellules tumorales. Ce phénomène pourrait participer à la réorganisation mécanique ou morphologique des cellules HS-5 observée dans ce contexte, en lien avec l'activation de la voie Hippo déjà documentée lors de stimulations mécaniques ou de pertes de tension intercellulaire.

L'ensemble de ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle les caténines pourraient représenter un point d'intégration entre l'adhérence intercellulaire et la signalisation YAP. Des analyses fonctionnelles complémentaires seraient nécessaires pour déterminer si la régulation des caténines par YAP (ou réciproquement) joue un rôle actif dans l'établissement des interactions cellules B-LLC/cellules HS-5.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que la présence des cellules B-LLC induit des modifications morphologiques notables des cellules stromales HS-5, suggérant un remodelage du cytosquelette. Un protocole de tri magnétique négatif a permis de révéler une diminution de l'activité de la GTPase RhoA dans les HS-5 exposées aux B-LLC. Parallèlement, une activation de la voie Hippo a été mise en évidence par l'augmentation de la phosphorylation de YAP (S127), la réduction de son activité transcriptionnelle (système rapporteur), ainsi que la diminution de l'expression de gènes cibles comme CYR61 et CTGF. Afin de mieux cerner le rôle de YAP, des lignées HS-5 transgéniques exprimant YAP 5SA (forme constitutivement active) ou un shRNA dirigé contre YAP (shYAP) ont été générées. Les cellules YAP 5SA présentent une morphologie plus étalée, une meilleure adhérence au support, ainsi qu'une altération des propriétés optiques de leur environnement immédiat. Bien que la modulation de YAP n'ait pas affecté la survie des cellules B-LLC en coculture, la présence nucléaire de YAP (YAP 5SA) semble favoriser leur adhérence aux cellules stromales. Aucune modification significative n'a été observée concernant l'expression des intégrines  $\beta$ 1,  $\alpha$ 4 ou ICAM-1, mais

une régulation différentielle de CD90 a été notée, avec une augmentation dans les cellules YAP 5SA et une diminution dans les cellules shYAP. L'analyse des protéines d'adhésion focale FAK et PAX a révélé une réduction de leurs formes totales après coculture, quel que soit le statut de YAP. Par ailleurs, la fibronectine est réduite à la fois au niveau protéique et transcriptionnel dans toutes les lignées HS-5 après coculture, et son expression basale est plus faible dans les cellules YAP 5SA. Enfin, une augmentation de l'alpha- et de la beta-caténine a été observée dans les cellules YAP 5SA en condition basale, alors qu'une tendance à la diminution de ces protéines est retrouvée dans l'ensemble des lignées transgéniques après coculture.

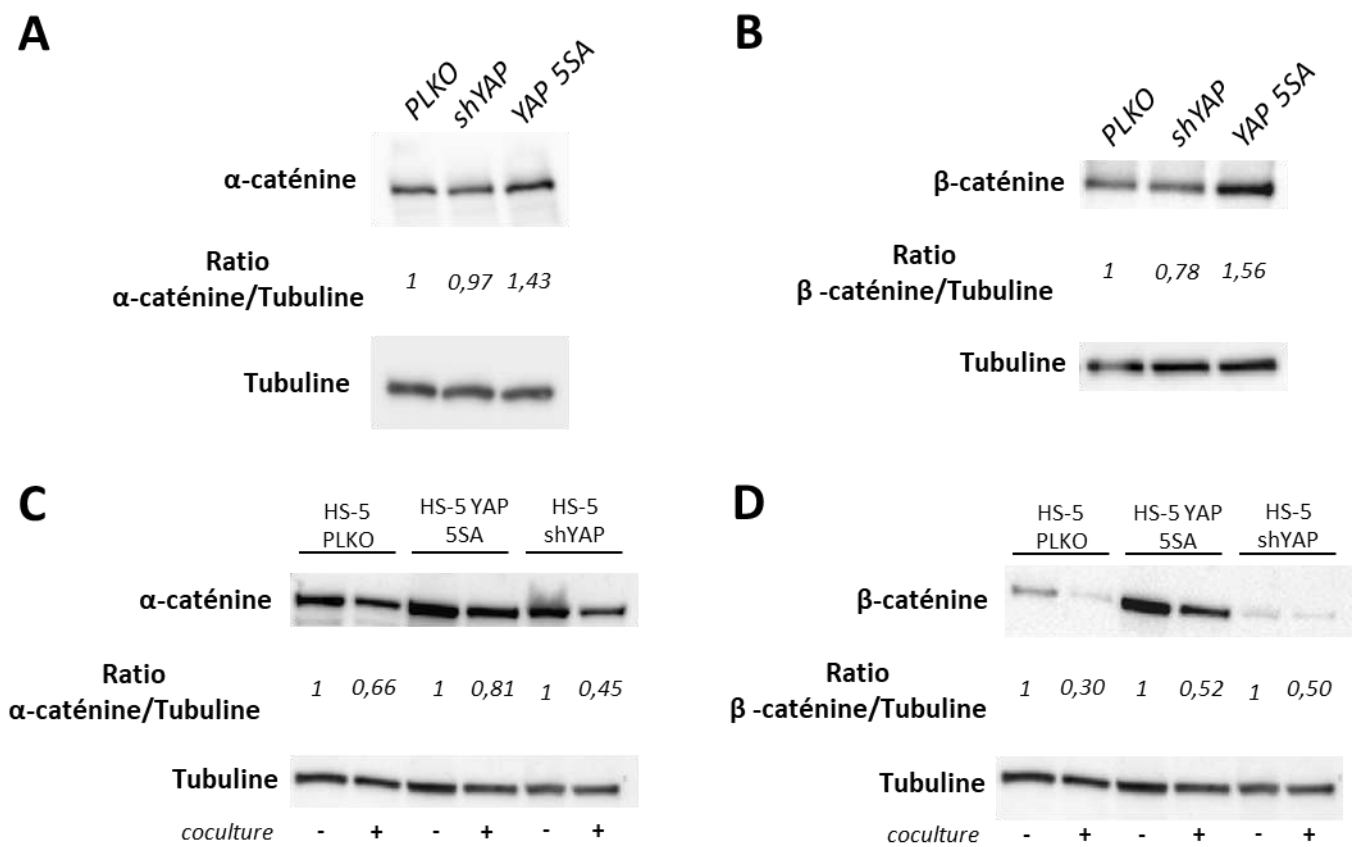


Figure 23. *Modulation des caténines dans les lignées stromales HS-5 transgéniques après coculture avec des cellules B-LLC. (A-B) Analyse par Western blot de l'expression protéique de l'α-caténine (A) et de la β-caténine (B) dans les cellules HS-5 PLKO, shYAP et YAP 5SA en culture seule. Western blot représentatif de 6 expériences indépendantes (n=6). (C-D) Analyse par Western blot de l'expression protéique de l'α-caténine (C) et de la β-caténine (D) dans les cellules HS-5 PLKO, shYAP et YAP 5SA après coculture de 24h avec des cellules B-LLC (lignée MEC). Les cellules HS-5 ont été triées magnétiquement à l'issue de chaque culture. Chaque condition de coculture a été normalisé par son équivalent en monoculture. Western blot représentatif de 3 expériences indépendantes (n=3). (A-D) La tubuline est utilisée comme contrôle de charge dans l'ensemble des résultats présentés. Les valeurs sous*

chaque bande représentent la quantification par densitométrie de la protéine cible, normalisé par le contrôle de charge et exprimé relativement à la condition contrôle correspondante.

## Discussion

La LLC est une hémopathie maligne caractérisée par l'accumulation anormale de lymphocytes B matures dans le sang périphérique, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires. Si les anomalies génétiques et les voies de signalisation intrinsèques aux cellules leucémiques ont été largement étudiées<sup>543,544</sup>, un consensus s'est établi ces dernières années autour du rôle déterminant du microenvironnement tumoral dans le maintien, la progression et la résistance thérapeutique de la maladie<sup>545,546</sup>. Les cellules B-LLC évoluent au sein de niches spécialisées, où elles reçoivent des signaux de survie, de prolifération et de protection contre les agents thérapeutiques. Ces signaux proviennent de cellules du stroma, de cellules immunitaires non tumorales et de la matrice extracellulaire<sup>547,548</sup>. Le dialogue bidirectionnel entre cellules tumorales et microenvironnement s'opère *via* des interactions moléculaires (intégrines, chimiokines, cytokines), mais également *via* des mécanismes plus récents et encore peu caractérisés, tels que la reprogrammation métabolique du stroma ou la modulation de ses propriétés mécaniques.

Dans ce travail de thèse, nous avons exploré ces dimensions émergentes du dialogue leucémie/microenvironnement, en posant l'observation que les cellules B-LLC sont capables de modifier activement leur niche pour en faire un espace favorable à leur survie et leur dissémination. Deux axes complémentaires ont ainsi été développés. Le premier s'est intéressé à la manière dont les cellules B-LLC induisent une reprogrammation glycolytique des cellules stromales, conduisant à la production accrue de lactate – un métabolite utilisé ensuite comme source énergétique<sup>516,517,549</sup>. Le second axe de cette étude est basé sur l'observation selon laquelle l'interaction des cellules B-LLC avec les cellules stromales pourrait induire l'activation de voies de mécano-transduction. Nous avons donc étudié la voie Hippo/YAP connue pour réguler la réponse cellulaire aux signaux mécaniques et régulant la prolifération et la différenciation cellulaire<sup>295,550</sup>.

Bien que ces deux volets aient été traités de façon indépendante, ils s'inscrivent dans une problématique commune : comprendre comment les cellules leucémiques exploitent et modifient leur environnement pour renforcer leur plasticité, leur adaptabilité et leur résilience.

## Axe 1 - Reprogrammation métabolique (Reverse Warburg Effect) des cellules stromales par les cellules B-LLC

Les résultats obtenus dans le premier axe montrent que les cellules B-LLC exercent une influence active sur le microenvironnement, notamment par la reprogrammation métabolique des cellules stromales. En coculture, les cellules stromales présentent une activation transcriptionnelle et protéique de voies métaboliques, en particulier glycolytiques, traduisant une orientation métabolique accrue vers la production de lactate. Ce métabolite est ensuite capté et utilisé par les cellules B-LLC, renforçant leur survie et leur signalisation, via notamment l'activation de la voie BCR. Ces observations s'inscrivent dans le concept du « *Reverse Warburg effect* », où les cellules tumorales induisent un métabolisme glycolytique dans les cellules du stroma pour, en retour, bénéficier de métabolites sécrétés par ces dernières<sup>517,551</sup>.

La captation du lactate par les cellules B-LLC suggère une flexibilité métabolique particulière, cohérente avec leur faible utilisation du glucose comme substrat énergétique primaire<sup>516,552</sup>. En effet, les cellules B-LLC utilisent préférentiellement l'oxydation des acides gras et la glutamine comme source énergétique pour alimenter leur métabolisme mitochondrial<sup>549,553</sup>. Dans notre étude, l'ajout de lactate stimule l'activité métabolique des cellules B-LLC, favorise la signalisation BCR (via BTK, ERK et c-MYC) et confère un avantage de survie *in vitro* et *in vivo* (modèle CAM). En parallèle, le blocage de son importation (*via* l'inhibition de SLC5A12) diminue la survie cellulaire, suggérant que le métabolisme du lactate constitue une cible thérapeutique à explorer dans la LLC. Ce concept est en cours d'évaluation dans d'autres hémopathies, notamment par des inhibiteurs de MCT1 comme l'AZD3965 dans le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL)<sup>554</sup>.

Par ailleurs, nos données transcriptomiques montrent une activation claire de la signalisation du TGF- $\beta$  dans les cellules stromales cocultivées avec les B-LLC. Il a été décrit que le TGF- $\beta$  est impliqué dans la reprogrammation stromale et nos données sont cohérentes avec la littérature qui démontre que les cellules B-LLC produisent des niveaux élevés de TGF- $\beta$ <sup>555,556</sup>. Le TGF- $\beta$  est un inducteur clé de la différenciation des cellules stromales en CAFs et il favorise une reprogrammation métabolique des CAFs avec activation de la glycolyse, production de ROS et sécrétion de métabolites pro-tumoraux<sup>87,557,558</sup>. La convergence entre nos résultats de transcriptomique et ce paradigme suggère que les B-LLC pourraient induire un phénotype CAF-like dans les cellules stromales par l'intermédiaire du TGF- $\beta$  et ce mécanisme mérite une investigation fonctionnelle approfondie.

En lien avec cette hypothèse, notre étude montre que les cellules stromales cocultivées avec les B-LLC présentent une augmentation significative de la production de ROS et de la masse mitochondriale, traduisant un stress oxydatif élevé. Ce phénomène est souvent observé dans les CAFs et associé à une activation de la glycolyse ainsi qu'à une modulation de la signalisation par les ROS<sup>559</sup>. L'augmentation de la masse mitochondriale pourrait refléter une adaptation bioénergétique des cellules stromales afin de soutenir leur activité métabolique, ou encore une altération de la dynamique mitochondriale (fusion/fission). Ces observations ouvrent des pistes importantes : il serait intéressant d'étudier les conséquences de ce stress oxydatif sur la sécrétion de cytokines pro-survie (IL-6 et IL-8 entre autres), le remodelage de la matrice extracellulaire, ou encore sur la communication avec d'autres cellules immunitaires, comme les Tregs ou les macrophages M2, qui sont connus pour être sensibles au lactate et à l'état redox du microenvironnement<sup>560</sup>.

Au travers de cette étude, nous avons pu identifier le lactate comme un composant de la reprogrammation métabolique active des cellules stromales HS-5. Néanmoins, il pourrait être tout à fait intéressant d'élargir l'analyse à d'autres composants ou voies métaboliques potentiellement influencés par les cellules B-LLC. Plusieurs travaux ont montré que les cellules B-LLC exploitent préférentiellement les acides gras comme source de carbone pour alimenter la  $\beta$ -oxydation et la chaîne respiratoire mitochondriale<sup>549,553</sup>. L'exploration de cette dépendance pourrait constituer une piste d'étude intéressante consécutive à nos travaux. Dans ce contexte et bien que les cellules stromales HS-5 présentent une certaine plasticité, elles ne sont pas capables de se différencier fonctionnellement en cellules adipocytaires. Il serait ainsi pertinent d'utiliser des modèles complémentaires, tels que les lignées hMADS ou 3T3-L1 qui sont, connues pour leur capacité à se différencier en un phénotype adipocytaire fonctionnel, notamment *via* l'accumulation de lipides, l'expression de gènes adipocytaires majeurs (PPAR $\gamma$ , aP2, adiponectine), et l'établissement d'une activité métabolique comparable aux adipocytes matures *in vivo*<sup>561,562,563</sup>. L'utilisation d'un tel modèle pourrait permettre de déterminer si les cellules B-LLC sont également capables de détourner à leur profit d'autres voies métaboliques activées dans les cellules du microenvironnement.

Dans la continuité de cette exploration des interactions entre cellules stromales et tumorales, nous avons orienté notre analyse vers une dimension complémentaire à savoir, celle des signaux mécaniques. Contrairement aux investigations métaboliques qui reposaient sur l'exploitation de données omiques réalisées en amont, ce second axe s'appuie sur des travaux antérieurs du laboratoire ayant mis en évidence des propriétés d'adhésion dynamique des cellules B-LLC en

contact avec les cellules stromales<sup>445</sup>. Ces observations suggéraient que les cellules tumorales pourraient également influencer leur environnement cellulaire *via* des contraintes mécaniques locales.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons choisi de nous concentrer sur le rôle mécanosensible de la protéine YAP et plus particulièrement sur son activation dans les cellules stromales en réponse aux contacts avec les cellules B-LLC. Ce second axe, qui est discuté dans le chapitre suivant, explore comment les cellules stromales perçoivent et répondent aux contraintes mécaniques induites par les cellules leucémiques et de l'implication potentielle de YAP dans cette dynamique.

## Axe 2 - Rôle de YAP stromal dans la modulation du microenvironnement des cellules B-LLC

Dans cette seconde partie de notre travail, nous nous sommes attachés à explorer plus spécifiquement le rôle de YAP dans les cellules stromales en réponse à leur interaction avec les cellules B-LLC. L'étude des interactions entre les cellules B-LLC et les cellules stromales HS-5 a mis en évidence une transformation du profil morpho-fonctionnel des cellules HS-5 induite par les cellules tumorales. Lors de cocultures en contact direct de 24 heures, les cellules HS-5 présentent une augmentation de la phosphorylation de YAP sur la sérine 127, un marqueur connu d'inactivation de cette protéine lors de l'activation de la voie Hippo. Ce phénomène s'accompagne d'une diminution de l'activité transcriptionnelle mesurée de YAP ainsi que d'un changement morphologique caractérisé par une augmentation du *shape factor*, indiquant une morphologie plus arrondie et moins étalée. Ces observations suggèrent que les cellules B-LLC induisent une activation de la voie Hippo dans les cellules stromales, conduisant à une rétention cytoplasmique de YAP et à une inhibition fonctionnelle de ses cibles transcriptionnelles. Par ailleurs, ce phénomène est associé à une modification de l'architecture cytosquelettique des cellules stromales, suggérant une altération de leur organisation interne. Ce remodelage cytosquelettique pourrait résulter d'une altération des forces de traction et de la rigidité corticale des cellules stromales, deux propriétés mécaniques connues pour réguler l'activité de YAP<sup>267,268</sup>.

Afin de mieux caractériser les conséquences de la modulation de YAP, des lignées stables de cellules HS-5 ont été développées : les cellules HS-5 shYAP où YAP est invalidé et les cellules HS-5 YAP 5SA dans lesquelles YAP est stabilisé et augmenté dans le noyau mais aussi dans le cytoplasme. Les cellules exprimant le shYAP n'ont montré aucune modification morphologique significative comparée aux cellules contrôle. À l'inverse, l'expression de la forme

constitutivement active de YAP (5SA) conduit à un étalement cellulaire marqué, indice d'une réorganisation du cytosquelette et d'une capacité modifiée d'interaction avec les cellules tumorales. En effet, l'expression constitutive de YAP (5SA) s'accompagne, de manière inattendue, d'une diminution des niveaux protéiques de paxilline et de FAK, deux composants majeurs des jonctions focales. Cette observation contraste avec le phénotype morphologique des cellules caractérisé par un étalement prononcé et une réorganisation du cytosquelette d'actine, généralement associés à une augmentation de la contractilité actomyosine et à une activation des structures d'adhésion<sup>298,564</sup>. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette régulation négative dans un contexte d'activation mécanique accrue. Premièrement, une activation prolongée de YAP pourrait perturber l'équilibre dynamique des adhérences focales en favorisant une maturation excessive ou une résorption accélérée de ces structures, comme cela a été observé dans des systèmes où la tension actomyosine élevée mène à un turnover plus rapide des adhésions<sup>565,566</sup>. Dans ce cas, les protéines précoces comme la paxilline et FAK peuvent être sous-recrutées ou instables. Deuxièmement, il est possible que YAP, bien qu'activé, régule négativement certains composants des complexes d'adhérences focales *via* des mécanismes indirects, incluant l'induction de facteurs transcriptionnels inhibiteurs ou de microARN, comme cela a été décrit dans le cas de la régulation par miR-130 ou miR-29 des gènes codant FAK ou la vinculine<sup>282,567</sup>. Troisièmement, l'activation soutenue de YAP pourrait orienter les forces mécaniques vers d'autres structures, telles que les jonctions cellule-cellule ou les ancrages à l'actine corticale, réduisant l'engagement fonctionnel des jonctions focales classiques<sup>267,568</sup>. Enfin, une régulation post-traductionnelle peut également être considérée, notamment *via* des voies de dégradation médiées par les calpaïnes ou les ubiquitine-ligases, dont l'expression ou l'activité est influencée par YAP/TAZ<sup>295,568</sup>. Ces résultats suggèrent que l'activation de YAP ne module pas simplement la force de traction cellulaire en amplifiant globalement les composants mécano-sensibles, mais qu'elle induit une réorganisation qualitative des structures d'adhésion, probablement par un remodelage différentiel du cytosquelette et de ses points d'ancrage. Afin d'explorer ces hypothèses, plusieurs approches complémentaires peuvent être envisagées. Outre l'analyse transcriptionnelle des gènes PXN (paxilline), PTK2 (FAK) ou VCL (Vinculine), la visualisation de la dynamique des jonctions focales pourrait être réalisée par microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence). Par ailleurs, l'utilisation de la microscopie à force atomique (AFM) permettrait d'évaluer les propriétés mécaniques locales des cellules, notamment leur rigidité corticale, fournissant ainsi des indices sur l'état fonctionnel des complexes d'adhésion en aval de YAP.

Nous avons observé une augmentation significative du nombre de cellules B-LLC ayant la capacité d'adhérer aux cellules HS-5 YAP 5SA comparativement aux lignées PLKO et shYAP. Ce phénotype d'adhésion différentielle entre les cellules HS-5 et HS-5 YAP 5SA nous a encouragé à vérifier l'expression des molécules d'adhésion cellulaire telles que les intégrines qui régulent l'adhérence à la MEC et les caténines impliquées dans l'adhérence cellule-cellule. Nous n'avons pas observé de différences d'expression des intégrines  $\alpha 4$  et  $\beta 1$  ni d'ICAM-1 dans les différentes cellules HS-5. En parallèle, il pourrait être pertinent d'examiner les niveaux d'expression de ces intégrines dans les cellules B-LLC, cocultivées avec les différentes lignées HS-5 transgéniques. En effet, bien que l'expression de ces intégrines ne varie pas significativement dans les cellules HS-5, leur implication dans l'adhésion des cellules B-LLC au microenvironnement médullaire est bien documentée dans la littérature<sup>569,570</sup>. Ainsi, l'augmentation de l'adhérence des B-LLC aux cellules HS-5 YAP 5SA pourrait résulter d'une modulation en trans de l'expression ou de l'activation des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  sur les cellules B-LLC, induite par des signaux provenant des cellules stromales surexprimant YAP.

En revanche, nous avons remarqué une augmentation de l'expression membranaire de CD90 par cytométrie en flux. CD90 (Thy-1) est une glycoprotéine ancrée à la membrane plasmique par un glycosylphosphatidylinositol (GPI). Son expression a été associée à divers processus cellulaires, notamment la modulation des interactions cellule-cellule et la régulation de la réponse mécanique des fibroblastes et cellules stromales à leur environnement. Dans plusieurs contextes, CD90 agit comme un régulateur de la signalisation d'adhésion et de la contractilité, en influençant l'activation de protéines telles que FAK et Src et en modulant le remodelage du cytosquelette d'actine. Il a également été impliqué dans la régulation de la différenciation mésenchymateuse et dans le maintien d'un phénotype fibroblastique actif, sensible aux signaux mécaniques<sup>571,572</sup>. Au-delà de son rôle de senseur mécanique et de modulateur de la signalisation FAK/Src, CD90 interagit directement avec plusieurs intégrines (notamment  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha x\beta 2$  et  $\alpha 5\beta 1$ ) exprimées par les cellules immunitaires ou tumorales, régulant ainsi l'adhésion hétérotypique dans des contextes pathologiques<sup>573,574</sup>. Plusieurs travaux ont également mis en évidence que l'interaction CD90-intégrines peut activer des voies de signalisation pro-adhésives et favoriser la rétention ou la migration des cellules tumorales dans le stroma, participant ainsi à la formation de niches permissives<sup>575</sup>. Ainsi, l'augmentation de CD90 dans les cellules HS-5 YAP 5SA pourrait refléter un état cellulaire dans lequel les cellules stromales pourraient avoir une meilleure capacité à remodeler leur cytosquelette et à interagir activement

avec la matrice extracellulaire. Cette hypothèse est cohérente avec l'activation de YAP qui est un régulateur clé de la mécano-transduction<sup>267</sup>.

En parallèle de l'analyse des molécules d'adhésion exprimées à la membrane, nous avons également analysé l'expression et l'activation des protéines impliquées dans la stabilisation des plateformes d'adhésion intégrine-dépendante, notamment FAK et paxilline. L'étude du complexe d'adhésion focale a mis en évidence un changement très faible des formes phosphorylées (et activées) de ces deux protéines. En revanche, les formes totales de ces protéines varient (diminution) de façon plus prononcée en présence des cellules B-LLC. FAK est une protéine d'échafaudage qui permet l'assemblage de la plateforme qui relie les intégrines au cytosquelette *via* le recrutement de protéines telle que la paxilline<sup>530,576</sup>. La diminution du taux protéique de FAK et de paxilline suggère donc le désassemblage des structures d'adhésions intégrines-dépendantes. Cette désorganisation pourrait favoriser l'invasion des cellules tumorales dans le microenvironnement.

Par ailleurs, cette hypothèse est soutenue par la diminution des niveaux de fibronectine observée dans les cellules HS-5 après coculture. Bien que cette donnée ne reflète pas une évaluation globale de la matrice extracellulaire, elle suggère une altération partielle de sa composition. Une telle réduction, même ciblée, pourrait contribuer à la formation d'une niche plus permissive sur le plan structurel, moins propice à l'ancrage cellulaire stable, et potentiellement favorable à la migration ou à la circulation des cellules B-LLC. De plus, cette hypothèse est renforcée par de précédents résultats du laboratoire qui ont mis en évidence le caractère dynamique et rapide de l'adhésion des cellules B-LLC sur les cellules stromales HS-5 en coculture<sup>445</sup>. Dans ce contexte, la signalisation de YAP pourrait jouer un rôle dans la régulation de FAK, de la fibronectine et de la structure de la matrice avec pour conséquence une modulation de la rétention des cellules B-LLC. En effet, FAK et fibronectine sont diminuées dans les cellules HS-5 YAP 5SA même en absence de cellules LLC, indiquant que la forte expression de YAP pourrait réorganiser la matrice et déstabiliser les interactions cellules-matrice. De plus, la collaboration entre YAP et la beta-caténine au service d'un remodelage de la matrice extracellulaire des fibroblastes de type CAF est bien décrite<sup>577,578</sup>. Lors de nos expériences, une augmentation des niveaux basaux d' $\alpha$ -caténine et  $\beta$ -caténine a été observée dans les cellules HS-5 YAP 5SA, mais ces niveaux diminuent systématiquement après coculture avec les B-LLC. Étant donné le rôle de ces protéines dans les jonctions adhérentes et la régulation du cytosquelette cortical, leur modulation peut contribuer à une modification de l'architecture cellulaire et de la plasticité du réseau stromal. La diminution de ces deux protéines induites par

les B-LLC pourrait refléter une tentative de relâcher leurs contacts avec les cellules stromales, facilitant la dispersion des cellules leucémiques dans la niche. De plus, il a été rapporté dans les modèles de coculture en 2D que les cellules B-LLC sont capables de migrer sous le tapis cellulaire stromal (phénomène de pseudo-empériopolèse)<sup>579</sup>, exploitant ainsi des zones de faibles contacts intercellulaires pour s'abriter au sein de niches protectrices. Ce comportement a été observé tant dans la LLC que dans le Lymphome du Manteau (MCL)<sup>580</sup>, suggérant un mécanisme actif d'infiltration sous-stromales permettant aux cellules tumorales d'échapper aux contraintes immunitaires ou thérapeutique<sup>581</sup>. La diminution des caténines pourrait ainsi faciliter localement cette infiltration, en relâchant l'adhésion entre cellules stromales et en ouvrant des « interstices » permissifs à la migration leucémique. Toutefois, en conditions basales, les cellules YAP 5SA présentent un niveau plus bas de fibronectine que les lignées PLKO et shYAP.

Parallèlement à ces considérations, Thy-1 (CD90) est classiquement utilisée comme marqueur des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) en raison de son expression élevée dans les populations multipotentes non différenciées<sup>497</sup>. La définition des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) inclut leur capacité à se différencier en trois lignages mésodermiques majeurs : les adipocytes, les ostéoblastes et les chondrocytes, représentant ainsi leur multipotence fonctionnelle<sup>582</sup>. Son rôle dans la régulation du destin cellulaire est cependant complexe et contextuel. Plusieurs études ont montré que CD90 participe à la modulation des voies de signalisation clés telles que Wnt/ $\beta$ -caténine et TGF- $\beta$ , impliquées dans la balance entre prolifération et différenciation des MSCs<sup>583,584</sup>. Dans certains modèles, une expression élevée de CD90 est associée à un état indifférencié ou à une faible capacité à s'engager dans des lignées ostéogéniques ou adipogéniques, tandis que sa diminution peut accompagner voire faciliter un engagement plus marqué dans ces voies de différenciation<sup>585</sup>. Ainsi, l'expression de CD90 est souvent considérée comme un marqueur de plasticité ou de rétention dans un état précurseur. Dans notre étude, l'augmentation de CD90 induite par l'activation constitutive de YAP (cellules YAP 5SA) pourrait contribuer à l'établissement d'un état de non-réponse différenciative des cellules stromales. En revanche, la diminution de YAP observée dans les cellules HS-5 « sauvages » (non transgénique) en coculture pourrait refléter un processus de différenciation des cellules stromales, hypothèse également soutenue par la baisse de leur prolifération dans ces conditions.

De manière intéressante, malgré l'ensemble des modifications structurales et moléculaires observées dans les cellules stromales, aucune différence significative de survie des cellules B-LLC n'a été observée à 24h dans les conditions expérimentales testées. Cette donnée indique que les modifications fonctionnelles et phénotypiques des cellules stromales induites par YAP affectent peu la signalisation pro-survie des B-LLC à court terme. L'hypothèse émergente est donc que ces modifications n'ont pas pour objectif de favoriser directement la survie tumorale, mais plutôt de moduler les propriétés spatiales, mécaniques et dynamiques du microenvironnement. En d'autres termes, les cellules B-LLC semblent induire un environnement stromal moins rigide, moins structuré et plus plastique, facilitant une adhésion réversible et une plus grande capacité de migration ou de réorganisation spatiale, sans perturber les apports trophiques fondamentaux.

Ce concept rejoint la distinction entre niches restrictives et niches permissives décrite dans d'autres contextes, notamment dans l'hématopoïèse ou la dissémination métastatique<sup>59</sup>. Dans ces systèmes, des niches faiblement organisées ou à faible tension cellulaire sont associées à une plus grande plasticité cellulaire, favorisant l'adaptation des cellules tumorales face à leur environnement. Le concept d'une niche permissive, mécaniquement relâchée et modulable, rejoint les observations faites dans d'autres modèles où des cellules tumorales exploitent l'élasticité du microenvironnement pour optimiser leur survie, leur migration ou leur résistance thérapeutique<sup>586,587,588</sup>.

Par ailleurs, l'ensemble de nos données expérimentales suggère que YAP joue un rôle central dans la structuration mécanique et d'adhérence des cellules stromales HS-5. Ces données suggèrent également que son inhibition par les cellules B-LLC favorise l'émergence d'un microenvironnement permissif, modulant la plasticité des interactions leucémie/stroma. Bien que la survie cellulaire ne soit pas directement affectée, ces effets pourraient représenter un mécanisme d'adaptation ou de pré-conditionnement des niches stromales en faveur de la dispersion ou de l'échappement thérapeutique des cellules leucémiques. Des études complémentaires explorant la dynamique de migration, l'ancrage dans des environnements mécaniquement définis, ou les effets à long terme sur la quiescence ou la réponse au traitement pourraient permettre de mieux comprendre les implications fonctionnelles de ces observations.

Il est important de souligner que l'ensemble des travaux présentés ici se sont concentrés exclusivement sur la modulation de YAP en tant que principal effecteur de la voie Hippo. Cependant, la littérature décrit que TAZ (WWTR1), paralogue fonctionnel de YAP, peut dans certains contextes biologiques partiellement compenser une inactivation ou une perte de YAP,

en régulant des cibles transcriptionnelles communes ou redondantes et en participant à la régulation de la mécanique cellulaire<sup>273,295</sup>. Ainsi, bien que nos données suggèrent un rôle central de YAP dans la reprogrammation morphologique et d'adhérence des cellules HS-5, l'implication potentielle de TAZ reste à explorer. Il serait particulièrement pertinent d'évaluer l'expression, la localisation subcellulaire et l'activité transcriptionnelle de TAZ dans les lignées transgéniques actuellement utilisées (HS-5 PLKO, shYAP et YAP 5SA). De plus, le développement de nouvelles lignées modifiant l'expression de TAZ, seules ou en combinaison avec YAP, permettrait de déterminer si les effets observés sont exclusivement dus à YAP ou s'ils résultent d'une coopération ou d'une compensation fonctionnelle entre ces deux cofacteurs. Une telle démarche contribuerait à clarifier les mécanismes de régulation mécano-transcriptionnelle dans les cellules stromales en contexte leucémique.

Enfin, bien que les modèles de coculture en 2D aient permis de mettre en évidence des effets robustes et reproductibles sur la morphologie, l'adhésion et la signalisation mécano-sensible des cellules HS-5, il convient de s'interroger sur leur capacité à refléter fidèlement l'organisation tridimensionnelle et la complexité du microenvironnement médullaire des patients atteints de LLC. Les modèles en 2D limitent la distribution spatiale des cellules, contraignent la polarité, et modifient les gradients mécaniques et biochimiques, ce qui peut impacter fortement la signalisation Hippo-YAP/TAZ. En ce sens, le passage à des modèles de coculture en 3D, notamment sous forme de sphéroïdes, pourrait représenter une avancée majeure pour l'étude du rôle de YAP dans un environnement tissulaire plus physiologique. Des travaux récents, menés entre autres par l'équipe du Pr Eldering, ont ainsi démontré la faisabilité et l'intérêt de modèles de sphéroïdes *in vitro* dérivés de PBMC de patients LLC, permettant une meilleure reproduction des interactions cellules-cellules et cellules-matrice et une meilleure prédiction des réponses aux signaux microenvironnementaux<sup>589,590</sup>. Dans le laboratoire, le développement récent de projets doctoraux centrés sur ces approches sphéroïdales ouvre la possibilité de transférer l'analyse de l'axe YAP/TAZ dans un modèle plus biomimétique, et d'explorer de manière plus fine le rôle fonctionnel des cellules stromales dans la structuration des niches leucémiques. Ces perspectives représentent une opportunité précieuse pour affiner notre compréhension des mécanismes mécano-régulés dans la LLC.

## Conclusion

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse illustre la manière dont les cellules B-LLC interagissent avec leur microenvironnement stromal pour en modifier profondément les propriétés, tant sur le plan métabolique que mécanique. Dans un premier temps, nous avons montré que les cellules B-LLC induisent une reprogrammation métabolique active des cellules stromales, favorisant la glycolyse et la production de lactate, un métabolite qu'elles exploitent à leur avantage pour soutenir leur activité mitochondriale et leur signalisation de survie. Ce métabolisme croisé, qui s'apparente au Reverse Warburg Effect, souligne la capacité des cellules leucémiques à façonner leur niche en fonction de leurs besoins bioénergétiques.

Dans un second axe, notre étude a révélé que les cellules B-LLC sont également capables de moduler les propriétés mécaniques du stroma, en altérant la signalisation Hippo et l'activité de son effecteur YAP dans les cellules stromales. L'activation ou l'inhibition de YAP entraîne des remaniements cytosquelettiques, une réorganisation des structures d'adhésion et une modulation de l'expression de marqueurs impliqués dans la plasticité cellulaire et l'interaction cellule-matrice. Ces modifications, bien qu'elles n'impactent pas directement la survie des cellules leucémiques à court terme, pourraient favoriser leur mobilité, leur dispersion ou encore leur échappement aux contraintes thérapeutiques, en contribuant à l'émergence de niches permissives et mécaniquement relâchées.

Au-delà de l'intérêt spécifique de chaque axe, ces deux volets s'inscrivent dans une problématique commune : comprendre comment les cellules B-LLC exploitent et transforment leur environnement pour renforcer leur plasticité et leur résilience. Bien que menées séparément, ces approches pourraient converger à terme, notamment autour de la question du lien potentiel entre mécanosensibilité et métabolisme, un champ émergent dans le domaine de l'oncobiologie. L'existence d'un couplage fonctionnel entre signaux mécaniques (intégrés *via* YAP) et reprogrammation métabolique (notamment glycolytique) a déjà été documentée dans d'autres modèles tumoraux<sup>591,592</sup>, et il serait pertinent d'explorer ces connexions dans le contexte de la LLC.

Les perspectives ouvertes par ce travail appellent à un élargissement des modèles expérimentaux, notamment *via* l'utilisation de modèles tridimensionnels et à l'utilisation de cellules stromales primaires ou d'approches multiomiques intégrées. Ces développements pourraient permettre de mieux décrypter les interdépendances entre signalisation, structure et métabolisme, et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans la LLC.

## Bibliographie

1. **Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011).** *Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, 144(5), 646–674.*
2. **Najafi M, Goradel NH, Farhood B, Salehi E, Solhjoo S, Toolee H, Kharazinejad E, Mortezaee K.** *Tumor microenvironment: Interactions and therapy. J Cell Physiol. 2019 May;234(5):5700-5721.*
3. **Hinshaw, D. C., & Shevde, L. A. (2019).** *The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. Cancer Research, 79(18), 4557–4566.*
4. **Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020).** *The tumor microenvironment. Current Biology, 30(16), R921–R925.*
5. **Belli, C., Trapani, D., Viale, G., D'Amico, P., Duso, B. A., Della Vigna, P., ... & Curigliano, G. (2018).** *Targeting the microenvironment in solid tumors. Frontiers in Immunology, 9, 1279.*
6. **Freireich, E. J., Keating, M., Cabanillas, F., & Barlogie, B. (1984).** *The hematologic malignancies: Leukemia, lymphoma, and myeloma. Cancer, 54(S12), 2741–2755.*
7. **Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013).** *Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nature Medicine, 19(11), 1423–1437.*
8. **Burger, J. A., & Kipps, T. J. (2006).** *CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. Blood, 107(5), 1761–1767.*
9. **Yuan, Y., Jiang, Y. Y., & Lu, W. (2016).** *The functions of tumor-associated macrophages in tumor progression and targeting strategies for tumor therapy. Signal Transduction and Targeted Therapy, 1, 16013.*
10. **Hanahan, D. (2022).** *Hallmarks of cancer: New dimensions. Cancer Discovery, 12(1), 31–46.*
11. **Rebelatto, C. L. K., Aguiar, A. M., Moretão, M. P., Senegaglia, A. C., Hansen, P., Barchiki, F., ... & Oliveira, J. (2008).** *Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. Experimental Biology and Medicine, 233(7), 901–913.*
12. **Heo, S.K., Noh, E.K., Gwon, G.D., Kim, J.Y., Jo, J.C., Choi, Y., et al. (2016).** *LIGHT (TNFSF14) increases the survival and proliferation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. PLOS ONE, 11(11), e0166589.*
13. **Kern, S., et al. (2006).** *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells, 24(5), 1294–1301.*

14. **Chen, Q., et al.** (2016). *Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts?* *Cell Death & Differentiation*, 23(7), 1128–1139.
15. **Frisbie, L., Buckanovich, R. J., & Coffman, L.** (2022). *Carcinoma-associated mesenchymal stem/stromal cells: Architects of the pro-tumorigenic tumor microenvironment.* *Stem Cells*, 40(8), 705–716.
16. **Guo, S., & Deng, C. X.** (2018). *Effect of stromal cells in tumor microenvironment on metastasis initiation.* *International Journal of Biological Sciences*, 14(14), 2083–2093.
17. **Boyd, A. L., Reid, J. C., Salci, K. R., Aslostovar, L., Benoit, Y. D., Shapovalova, Z., ... & Bhatia, M.** (2014). *Identification of leukemia stem cells using a humanized bone marrow xenograft model.* *Nature Biotechnology*, 32(5), 493–501.
18. **Wang, Q., Wang, Y., Meng, Y., Chen, X., Xu, H., & Yang, W.** (2023). *Targeting Cancer-Associated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment.* *Cancers*, 15(9), 2489.
19. **Akanda, M. R., Ahn, E. J., Kim, Y. J., Salam, S. M. A., Noh, M. G., & Park, S. H.** (2023). *Analysis of stromal PDGFR- $\beta$  and  $\alpha$ -SMA expression and their clinical relevance in brain metastases of breast cancer patients.* *BMC Cancer*, 23, 1220.
20. **Joshi, R. S., Kanugula, S. S., Sudhir, S., Pereira, M. P., Jain, S., & Goel, A.** (2021). *The role of cancer-associated fibroblasts in tumor progression.* *Cancers*, 13(6), 1399.
21. **Dzobo, K., & Dandara, C.** (2020). *Architecture of Cancer-Associated Fibroblasts in Tumor Microenvironment: Mapping Their Origins, Heterogeneity, and Role in Cancer Therapy Resistance.* *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 24(8), 455–470.
22. **Biffi, G., & Tuveson, D. A.** (2021). *Diversity and biology of cancer-associated fibroblasts.* *Physiological Reviews*, 101(1), 147–176.
23. **Naito, Y.** (2025). *How Do Cancer Cells Create Cancer-Associated Fibroblast Subtypes? Impacts of Extracellular Vesicles on Stromal Diversity.* *Cancer Science*.
24. **Ding, Z., Shi, R., Hu, W., Tian, L., Sun, R., Wu, Y., et al.** (2023). *Cancer-associated fibroblasts in hematologic malignancies: elucidating roles and spotlighting therapeutic targets.* *Frontiers in Oncology*, 13, 1193978.
25. **Franco, C. A., et al.** (2020). *Dynamic endothelial cell rearrangements drive developmental vessel regression.* *Nature Cell Biology*, 22(7), 1037–1051.
26. **Vacca, A., Ria, R., Ribatti, D., Semeraro, F., Djonov, V., et al.** (2003). *A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma.* *Haematologica*, 88(3), 176–185.
27. **Nowak, M., & Klink, M.** (2020). *The role of tumor-associated macrophages in the progression and chemoresistance of ovarian cancer.* *Cells*, 9(5), 1299.

28. **Boutilier, A. J., & Elsawa, S. F. (2021).** *Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. International Journal of Molecular Sciences, 22(13), 6995.*
29. **Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Méndez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., Battista, M., Leboeuf, M., Prophete, C., van Rooijen, N., Tanaka, M., Merad, M., & Frenette, P. S. (2011).** *Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. Journal of Experimental Medicine, 208(2), 261–271.*
30. **Cencini, E., Fabbri, A., Sicuranza, A., et al. (2021).** *The role of tumor-associated macrophages in hematologic malignancies. Cancers, 13(14), 3597.*
31. **Wang, W., Zou, R., Qiu, Y., et al. (2021).** *Interaction networks converging on immunosuppressive roles of granzyme B: Special niches within the tumor microenvironment. Frontiers in Immunology, 12, 670324.*
32. **Sharma, A., Hooda, V., Akhtar, S. (2024).** *Regulatory T Cells: Mechanisms of Action. In Regulatory T Cells and Autoimmune Diseases, Elsevier.*
33. **Ren, Z., Yang, K., Zhu, L., et al. (2024).** *Regulatory T cells as crucial trigger and potential target for hyperprogressive disease after PD-1/PD-L1 blockade. International Immunopharmacology, 130, 110452.*
34. **Hetta, H., Elkady, A., Tohamy, T., et al. (2016).** *Regulatory B cells: Key players in hepatocellular carcinoma progression. Hepatology: Open Access, 6(3).*
35. **Catalán, D., Mansilla, M. A., Ferrier, A., et al. (2021).** *Immunosuppressive mechanisms of regulatory B cells. Frontiers in Immunology, 12, 611795.*
36. **Shang, J., Zha, H., Sun, Y. (2020).** *Phenotypes, functions, and clinical relevance of regulatory B cells in cancer. Frontiers in Immunology, 11, 582657.*
37. **Jacobs, B., Gebel, V., Heger, L., et al. (2021).** *Characterization and manipulation of the crosstalk between dendritic and natural killer cells within the tumor microenvironment. Frontiers in Immunology, 12, 670540.*
38. **Buckle, I., & Guillerrey, C. (2021).** *Inhibitory receptors and immune checkpoints regulating natural killer cell responses to cancer. Cancers, 13(17), 4263.*
39. **Bozward, A. G., Warricker, F., Oo, Y. H. (2021).** *Natural killer cells and regulatory T cells cross talk in hepatocellular carcinoma: exploring therapeutic options. Frontiers in Immunology, 12, 643310.*
40. **Lian, G., Yu, X., Lan, H. Y. (2021).** *Challenges and recent advances in NK cell-targeted immunotherapies in solid tumors. International Journal of Molecular Sciences, 23(1), 164.*

41. **Kim, N., & Kim, H. S.** (2018). *Targeting checkpoint receptors and molecules for therapeutic modulation of natural killer cells. Frontiers in Immunology, 9*, 2041.
42. **Vetsika, E. K., Koukos, A., & Kotsakis, A.** (2019). *Myeloid-derived suppressor cells: Major figures that shape the immunosuppressive and angiogenic network in cancer. Cells, 8(12)*, 1647.
43. **Wang, Y., Wang, K., Han, G., & Wang, R.** (2020). *PD-L1 expression by MDSCs contributes to the development of gastric cancer. Oncology Reports, 44(4)*, 1361–1371.
44. **Haist, M., Stege, H., Grabbe, S., & Bros, M.** (2021). *The functional role of MDSCs in tumor progression and metastasis. Cancers, 13(7)*, 1750.
45. **Li, C., Zhang, Y., Fan, Z., et al.** (2023). *MDSCs and tumor immune escape: from mechanisms to clinical implications. Cancer Letters, 567*, 216195.
46. **Lu, Y., Zhang, Y., Zhang, J., et al.** (2024). *Immunosuppressive mechanisms of MDSCs and their targeting in cancer immunotherapy. International Journal of Molecular Sciences, 25(3)*, 1212.
47. **Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., & Gabrilovich, D. I.** (2016). *The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. Trends in Immunology, 37(3)*, 208–220.
48. **Hinshaw, D. C., & Shevde, L. A.** (2019). *The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. Cancer Research, 79(18)*, 4557–4566.
49. **Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., Merad, M., ... & Krummel, M. F.** (2018). *Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. Nature Medicine, 24(5)*, 541–550.
50. **Gordon-Weeks, A. N., Lim, S. Y., Yuzhalin, A. E., et al.** (2020). *Tumour-derived laminin  $\alpha 5$  (LAMA5) coordinates stromal cell-dependent immune suppression in the liver metastasis niche. Nature Communications, 11*, 6268.
51. **Juric, D., Lacour, S., Dufies, M., et al.** (2018). *Fibronectin-binding integrins  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha \beta 3$  differentially modulate melanoma cell response to MAPK pathway inhibition. British Journal of Cancer, 118(5)*, 612–620.
52. **Bougherara, H., & Donnadieu, E.** (2015). *Extracellular matrix in the tumor microenvironment impairs T cell migration. Comptes Rendus Biologies, 338(10)*, 619–624.

53. **Nicolas-Boluda, A., & Donnadieu, E.** (2021). *The extracellular matrix in the tumor microenvironment: Barrier or support for T cell infiltration?* *Frontiers in Immunology*, 12, 785915.
54. **Iozzo, R. V., & Sanderson, R. D.** (2011). *Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis.* *Journal of Cell and Molecular Medicine*, 15(5), 1013–1031.
55. **Couchman, J. R.** (2011). *Transmembrane signaling proteoglycans.* *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26, 89–114.
56. **Lu, P., Weaver, V. M., & Werb, Z.** (2011). *The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression.* *Journal of Cell Biology*, 196(4), 395–406.
57. **Sounni, N. E., & Noël, A.** (2013). *Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy.* *Clinical Chemistry*, 59(1), 85–93.
58. **Henke, E., Nandigama, R., & Ergün, S.** (2020). *Extracellular matrix in the tumor microenvironment and its impact on cancer therapy.* *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, 160.
59. **Méndez-Ferrer, S., Bonnet, D., Steensma, D. P., Hoggatt, J., & Méndez-Ferrer, S.** (2020). *Bone marrow niches in haematological malignancies.* *Nature Reviews Cancer*, 20(5), 285–298.
60. **Paggetti, J., Haderk, F., Seiffert, M., et al.** (2015). *Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts.* *Blood*, 126(9), 1106–1117.
61. **Li, W., Zhang, L., Guo, B., Deng, J., Wu, S., Li, F., & Wang, Y.** (2019). *Exosomal FMR1-AS1 facilitates maintaining cancer stem-like cell dynamic equilibrium via TLR7/NF- $\kappa$ B/c-Myc signaling in female esophageal carcinoma.* *Molecular Cancer*, 18, 173.
62. **Maia, J., Caja, S., Strano Moraes, M. C., Couto, N., & Costa-Silva, B.** (2018). *Exosome-based cell-cell communication in the tumor microenvironment.* *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 18.
63. **Kulkarni, A., Chandrasekaran, A., & Natarajan, V.** (2019). *Matrix remodeling and cross talk with tumor-associated macrophages and cancer associated fibroblasts in the tumor microenvironment.* *Frontiers in Oncology*, 9, 769.
64. **Wu, X., Liu, D., Tao, W., Hao, Y., & Li, J.** (2019). *Roles of the tumor microenvironment in resistance to anti-angiogenic therapy: From mechanisms to potential therapeutic strategies.* *Frontiers in Immunology*, 10, 2972.

65. **Goenka, A., Scholz, C., Mikula, M., et al. (2023).** *Soluble factors in tumor–immune crosstalk: current evidence and emerging mechanisms. Trends in Cancer, 9(3), 219–232.*
66. **Kumari, L., Munjal, S., Yadav, R., Kumar, Y., & Others. (2024).** *Cancer stem cell, chromosomal instability, and cancer immunity. Exploration of Immunology, 4(1).*
67. **García-Ortiz, A., Rodríguez-García, Y., Encinas, J., et al. (2021).** *The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. Cancers, 13(2), 217.*
68. **Zhou, Q., Xiao, H., Liu, Y., Peng, Y., Hong, Y., Yagita, H., & Fu, Y. X. (2010).** *Blockade of programmed death-1 pathway rescues the effector function of tumor-infiltrating T cells and enhances the antitumor efficacy of lentivector immunization. The Journal of Immunology, 185(9), 5082–5092.*
69. **Bhardwaj, N., & Ansell, S. M. (2023).** *Immune Modulation in Multiple Myeloma: Role of IL-10 and Myeloid-Derived Suppressor Cells. Frontiers in Oncology, 13, 1085476.*
70. **Teicher, B. A., & Fricker, S. P. (2010).** *CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. Clinical Cancer Research, 16(11), 2927–2931.*
71. **Zhou, J., Zhang, Q., Zhao, S., et al. (2020).** *CCL2 recruited tumor-associated macrophages promote immune escape by regulating the tumor microenvironment. Frontiers in Oncology, 10, 1196.*
72. **Ferrara, N. (2002).** *VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. Nature Reviews Cancer, 2(10), 795–803.*
73. **Desantis, V., Solimando, A. G., Saltarella, I., et al. (2016).** *Microenvironment drug resistance in multiple myeloma: emerging new players. Oncotarget, 7(42), 60698–60718.*
74. **Battle, E., & Massagué, J. (2019).** *Transforming growth factor- $\beta$  signaling in immunity and cancer. Immunity, 50(4), 924–940.*
75. **Giannopoulos, K., Dmoszynska, A., & Kowal, M. (2009).** *TGF-beta1 secretion by leukemic cells contributes to immunosuppressive microenvironment in B-CLL. Leukemia Research, 33(3), 398–404.*
76. **Whiteside, T. L. (2016).** *Tumor-derived exosomes and their role in cancer progression. Advances in Clinical Chemistry, 74, 103–141.*
77. **Corrado, C., Saieva, L., Raimondo, S., Santoro, A. M., Flugy, A., De Leo, G., & Alessandro, R. (2016).** *Chronic myelogenous leukaemia exosomes modulate bone*

- marrow microenvironment through activation of epidermal growth factor receptor. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 20(10), 1829–1839.*
78. **Allegra, A., Petrarca, C., Di Gioacchino, M., Casciaro, M., Musolino, C., & Gangemi, S. (2022).** *Exosome-mediated therapeutic strategies for management of solid and hematological malignancies. Cells, 11(7), 1128.*
79. **Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S., & Weinberg, R. A. (2008).** *Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. Cancer Research, 68(10), 3645–3654.*
80. **Martin, T. A., & Mansel, R. E. (2010).** *Tight junctions and their role in cancer metastasis. International Journal of Molecular Medicine, 26(5), 723–737.*
81. **Chen, D. S., & Mellman, I. (2017).** *Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. Nature, 541(7637), 321–330.*
82. **Tittarelli, A., Mendoza-Naranjo, A., Farías, M., & González, F. E. (2020).** *Tumor-derived exosomes as mediators of immune evasion in cancer. Frontiers in Immunology, 11, 560.*
83. **Aasen, T., Mesnil, M., Naus, C. C., Lampe, P. D., & Laird, D. W. (2016).** *Gap junctions and cancer: communicating for 50 years. Nature Reviews Cancer, 16(12), 775–788.*
84. **Singh, A. K., & Cancelas, J. A. (2020).** *Gap junctions in the bone marrow microenvironment: Connexin 43 modulates hematopoietic stem cell niche. Cell Communication and Adhesion, 27(1), 1–9.*
85. **Allegra, A., Innao, V., Calabrese, C., & Musolino, C. (2022).** *Tunneling nanotubes: Biogenesis, function and role in disease. International Journal of Molecular Sciences, 23(3), 1239.*
86. **Osswald, M., Jung, E., Sahm, F., Solecki, G., Venkataramani, V., Blaes, J., ... & Winkler, F. (2015).** *Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. Nature, 528(7580), 93–98.*
87. **Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012).** *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. Cancer Cell, 21(3), 309–322.*
88. **Kalluri, R. (2016).** *The biology and function of fibroblasts in cancer. Nature Reviews Cancer, 16(9), 582–598.*
89. **Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., et al. (2020).** *A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. Nature Reviews Cancer, 20(3), 174–186.*

90. **Noy, R., & Pollard, J. W.** (2014). *Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy.* *Immunity*, 41(1), 49–61.
91. **Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A., & Thiery, J. P.** (2016). *EMT: 2016.* *Cell*, 166(1), 21–45.
92. **Henke, E., Nandigama, R., & Ergün, S.** (2019). *Extracellular matrix in the tumor microenvironment and its impact on cancer therapy.* *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, 160.
93. **Zhang, L., Zhang, S., Yao, J., et al.** (2015). *Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth.* *Nature*, 527(7576), 100–104.
94. **Luga, V., Zhang, L., Vitoria-Petit, A. M., et al.** (2012). *Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration.* *Cell*, 151(7), 1542–1556.
95. **Öhlund, D., Elyada, E., & Tuveson, D.** (2014). *Fibroblast heterogeneity in the cancer wound.* *The Journal of Experimental Medicine*, 211(8), 1503–1523.
96. **Li, X., Wenes, M., Romero, P., Huang, S. C., Fendt, S. M., & Ho, P. C.** (2019). *Navigating metabolic pathways to enhance antitumour immunity and immunotherapy.* *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(7), 425–441.
97. **Cariello, M., Picardi, A., & Di Mauro, M.** (2022). *Hematopoietic niche and exosome-mediated communication in hematologic malignancies.* *Cancers*, 14(11), 2661.
98. **Solimando, A. G., Vacca, A., Ribatti, D., & Cafforio, P.** (2022). *Cancer-associated fibroblasts and tumor immune escape: Mechanisms and therapeutic perspectives.* *Current Medicinal Chemistry*, 29(18), 3150–3165.
99. **Ikeda, K., & Tagawa, T.** (2021). *Hypoxia and exosomes: A possible mechanism of tumor progression and immunosuppression.* *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 129.
100. **Jacamo, R., & Andreeff, M.** (2015). *The bone marrow microenvironment as a contributor to minimal residual disease in acute myeloid leukemia.* *Frontiers in Oncology*, 5, 107.
101. **Chaudhry, R., & Varacallo, M.** (2018). *Biochemistry, Glycolysis.* In *StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.*
102. **Chandel, N. S.** (2021). *Navigating Metabolism.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN: 978-1-62182-143-1
103. **Akram, M.** (2013). *Glycolysis and the regulation of glucose metabolism.* *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 22(3), 303–308.

104. **Patra, K. C., Hay, N.** (2014). *The pentose phosphate pathway and cancer. Trends in Biochemical Sciences*, 39(8), 347-354.
105. **Krebs, H. A.** (1954). *The tricarboxylic acid cycle. In Chemical Pathways of Metabolism (pp. 125–140).* Elsevier.
106. **Tretter, L., & Adam-Vizi, V.** (2005). *Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360(1464), 2335–2345.
107. **Williamson, J. R., & Cooper, R. H.** (1980). *Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. The Journal of Biological Chemistry*, 255(24), 10800–10808.
108. **Arnold, P. K., & Finley, L. W. S.** (2023). *Regulation and function of mitochondrial metabolism in cell state transitions. Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(4), 276–294.
109. **Nolfi-Donagan, D., Braganza, A., & Shiva, S.** (2020). *Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. Redox Biology*, 37, 101674.
110. **Vercellino, I., & Sazanov, L. A.** (2022). *The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(3), 141–161.
111. **Brand, M. D., & Murphy, M. P.** (1987). *Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. Biological Reviews*, 62(2), 141–193.
112. **Kadenbach, B.** (2021). *Regulation of mammalian 13-subunit cytochrome c oxidase and binding of respiratory supercomplex factor HIGD1A. International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2368.
113. **Kalpage, H. A., Wan, J., Morse, P. T., Zurek, M. P., Turner, A. A., Khobeir, A., ... & Stowe, D. F.** (2020). *Cytochrome c: From stress response to clinical applications. Redox Biology*, 29, 101297.
114. **Beard, D. A.** (2005). *A biophysical model of the mitochondrial respiratory system and oxidative phosphorylation. PLoS Computational Biology*, 1(4), e36.
115. **Mozihim, A. K., Chung, I., Said, N. A. B. M., & Jamil, A. H. A.** (2022). *Reprogramming of fatty acid metabolism in gynaecological cancers: Is there a role for oestradiol? Metabolites*, 12(4), 350.
116. **Panov, A., Orynbayeva, Z., Vavilin, V., & Lyakhovich, V.** (2014). *Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. BioMed Research International*, 2014, Article ID 472459.

117. **Houten, S. M., & Wanders, R. J. A.** (2010). *A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation. Journal of Inherited Metabolic Disease, 33(5), 469–477.*
118. **Fritz, I. B., & Yue, K. T. N.** (1963). *Long-chain carnitine acyltransferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine. Journal of Lipid Research, 4(3), 279–288.*
119. **Kerner, J., & Hoppel, C.** (2000). *Fatty acid import into mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1486(1), 1–17.*
120. **Lynen, F., Henning, U., Ringelmann, E., Kresze, G. B., & Reichert, S.** (1960). *The  $\beta$ -oxidation of fatty acids. Biochemical Journal, 75(2), 312–323.*
121. **Lehninger, A. L.** (1970). *Biochemistry: The Molecular Basis of Cell Structure and Function. Worth Publishers.*
122. **Adeva-Andany, M. M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., & Ameneiros-Rodríguez, E.** (2016). *Glycogen metabolism in humans. BBA Clinical, 5, 85–100.*
123. **Bollen, M., Stalmans, W., & Ceulemans, H.** (1998). *Loss of the hepatic glycogen-binding subunit (GL) of protein phosphatase 1 underlies deficient glycogen synthesis in insulin-dependent diabetic rats and in culture. Biochemical Journal, 333(2), 253–260.*
124. **Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., ... & Kell, D. B.** (2015). *The pentose phosphate pathway: An evolutionary perspective. Cell. Molecular Life Sciences, 72(9), 1793–1820.*
125. **Jiang, P., Du, W., Mancuso, A., Wellen, K. E., & Yang, X.** (2014). *Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. Nature, 493(7434), 689–693.*
126. **Bose, S., Zhang, C., & Le, A.** (2021). *Glucose metabolism in cancer: The Warburg effect and beyond. In Cancer Metabolism: Methods and Protocols (Vol. 1263, pp. 3–16). Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer.*
127. **Hosios, A. M., & Manning, B. D.** (2021). *Regulation of cancer-associated metabolic reprogramming by mTOR and Akt signaling pathways. Current Opinion in Cell Biology, 63, 59–67.*

128. **Courtney, R., Ngo, D. C., Malcontenti-Wilson, C., Schmidt, M., Deboer, D., Ramsay, R. G., & Thompson, E. W. (2015).** *Cancer metabolism and the Warburg effect: The role of HIF-1 and PI3K. Molecular Biology Reports, 42(4), 841–851.*
129. **Bartrons, R., & Caro, J. (2007).** *Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg effect. Trends in Endocrinology & Metabolism, 18(3), 55–60.*
130. **Iheagwam, F. N., Akinyemi, A. J., Ijomone, O. M., & Olaolu, T. D. (2021).** *The crosstalk between MYC and HIF in cancer metabolism: Mechanistic insight and therapeutic perspectives. Biochimie, 185, 71–86.*
131. **Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009).** *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science, 324(5930), 1029–1033.*
132. **DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016).** *Fundamentals of cancer metabolism. Science Advances, 2(5), e1600200.*
133. **Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016).** *The Warburg effect: How does it benefit cancer cells? Trends in Biochemical Sciences, 41(3), 211–218.*
134. **San Martín, A., Sotelo-Hitschfeld, T., Lerchundi, R., et al. (2013).** *Single-cell imaging tools for brain energy metabolism: a review. Neurophotonics, 1(1), 011004.*
135. **Feron, O. (2009).** *Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. Radiotherapy and Oncology, 92(3), 329–333.*
136. **San-Millán, I., & Brooks, G. A. (2017).** *Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. Carcinogenesis, 38(2), 119–133.*
137. **Prado-Garcia, H., Romero-Garcia, S., Aguilar-Cazares, D., Meneses-Flores, M., & Lopez-Gonzalez, J. S. (2020).** *Lactate contribution to the tumor microenvironment: mechanisms, effects on immune cells and therapeutic relevance. Frontiers in Immunology, 11, 2167.*
138. **Miranda-Gonçalves, V., Granja, S., Martinho, O., et al. (2016).** *Hypoxia-mediated upregulation of MCT1 expression supports the glycolytic phenotype of glioblastomas. Oncotarget, 7(30), 46335–46353.*
139. **Halestrap, A. P. (2013).** *The SLC16 gene family—Structure, role and regulation in health and disease. Molecular Aspects of Medicine, 34(2–3), 337–349.*
140. **Payen, V. L., Mina, E., Van Hée, V. F., Porporato, P. E., & Sonveaux, P. (2020).** *Monocarboxylate transporters in cancer. Molecular Metabolism, 33, 48–66.*

141. **Sonveaux, P., Copetti, T., De Saedeleer, C. J., Végran, F., Verrax, J., Kennedy, K. M., ... & Feron, O. (2012).** *Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. PLoS ONE, 7(3), e33418.*
142. **Miranda-Gonçalves, V., & Reis, R. M. (2016).** *Lactate transporters and pH regulation: potential therapeutic targets in glioblastomas. Current Cancer Drug Targets, 16(4), 305–315.*
143. **Sormendi, S., & Wielockx, B. (2018).** *Hypoxia pathway proteins as central mediators of metabolism in the tumor cells and their microenvironment. Frontiers in Immunology, 9, 40.*
144. **Vaupel, P., Schmidberger, H., & Mayer, A. (2019).** *The Warburg effect: Essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. International Journal of Radiation Biology, 95(7), 912–919.*
145. **Höckel, M., & Vaupel, P. (2001).** *Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. Journal of the National Cancer Institute, 93(4), 266–276.*
146. **Labiano, S., Palazón, A., & Melero, I. (2015).** *Immune response regulation in the tumor microenvironment by hypoxia. Seminars in Oncology, 42(3), 378–386.*
147. **Lequeux, A., Noman, MZ., ... & Janji, B. (2019).** *Targeting hypoxia-induced PD-L1 expression in cancer immunotherapy. Cancers, 11(4), 460.*
148. **Augustin, R. C., Delgoffe, G. M., & Najjar, Y. G. (2020).** *Characteristics of the tumor microenvironment that influence immune cell functions: hypoxia, metabolic challenges, and immune evasion. Frontiers in Immunology, 11, 570041.*
149. **Renner, K., Singer, K., Koehl, G. E., Geissler, E. K., Peter, K., & Siska, P. J. (2017).** *Metabolic hallmarks of tumor and immune cells in the tumor microenvironment. Frontiers in Immunology, 8, 248.*
150. **Zhang, S., He, Z. (2021).** *Tumor-associated macrophages and their functional transformation in the hypoxic tumor microenvironment. Frontiers in Immunology, 12, 741305.*
151. **Chiarugi, P., & Cirri, P. (2016).** *Metabolic exchanges within tumor microenvironment. Cancer Letters, 380(2), 272–280.*
152. **Sormendi, S., & Wielockx, B. (2018).** *Hypoxia pathway proteins as central mediators of metabolism in the tumor cells and their microenvironment. Frontiers in Immunology, 9, 40.*

153. **Chang, C.-H., Qiu, J., O'Sullivan, D., Buck, M. D., Noguchi, T., Curtis, J. D., Chen, Q., Gindin, M., Gubin, M. M., van der Windt, G. J. W., Tonc, E., Schreiber, R. D., Pearce, E. J., & Pearce, E. L. (2015).** *Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression.* *Cell*, 162(6), 1229–1241.
154. **Salaroglio, I. C., Belisario, D. C., Akman, M., et al. (2022).** *Mitochondrial ROS drive resistance to chemotherapy and immune-killing in hypoxic non-small cell lung cancer.* *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 41, 305.
155. **Fiaschi, T., & Chiarugi, P. (2012).** *Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison.* *International Journal of Cell Biology*, 2012, Article ID 762825.
156. **Mani, S., Swargiary, G., & Ralph, S. J. (2022).** *Targeting the redox imbalance in mitochondria: A novel mode for cancer therapy.* *Mitochondrion*, 63, 102–114.
157. **Sabharwal, S. S., & Schumacker, P. T. (2014).** *Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?* *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 709–721.
158. **Piskounova, E., et al. (2015).** *Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells.* *Nature*, 527(7577), 186–191.
159. **Lan, X., Li, W., Zhao, K., Wang, J., Li, S., & Zhao, H. (2025).** *Revisiting the role of cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment.* *Frontiers in Immunology*, 16, 1582532.
160. **Cassim, S., & Pouysségur, J. (2019).** *Tumor microenvironment: a metabolic player that shapes the tumor immune contexture.* *Frontiers in Immunology*, 10, 43.
161. **Kedia-Mehta, N., & Finlay, D. K. (2019).** *Competition for nutrients and its role in controlling immune responses.* *Nature Communications*, 10, 2123.
162. **Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2016).** *From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy.* *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 619–634.
163. **Gupta, S., Roy, A., Dwarakanath, B. S., & Chowdhury, R. (2017).** *CAF-secreted lactate and metabolic symbiosis in tumors.* *Cancer Metabolism*, 5, 10.
164. **Lyssiotis, C. A., & Kimmelman, A. C. (2017).** *Metabolic interactions in the tumor microenvironment.* *Cell Metabolism*, 26(1), 22–24.
165. **Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016).** *The emerging hallmarks of cancer metabolism.* *Cell Metabolism*, 23(1), 27–47.

166. **Gilkes, D. M., Semenza, G. L., & Wirtz, D. (2014).** *Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. Nature Reviews Cancer, 14(6), 430–439.*
167. **Schafer, M., & Werner, S. (2008).** *Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 9(8), 628–638.*
168. **Discher, D. E., Janmey, P., & Wang, Y. L. (2005).** *Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. Science, 310(5751), 1139–1143.*
169. **Lecuit, T., & Lenne, P. F. (2007).** *Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8(8), 633–644.*
170. **Frixione, E. (2000).** *Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: A 300-year epic. Cell Motility and the Cytoskeleton, 46(2), 73–94.*
171. **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002).** *Molecular Biology of the Cell (4th ed.). Garland Science.*
172. **Fletcher, D. A., & Mullins, R. D. (2010).** *Cell mechanics and the cytoskeleton. Nature, 463(7280), 485–492.*
173. **Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014).** *Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. Physiological Reviews, 94(1), 235–263.*
174. **Szymanski, D. B., & Staiger, C. J. (2018).** *The actin cytoskeleton: Functional arrays for cytoplasmic organization and cell shape control. The Plant Cell, 30(10), 2311–2326.*
175. **Pollard, T. D., & Goldman, R. D. (2018).** *Overview of the cytoskeleton from an evolutionary perspective. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 10(7), a030288.*
176. **Erickson, H. P. (2007).** *Evolution of the cytoskeleton. BioEssays, 29(7), 668–677.*
177. **Dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., & Nosworthy, N. J. (2003).** *Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. Physiological Reviews, 83(2), 433–473.*
178. **Etienne-Manneville, S. (2004).** *Cdc42 – the centre of polarity. Journal of Cell Science, 117(8), 1291–1300.*
179. **Dogterom, M., & Koenderink, G. H. (2019).** *Actin–microtubule crosstalk in cell biology. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 20(1), 38–54.*

180. **Lavalou, J., & Lecuit, T. (2022).** *Planar cell polarity and tissue morphogenesis: Lessons from the Drosophila model. Nature Reviews Genetics, 23, 311–328.*
181. **Rodriguez-Boulan, E., & Macara, I. G. (2014).** *Organization and execution of the epithelial polarity programme. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 15(4), 225–242.*
182. **Wloga, D., Joachimiak, E., & Fabczak, H. (2017).** *Tubulin post-translational modifications and microtubule dynamics. International Journal of Molecular Sciences, 18(10), 2207.*
183. **Petrášek, J., & Schwarzerová, K. (2009).** *Actin–microtubule interactions in plant cells: A basis for cell polarity, morphogenesis, and signaling. International Review of Cell and Molecular Biology, 273, 225–290.*
184. **Herrmann, H., & Aebi, U. (2016).** *Intermediate filaments: Structure and assembly. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 8(11), a018242.*
185. **Wiche, G. (1998).** *Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. Journal of Cell Science, 111(17), 2477–2486.*
186. **Dutour-Provenzano, G., & Etienne-Manneville, S. (2021).** *Intermediate filaments in cell migration and invasion: The unusual suspects. Current Opinion in Cell Biology, 72, 132–140.*
187. **Vale, R. D. (2003).** *The molecular motor toolbox for intracellular transport. Cell, 112(4), 467–480.*
188. **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015).** *Molecular Biology of the Cell (6th ed.). Garland Science.*
189. **Ridley, A. J. (2001).** *Rho GTPases and cell migration. Journal of Cell Science, 114(15), 2713–2722.*
190. **Narumiya, S., & Thumkeo, D. (2018).** *Rho signaling research: history, current status and future directions. FEBS Letters, 592(11), 1763–1776.*
191. **Machacek, M., Hodgson, L., ... & Danuser G. (2009).** *Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. Nature, 461(7260), 99–103.*
192. **Nobes, C. D., & Hall, A. (1995).** *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell, 81(1), 53–62.*
193. **Svitkina, T. (2018).** *Actin cell cortex: structure and molecular organization. Trends in Cell Biology, 28(11), 802–813.*

194. **Hall, A.** (2009). *The cytoskeleton and cancer. Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1-2), 5–14.
195. **Méndez, M. G., Kojima, S., & Goldman, R. D.** (2010). *Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. FASEB Journal*, 24(6), 1838–1851.
196. **Yamaguchi, H., & Condeelis, J.** (2007). *Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(5), 642–652.
197. **Steeg, P. S.** (2016). *Targeting metastasis. Nature Reviews Cancer*, 16(4), 201–218.
198. **Ridley, A. J.** (2011). *Life at the leading edge. Cell*, 145(7), 1012–1022.
199. **Krause, M., & Gautreau, A.** (2014). *Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(9), 577–590.
200. **Aguilar-Cuenca, R., Juanes-García, A., & Vicente-Manzanares, M.** (2014). *Myosin II in mechanotransduction: master and commander of cell migration, morphogenesis, and cancer. Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(3), 479–492.
201. **Vona, R., Mileo, A. M., & Matarrese, P.** (2021). *Microtubule-based mitochondrial dynamics as a valuable therapeutic target in cancer. Cancers*, 13(22), 5812.
202. **Aseervatham, G.S.B.** (2020). *Emerging role of microtubule-targeting agents in cancer therapy: Current perspectives and future prospects. Current Drug Targets*, 21(6), 591–608.
203. **Zhang, L., Zhang, S., Yao, J., Lowery, F.J., Zhang, Q., Huang, W.-C., et al.** (2015). *Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. Nature*, 527(7576), 100–104.
204. **Strouhalova, K., Přečková, M., Gandalovičová, A., Brábek, J., Gregor, M., & Rosel, D.** (2020). *Vimentin intermediate filaments as potential target for cancer treatment. Cancers*, 12(1), 184.
205. **Eva-Maria Schnaeker, Rainer Ossig, Thomas Ludwig, Rita Dreier, Hans Oberleithner, M. Wilhelmi, Stefan W. Schneider;** *Microtubule-Dependent Matrix Metalloproteinase-2/Matrix Metalloproteinase-9 Exocytosis: Prerequisite in Human Melanoma Cell Invasion. Cancer Res 15 December 2004; 64 (24): 8924–8931.*

206. **Gifford, J.B., Moffitt, R.A., & Shamir, E.R.** (2022). *Mechanobiology in cancer: Molecular motors and the cytoskeleton*. *Cancer Research*, 82(2), 225–234.
207. **Perrin, L., & Gligorijevic, B.** (2022). *Live imaging of cancer cell invasion through extracellular matrix by tumor microenvironment components*. *Cancers*, 14(6), 1490.
208. **Jaalouk, D. E., & Lammerding, J.** (2009). *Mechanotransduction gone awry*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1), 63–73.
209. **Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., Pagliari, S., & Forte, G.** (2018). *Cellular mechanotransduction: From tension to function*. *Frontiers in Physiology*, 9, 824.
210. **Ingber, D. E.** (1997). *Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction*. *Annual Review of Physiology*, 59, 575–599.
211. **Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., et al.** (2001). *Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism*. *Journal of Cell Biology*, 153(6), 1175–1186.
212. **Eyckmans, J., Boudou, T., Yu, X., & Chen, C.S.** (2011). *A Hitchhiker's Guide to Mechanobiology*. *Developmental Cell*, 21(1), 35–47.
213. **Alenghat, F. J., & Ingber, D. E.** (2002). *Mechanotransduction: All signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins*. *Science's STKE*, 2002(119), pe6.
214. **Mierke, C. T.** (2024). *Extracellular matrix cues regulate mechanosensing and mechanotransduction of cancer cells*. *Cells*, 13(1), 96.
215. **Linke, J.A., Munn, L.L., & Jain, R.K.** (2024). *Compressive stresses in cancer: characterization and implications for tumour progression and treatment*. *Nature Reviews Cancer*, 24, 371–386.
216. **Berdiaki, A., Neagu, M., Tzanakakis, P., & Spyridaki, I.** (2024). *Extracellular Matrix Components and Mechanosensing Pathways in Health and Disease*. *Biomolecules*, 14(9), 1186.
217. **Azizan, F., Sheriff, R.S., & Goh, C.J.H.** (2025). *Solid stress compression enhances breast cancer cell migration through the upregulation of Interleukin-6*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*.
218. **Fang, J. S., Coon, B. G., Gillis, N., Chen, Z., Qiu, J., Chittenden, T. W., ... & Iruela-Arispe, M. L.** (2019). *Shear-induced Notch-Cx37-p27 axis arrests endothelial cell cycle to enable arterial specification*. *Nature Communications*, 10, 2149.

219. **Dominguez, A., & Iruela-Arispe, M. L. (2023).** *Integration of chemo-mechanical signaling in response to fluid shear stress by the endothelium. Current Opinion in Cell Biology, 83, 102243.*
220. **Gauthier, N. C., & Roca-Cusachs, P. (2018).** *Mechanosensing at integrin–matrix adhesions: from molecular to integrated mechanisms. Current Opinion in Cell Biology, 50, 20–26.*
221. **Kanchanawong, P., & Calderwood, D. A. (2023).** *Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell–ECM adhesions. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 24, 275–292.*
222. **Jansen, K. A., Atherton, P., & Ballestrem, C. (2017).** *Mechanotransduction at the cell-matrix interface. Seminars in Cell & Developmental Biology, 71, 75–83.*
223. **Leckband, D. E., & de Rooij, J. (2014).** *Cadherin adhesion and mechanotransduction. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 30, 291–315.*
224. **Matthews, B. D., et al. (2010).** *Cellular mechanotransduction through single integrin molecules. Science Signaling, 3(165), ra35.*
225. **Chuang, H. C., & Chen, Y. H. (2022).** *Piezo1 and TRPV4 as mechanosensitive ion channels in immune and epithelial cells. Cellular Physiology and Biochemistry, 56(2), 239–257.*
226. **Janmey, P. A. (1998).** *The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. Physiological Reviews, 78(3), 763–781.*
227. **Stossel, T. P., et al. (2001).** *Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2, 138–145.*
228. **Cobbaut, M., & Van Lint, J. (2020).** *Focus on Protein Kinase C: A Key Player in the Regulation of Cell Adhesion and Cell Migration. International Journal of Molecular Sciences, 21(8), 2582.*
229. **Burridge, K., & Monaghan-Benson, E. (2019).** *Rho GTPases in mechanotransduction. In R. Ridley (Ed.), The Cytoskeleton in Health and Disease (pp. 213–230). Springer.*
230. **Kato, K. (2025).** *Integrin and Its Associated Proteins as a Mediator for Mechano-Signal Transduction. Biomolecules, 15(2), 166.*
231. **Buwa, N., & Balasubramanian, M. (2022).** *Mechanical bending and adaptation of microtubules under tension. Current Biology, 32(4), 603–615.*

232. **Mitsou, P., Katsaros, D., & Scorilas, A.** (2017). *Vimentin expression is associated with epithelial–mesenchymal transition and metastatic potential in breast cancer.* *BMC Cancer*, 17, 398.
233. **Nakamura, H.** (2024). *Mechanical deformation of the nucleus and chromatin accessibility.* *Trends in Cell Biology*, 34(1), 15–28.
234. **Di, C., Wang, J., Sun, Y., & Liu, Q.** (2023). *LINC Complex–Mediated Nuclear Mechanotransduction in Development and Disease.* *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24, 112–126.
235. **Fournier, M. F., Sauser, R., Ambrosi, D., Meister, J. J., & Verkhovsky, A. B.** (2010). *Force transmission in migrating cells: a multilayered network of cytoskeletal crosslinkers.* *Current Opinion in Cell Biology*, 22(5), 585–591.
236. **Nag, S., Larsson, M., Robinson, R. C., & Burtnick, L. D.** (2013). *The structure of the actin filament.* *Current Biology*, 23(8), R279–R290.
237. **Zhou, Q., & Wang, X.** (2010). *Plectin: A cytolinker with essential roles in health and disease.* *Cell & Bioscience*, 10(1), 1–9.
238. **Osmanagic-Myers, S., Dechat, T., & Foisner, R.** (2015). *Lamins at the crossroads of mechanosignaling.* *Cells*, 4(4), 546–565.
239. **Zuidema, A., Wang, W., Te Molder, L., Nahidiazar, L., Hoekman, L., Schmidt, R., et al.** (2020). *Hemidesmosomes modulate force generation via focal adhesions.* *Journal of Cell Biology*, 219(2), e201904137.
240. **Le Duc, Q., Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D., & de Rooij, J.** (2010). *Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II–dependent manner.* *The Journal of Cell Biology*, 189(7), 1107–1115.
241. **Boutillon, A., Escot, S., Elouin, A., Jahn, D., & Guichet, A.** (2022). *Guidance by followers ensures long-range coordination of cell migration through  $\alpha$ -catenin mechanoperception.* *Developmental Cell*, 57(21), 2674–2689.e6.
242. **Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., & Juliano, R. L.** (1999). *Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins.* *Pharmacological Reviews*, 51(1), 97–143.
243. **González-Amaro, R., & Sánchez-Madrid, F.** (1999). *Cell adhesion molecules: Selectins and integrins.* *Critical Reviews in Immunology*, 19(5–6), 389–429.

244. **Wielgat, P., Rogowski, K., & Pokryszko-Dragan, A. (2020).** *Sialic acid–Siglec axis as molecular checkpoints targeting of immune system: Smart players in pathology and conventional therapy. International Journal of Molecular Sciences, 21(12), 4361.*
245. **Reymond, N., d'Água, B. B., & Ridley, A. J. (2013).** *Crossing the endothelial barrier during metastasis. Nature Reviews Cancer, 13(12), 858–870.*
246. **Schlesinger, M., & Bendas, G. (2015).** *Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)—an increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. International Journal of Cancer, 136(11), 2504–2514.*
247. **Benedicto, A., Marquez, J., Herrero, A., Olasso, E., & Arteta, B. (2017).** *Decreased expression of the  $\beta$ 2 integrin on tumor cells is associated with a reduction in liver metastasis of colorectal cancer in mice. BMC Cancer, 17, 555.*
248. **Kotteas, E. A., Gkiozos, I., Tsagkouli, S., Bastas, A., Ntanos, I., Saif, M. W., & Syrigos, K. N. (2014).** *Soluble ICAM-1, VCAM-1 and VEGF levels in small-cell lung cancer patients: association with disease stage and prognostic value. Tumor Biology, 35(9), 8823–8828.*
249. **Hubbard, A. K., & Rothlein, R. (2000).** *Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. Free Radical Biology and Medicine, 28(9), 1379–1386.*
250. **Dietrich, J. B. (2002).** *The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. Journal of Neuroimmunology, 128(1–2), 58–68.*
251. **Cook-Mills, J. M. (2002).** *VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. Molecular Immunology, 39(9), 531–538.*
252. **Vestweber, D. (2007).** *Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. Immunological Reviews, 218(1), 178–196.*
253. **Kong, L., Zhou, Y., Bu, H., Lv, T., & Liu, B. (2018).** *VCAM-1 as a potential therapeutic target in metastatic cancer: A review of its expression, regulation and function. Current Molecular Medicine, 18(3), 153–164.*
254. **Hariharan, I. K., & Bilder, D. (2006).** *Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in Drosophila. Annual Review of Genetics, 40, 335–361.*
255. **Silva, E., Tsatskis, Y., Gardano, L., Tapon, N., & McNeill, H. (2006).** *The tumor-suppressor gene fat controls tissue growth upstream of expanded in the hippo signaling pathway. Current Biology, 16(21), 2081–2089.*

256. **Gokhale, P. J., & Pflieger, C. M. (2018).** *The Hippo pathway in Drosophila: regulation and function in organ size control, tissue homeostasis and cancer. Developmental Dynamics, 247(4), 381–394.*
257. **Irvine, K. D., & Harvey, K. F. (2015).** *Control of organ growth by patterning and Hippo signaling in Drosophila. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 7(6), a019224.*
258. **Pan, D. (2010).** *The Hippo signaling pathway in development and cancer. Developmental Cell, 19(4), 491–505.*
259. **Halder, G., & Johnson, R. L. (2011).** *Hippo signaling: growth control and beyond. Development, 138(1), 9–22.*
260. **Kango-Singh, M., & Singh, A. (2009).** *Regulation of organ size: Insights from the Drosophila Hippo signaling pathway. Developmental Dynamics, 238(7), 1627–1637.*
261. **Snigdha, K., Gangwani, K. S., Lapalikar, G. V., Singh, A., & Kango-Singh, M. (2019).** *Hippo signaling in cancer: lessons from Drosophila models. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 7, 85.*
262. **Pan, D. (2007).** *Hippo signaling in organ size control. Genes & Development, 21(8), 886–897.*
263. **Verghese, S., Bedi, S., & Kango-Singh, M. (2012).** *Hippo signalling controls Dronc activity to regulate organ size in Drosophila. Cell Death & Differentiation, 19(6), 889–897.*
264. **Zhang, L., Yue, T., & Jiang, J. (2009).** *Hippo signaling pathway and organ size control. Fly, 3(1), 68–73.*
265. **Halder, G., Dupont, S., & Piccolo, S. (2012).** *Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 13(9), 591–600.*
266. **Totaro, A., Panciera, T., & Piccolo, S. (2018).** *YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. Nature Cell Biology, 20(8), 888–899.*
267. **Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., ... & Piccolo, S. (2011).** *Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. Nature, 474(7350), 179–183.*
268. **Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., et al. (2013).** *A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. Cell, 154(5), 1047–1059.*

269. **Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., et al. (2010).** *The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF- $\beta$ -Smad pathway.* *Developmental Cell*, 19(6), 831–844.
270. **Yu, F. X., Zhao, B., & Guan, K. L. (2015).** *Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer.* *Cell*, 163(4), 811–828.
271. **Meng, Z., Moroishi, T., & Guan, K. L. (2016).** *Mechanisms of Hippo pathway regulation.* *Genes & Development*, 30(1), 1–17.
272. **Zhao, B., Lei, Q. Y., & Guan, K. L. (2008).** *The Hippo–YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer.* *Current Opinion in Cell Biology*, 20(6), 638–646.
273. **Piccolo, S., Dupont, S., & Cordenonsi, M. (2014).** *YAP/TAZ at the roots of cancer.* *Cancer Cell*, 26(6), 771–785.
274. **Qi, S., Zhu, Y., Liu, X., Li, P., Wang, Y., Zeng, Y., Yu, A., & Wang, Y. (2022).** *WWC proteins mediate LATS1/2 activation by Hippo kinases and imply a tumor suppression strategy.* *Molecular Cell*, 82(13), 2390–2406.e7.
275. **Kwan, J., Sczaniecka, A., Arash, E. H., et al. (2016).** *DLG5 connects cell polarity and Hippo signaling protein networks by linking PAR-1 with MST1/2.* *Genes & Development*, 30(24), 2696–2709.
276. **Manning, S. A., Kroeger, B., & Harvey, K. F. (2020).** *The regulation of Yorkie, YAP and TAZ: new insights into the Hippo pathway.* *Development*, 147(8), dev179069.
277. **Kim, M., Kim, T., Johnson, R. L., & Lim, D. S. (2022).** *HIPPO pathway in stem cell biology and cancer.* *Current Topics in Developmental Biology*, 149, 55–98.
278. **Wang, Z., Lu, W., Zhang, Y., Zou, F., Jin, Z., & Su, Y. (2020).** *The Hippo Pathway and Viral Infections.* *Frontiers in Microbiology*, 10, 3033.
279. **Kwon, Y. (2024).** *YAP/TAZ as molecular targets in skeletal muscle atrophy and osteoporosis.* *Aging and Disease*, Advance online publication.
280. **Kim, M., Kim, T., Johnson, R. L., & Lim, D. S. (2018).** *The emerging roles of YAP and TAZ in cancer and immunity.* *Molecular Cells*, 41(7), 476–485.
281. **Battilana, G., Zanconato, F., & Cordenonsi, M. (2021).** *YAP/TAZ-mediated transcription in cancer: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 534, 112–120.
282. **Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., ... & Guan, K. L. (2008).** *TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control.* *Genes & Development*, 22(14), 1962–1971.

283. **Zanconato, F., Forcato, M., Battilana, G., Azzolin, L., Quaranta, E., Bodega, B., ... & Piccolo, S. (2015).** *Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. Nature Cell Biology, 17(9), 1218–1227.*
284. **Koo, J. H., & Guan, K. L. (2018).** *Interplay between YAP/TAZ and metabolism. Cell Metabolism, 28(2), 196–206.*
285. **Enzo, E., Santinon, G., Pocaterra, A., Aragona, M., Bresolin, S., Forcato, M., ... & Dupont, S. (2015).** *YAP controls c-MYC transcriptional activity and rewires metabolism to support glutamine-dependent anabolic growth. Cancer Cell, 27(6), 786–800.*
286. **Di Benedetto, A., Renga, G., Moretti, S., D’Onofrio, N., Carbone, C., Pariante, G., ... & Ricciardi-Castagnoli, P. (2021).** *YAP and TAZ mediate skeletal muscle adaptation to mechanical overload by promoting PGC-1 $\alpha$  expression. Cell Reports, 34(4), 108720.*
287. **Levy, D., Adamovich, Y., Reuven, N., & Shaul, Y. (2008).** *The Yes-associated protein 1 stabilizes p73 by preventing Itch-mediated ubiquitination of p73. Cell Death and Differentiation, 15(5), 743–751.*
288. **Varelas, X., Sakuma, R., Samavarchi-Tehrani, P., Peerani, R., Rao, B. M., Dembowy, J., ... & Wrana, J. L. (2010).** *TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. Nature Cell Biology, 12(3), 245–252.*
289. **Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C. Y., & Guan, K. L. (2010).** *A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF $\beta$ -TRCP. Genes & Development, 24(1), 72–85.*
290. **Moroishi, T., Hansen, C. G., & Guan, K. L. (2015).** *The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. Nature Reviews Cancer, 15(2), 73–79.*
291. **Morin-Kensicki, E. M., Boone, B. N., Howell, M., Stonebraker, J. R., Teed, J., Alb, J. G., ... & Milgram, S. L. (2006).** *Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of Yap65. Molecular and Cellular Biology, 26(1), 77–87.*
292. **Hong, J. H., Hwang, E. S., McManus, M. T., Amsterdam, A., Tian, Y., Kalmukova, R., ... & Yaffe, M. B. (2005).** *TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. Science, 309(5737), 1074–1078.*
293. **Salah, Z., & Aqeilan, R. I. (2011).** *WW domain interactions regulate the Hippo tumor suppressor pathway. Cell Death & Disease, 2, e172.*

294. **Chan, S. W., Lim, C. J., Loo, L. S., Chong, Y. F., Huang, C., & Hong, W.** (2011). *WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks. Molecular Cell, 41(3), 297–309.*
295. **Pancierà, T., Azzolin, L., Cordenonsi, M., & Piccolo, S.** (2017). *Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 18(12), 758–770.*
296. **Elbediwy, A., Vanyai, H. K., Diaz de la Loza, M. del C., Frith, D., Snijders, A. P., & Malanchi, I.** (2016). *Enigma proteins regulate YAP mechanotransduction. Journal of Cell Science, 129(15), 2847–2858.*
297. **Speight, P., Kofler, M., & Szaszi, K.** (2016). *TAZ contributes to cell shape changes and fate decisions in stratified squamous epithelia. Nature Communications, 7, 11704.*
298. **Elosegui-Artola, A., Andreu, I., Beedle, A. E., Lezamiz, A., Uroz, M., Kosmalka, A. J., ... & Trepàt, X.** (2017). *Force triggers YAP nuclear entry by regulating transport across nuclear pores. Cell, 171(6), 1397–1410.e14.*
299. **Dai, X., She, P., Chi, F., Feng, Y., Liu, H., Jin, D., ... & Jiang, Y.** (2015). *YAP activation is a critical step in tumorigenesis of liver cancer. Cell Reports, 11(6), 923–935.*
300. **Di Agostino, S., Valenti, F., Sacconi, A., Fontemaggi, G., & Blandino, G.** (2016). *YAP enhances the pro-proliferative transcriptional activity of mutant p53 proteins. Oncogene, 35(34), 4490–4498.*
301. **Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., ... & Guan, K. L.** (2007). *Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. Genes & Development, 21(21), 2747–2761.*
302. **Saburi, S., Hester, I., Goodrich, L., & McNeill, H.** (2012). *Functional interactions between Fat family cadherins in tissue morphogenesis and planar polarity. Development, 139(10), 1806–1820.*
303. **Ragni, C. V., Diguët, N., Le Garrec, J. F., Novotova, M., Resende, T. P., Pop, S., ... & Zaffran, S.** (2017). *Amotl1 mediates sequestration of the Hippo effector Yap1 downstream of Fat4 to restrict heart growth. Nature Communications, 8, 14582.*
304. **Martin-Belmonte, F., & Perez-Moreno, M. A.** (2012). *Mechanisms of cell polarity in epithelial homeostasis and cancer. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4(6), a008375.*

305. **Bossuyt, W., Chen, C. L., Chen, Q., Sudol, M., McNeill, H., Pan, D., & Halder, G. (2014).** *An evolutionary shift in the regulation of the Hippo pathway between mice and flies. Nature Communications, 5, 5396.*
306. **McNeill, H., & Woodgett, J. R. (2010).** *When pathways collide: collaboration and connivance among signalling proteins in development. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 11(6), 404–413.*
307. **Enderle, L., & McNeill, H. (2013).** *Hippo gains weight: added insights and complexity to pathway control. Science Signaling, 6(280), re7.*
308. **Zhao, B., Li, L., Lei, Q.Y., & Guan, K.L. (2007).** *The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. Genes & Development, 21(8), 862–875.*
309. **Zhang, L., Wei, Y., Liu, Z., Yee, P.P., Johnson, M., & Zhang, X. (2020).** *Induction of store-operated calcium entry (SOCE) suppresses glioblastoma growth by inhibiting the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ. Oncogene, 39, 4792–4806.*
310. **Hansen, C.G., Moroishi, T., & Guan, K.L. (2015).** *YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond. Trends in Cell Biology, 25(9), 499–513.*
311. **Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszek, J., Rodriguez, J.R., Zhou, D., Kreger, B.T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T.R., & Camargo, F.D. (2011).** *YAP1 acts downstream of  $\alpha$ -catenin to control epidermal proliferation. Cell, 144(5), 782–795.*
312. **Scott, K. E. N., Fraley, S. I., & Rangamani, P. (2021).** *A spatial model of YAP/TAZ signaling reveals how stiffness, dimensionality, and shape contribute to emergent outcomes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 118(17), e2021571118.*
313. **Brusatin, G., Panciera, T., Gandin, A., Citron, A., & Piccolo, S. (2018).** *Biomaterials and engineered microenvironments to control YAP/TAZ-dependent cell behaviour. Nature Materials, 17(12), 1063–1075.*
314. **Li, H., Kuhn, M., Kelly, R. A., & Singh, A. (2023).** *Targeting YAP/TAZ mechanosignaling to ameliorate stiffness-induced Schlemm's canal cell pathobiology. American Journal of Physiology-Cell Physiology.*
315. **Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C. Y., Yu, J., & Guan, K. L. (2012).** *Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. Genes & Development, 26(1), 54–68.*

316. **Mana-Capelli, S., & McCollum, D. (2018).** *Angiomotins link F-actin architecture to Hippo pathway signaling. Molecular Biology of the Cell, 29(17), 2119–2130.*
317. **Tian, Y., Schiemann, W. P., & Wang, Q. (2022).** *Cell junctions, Hippo signaling and AMOT in cancer metastasis. Cell Communication and Signaling, 20(1), 81.*
318. **Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., ... & Guan, K. L. (2011).** *Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. Genes & Development, 21(21), 2747–2761.*
319. **Cai, X., Wang, K. C., & Meng, Z. (2021).** *Mechanoregulation of YAP and TAZ in cellular homeostasis and disease progression. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9, 673599.*
320. **Mokhtari, R. B., Ashayeri, N., Baghaie, L., Sambhi, M., Satari, K., & Yeger, H. (2023).** *The Hippo Pathway Effectors YAP/TAZ-TEAD Oncoproteins as Emerging Therapeutic Targets in the Tumor Microenvironment. Cancers, 15(13), 3468.*
321. **Wang, K. C., Yeh, Y. T., Nguyen, P., Limqueco, E., Lopez, J., Thorossian, S., ... & Chien, S. (2016).** *Flow-dependent YAP/TAZ activities regulate endothelial phenotypes and atherosclerosis. PNAS, 113(41), 11525–11530.*
322. **Nakajima, H., Yamamoto, K., Agarwala, S., Terai, K., Fukui, H., Fukuhara, S., ... & Mochizuki, N. (2017).** *Flow-dependent endothelial YAP regulation contributes to vessel maintenance. Developmental Cell, 40(6), 523–536.e6.*
323. **Feng, J., Gou, J., Jia, J., Yi, T., Cui, T., & Li, Z. (2021).** *Cyclic stretch enhances YAP/TAZ activities to promote myogenesis. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9, 662940.*
324. **Gong, Y., Wang, Y., Zhou, H., Liang, Q., Wang, J., & Xu, H. (2021).** *Mechanical compression induces apoptosis in chondrocytes by promoting YAP phosphorylation via actin remodeling. Journal of Molecular Histology, 52(2), 261–271.*
325. **Kim, N. G., & Gumbiner, B. M. (2015).** *Adherens junction dynamics regulate the activity of YAP and TAZ in response to mechanical strain. The Journal of Cell Biology, 211(6), 1193–1205.*
326. **Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., ... & Kaibuchi, K. (1996).** *Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). The Journal of Biological Chemistry, 271(34), 20246–20249.*

327. **Yang, N., Higuchi, O., & Mizuno, K.** (1998). *LIM-kinase 1 and cofilin phosphorylation in the regulation of actin dynamics. Nature*, 393(6687), 809–812.
328. **Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., ... & Kaibuchi, K.** (1996). *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). Science*, 273(5272), 245–248.
329. **Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z., & Geiger, B.** (2007). *A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell–matrix adhesions. Journal of Cell Science*, 120(1), 137–148.
330. **Geiger, B., Spatz, J. P., & Bershadsky, A. D.** (2009). *Environmental sensing through focal adhesions. Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1), 21–33.
331. **Wang, X., Freire Valls, A., Schermann, G., Shen, Y., Moya, I. M., Castro, L., ... & Mettouchi, A.** (2016). *YAP/TAZ Orchestrate VEGF Signaling during Developmental Angiogenesis. Developmental Cell*, 36(4), 462–475.
332. **Yu, F. X., Zhao, B., & Guan, K. L.** (2012). *Regulation of the Hippo–YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. Cell*, 150(4), 780–791.
333. **Park, H. W., Kim, Y. C., Yu, B., Moroishi, T., Mo, J. S., Plouffe, S. W., ... & Guan, K. L.** (2015). *Alternative Wnt signaling activates YAP/TAZ. Cell*, 162(4), 780–794.
334. **Hoxhaj, G., & Manning, B. D.** (2020). *The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. Nature Reviews Cancer*, 20(2), 74–88.
335. **Enzo, E., Santinon, G., Pocaterra, A., Aragona, M., Bresolin, S., Forcato, M., ... & Piccolo, S.** (2015). *Growth-restricted cells undergo terminal differentiation due to impaired Hippo-YAP signaling. Nature*, 505(7483), 317–321.
336. **Yu, F. X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J. L., Lian, I., Wang, L. H., ... & Guan, K. L.** (2012). *Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein coupled receptor signaling. Cell*, 150(4), 780–791.
337. **Zhao, B., Li, L., Lu, Q., Wang, L. H., Liu, C. Y., Lei, Q., & Guan, K. L.** (2011). *Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. Genes & Development*, 25(1), 51–63.
338. **Hough, C., Radu, M., & Doré, J. J.** (2012). *TGF- $\beta$ -induced Erk phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling. PLoS ONE*, 7(8), e42513.

339. **Kong, H. J., Kwon, E. J., Kwon, O. S., et al. (2020).** Crosstalk between YAP and TGF- $\beta$  regulates SERPINE1 expression in mesenchymal lung cancer cells. *International Journal of Oncology*, 56(4), 1004–1016.
340. **Derynck, R., & Zhang, Y. E. (2003).** Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature*, 425(6958), 577–584.
341. **Pefani, D. E., Pankova, D., Abraham, A. G., Grawenda, A. M., Vlahov, N., Scrace, S., ... & O'Neill, E. (2016).** TGF- $\beta$  targets the Hippo pathway scaffold RASSF1A to facilitate YAP/SMAD2 nuclear translocation. *Molecular Cell*, 63(1), 156–166.
342. **Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C. Y., & Guan, K. L. (2018).** A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF  $\beta$ -TRCP. *Genes & Development*, 24(1), 72–85.
343. **Hardie, D. G. (2011).** Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4), 891S–896S.
344. **Ren, Y., & Shen, H. M. (2019).** Critical role of AMPK in redox regulation under glucose starvation. *Redox Biology*, 26, 101230.
345. **Motoshima, H., Igata, M., Tsuruzoe, K., Kojima, H., Matsumura, T., & Kawashima, J. (2005).** Adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses vascular smooth muscle cell proliferation through the inhibition of cell cycle progression. *Circulation Research*, 97(9), 837–844.
346. **Mo, J.-S., Meng, Z., Kim, Y., Park, H. W., Hansen, C. G., Kim, S., Lim, D.-S., & Guan, K.-L. (2015).** Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nature Cell Biology*, 17(4), 500–510.
347. **Zhao, Y., Sheldon, M., Sun, Y., & Ma, L. (2023).** New insights into YAP/TAZ–TEAD-mediated gene regulation and biological processes in cancer. *Cancers*, 15(23), 5497.
348. **Pocaterra, A., Romani, P., & Dupont, S. (2020).** YAP/TAZ functions and their regulation at a glance. *Journal of Cell Science*, 133(2), jcs230425.
349. **Hansen, C. G., Ng, Y. L. D., Lam, W. L. M., Plouffe, S. W., & Guan, K.-L. (2015).** The Hippo pathway effectors YAP and TAZ promote cell growth by modulating actin cytoskeleton. *EMBO Journal*, 34(17), 2320–2335.
350. **Tong, Z., Liu, Y., Xia, R., Chang, Y., Hu, Y., & Liu, P. (2020).** F-actin Regulates Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on TiO<sub>2</sub> Nanotubes Through MKL1 and YAP/TAZ. *Nanoscale Research Letters*, 15(1), 204.

351. **Yang, H., Yang, J., Zheng, X., Chen, T., Zhang, R., & Liu, Y. (2024).** *The Hippo Pathway in Breast Cancer: The Extracellular Matrix and Hypoxia. International Journal of Molecular Sciences, 25(23), 12868.*
352. **Islam, R., & Hong, Z. (2024).** *YAP/TAZ as mechanobiological signaling pathway in cardiovascular physiological regulation and pathogenesis. Mechanobiology in Medicine, Elsevier.*
353. **Bui, D. A., Lee, W., White, R., Heng, M. Y., et al. (2016).** *Cytoskeletal tension regulates Hippo signaling through AMOT and LATS activation. Journal of Cell Biology, 213(4), 613–628.*
354. **Cai, J., Zhang, N., Zheng, Y., de Wilde, R. F., Maitra, A., & Pan, D. (2010).** *The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. Genes & Development, 24(21), 2383–2388.*
355. **Fu, C., Zhang, Q., Li, Y., et al. (2024).** *Microenvironments-Modulated Biomaterials Enhance Spinal Cord Injury Therapy. Advanced Functional Materials, 2403900.*
356. **Segrelles, C., Ruiz, S., Pérez, P., et al. (2018).** *Functional roles of YAP/TAZ in stem cell biology, development and disease. Oncogene, 37(1), 1–11.*
357. **Jia, J., Wei, W., Tang, Y., et al. (2019).** *YAP-dependent reprogramming of skeletal muscle stem cell fate. Nature Communications, 10(1), 5291.*
358. **Ben Mimoun, S., Moindrot, B., et al. (2020).** *Cooperation between HIF-1 $\alpha$  and YAP drives glycolytic adaptation in cancer. EMBO Reports, 21(7), e50100.*
359. **Castillo, A., Liu, Y., Zheng, H., et al. (2024).** *YAP mediates hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and metabolic rewiring in cancer. Nature Cell Biology.*
360. **Oka, T., & Sudol, M. (2009).** *Nuclear localization and pro-apoptotic signaling of YAP2 require intact SH3 binding motif. Cell Death and Differentiation, 16(6), 1218–1225.*
361. **Ferraiuolo, M., Verduci, L., Blandino, G., & Strano, S. (2017).** *Mutant p53 protein and the hippo transducers YAP and TAZ: a critical oncogenic node in human cancers. International Journal of Molecular Sciences, 18(5), 961.*
362. **Zhang, X., Abdelrahman, A., Vollmar, B., & Zahler, S. (2018).** *The ambivalent function of YAP in apoptosis and cancer. International Journal of Molecular Sciences, 19(12), 3770.*

363. **Reuven, N., Adler, J., Meltzer, G., & Shaul, Y. (2013).** *The Hippo pathway promotes cell survival in response to chemotherapeutic agents. Cell Death and Disease, 4, e602.*
364. **Ren, F., Wang, Y., Li, L., & Zhang, L. (2022).** *Dual roles of YAP and TAZ in DNA damage response and tumorigenesis. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 10, 935694.*
365. **Conboy, C. A., Choi, J., Li, R., & Zohn, I. E. (2023).** *YAP/TAZ signaling in cancer: Cooperative interactions with other oncogenic pathways. Cancers, 15(6), 1756.*
366. **Pobbati, A. V., & Hong, W. (2020).** *The Hippo pathway: A master regulatory network important in development and cancer. Clinical Science, 134(4), 1–28.*
367. **Hsu, Y. L., Hung, J. Y., & Kuo, P. L. (2020).** *Src kinase-mediated YAP activation contributes to glioblastoma progression. Cell Communication and Signaling, 18(1), 37.*
368. **Thrash, E. M., & Pendergast, A. M. (2023).** *Src family kinases regulate YAP/TAZ activity and localization in cancer. Trends in Cancer, 9(1), 42–54.*
369. **Wang, G., Lu, X., Dey, P., Deng, P., Wu, C. C., Jiang, S., ... & Ma, L. (2020).** *Targeting YAP-dependent MDSCs functions impairs tumor progression. Cancer Discovery, 10(10), 1450–1464.*
370. **Lo Sardo, F., Scalera, S., Memeo, L., et al. (2023).** *Hippo pathway dysregulation in gastric cancer: from Helicobacter pylori infection to tumor promotion and progression. Cell Death & Disease, 14, 537.*
371. **Chhetri, D., Vengadassalopathy, S., & Raj, V. (2022).** *Pleiotropic effects of DCLK1 in cancer and cancer stem cells. Frontiers in Molecular Biosciences, 9, 965730.*
372. **Wang, H., & Borlongan, M.C. (2023).** *Profiling and targeting cancer stem cell signaling pathways for cancer therapeutics. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 11, 1125174.*
373. **Mohamed, R.H., Abu-Shahba, N., & Mahmoud, M. (2019).** *Co-regulatory network of oncosuppressor miRNAs and transcription factors for pathology of human hepatic cancer stem cells (HCSC). Scientific Reports, 9, 6590.*
374. **Guo, Z., & Han, S. (2023).** *Targeting cancer stem cell plasticity in triple-negative breast cancer. Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy, 4, 1002190.*
375. **Zhang, Y., Liu, Z., & Shu, L. (2020).** *The role of YAP/TAZ in cancer metabolism and therapeutic resistance. Frontiers in Oncology, 10, 928.*

376. **Jang, J. W., Kim, M. K., Bae, S. C., & Kim, J. H.** (2020). *Synergistic role of YAP/TAZ and AP-1 in resistance to anti-cancer therapy. Nature Communications, 11, 5766.*
377. **Liu, F., Lagares, D., Choi, K. M., Stopfer, L., Marinković, A., Vrbanac, V., ... & Tschumperlin, D. J.** (2015). *Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. Nature Communications, 6, 7155.*
378. **Shen, Y., Wang, X., Liu, Y., Singhal, M., et al.** (2021). *STAT3-YAP/TAZ signaling in endothelial cells promotes tumor angiogenesis. Science Signaling, 14(662), eabj8393.*
379. **Li, M., Liu, Y., Zhang, X., Liu, J., Wang, Q., Sun, X., ... & Yang, Y.** (2021). *YAP-activated cancer-associated fibroblasts foster cancer progression via enhanced secretion of IL-6 and IL-8. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9, 702218.*
380. **Taha, M., Grimsey, N. J., Martin, S., et al.** (2020). *YAP and TAZ drive endothelial-to-mesenchymal transition in cancer-associated fibroblasts. Cell Reports, 33(13), 108491.*
381. **Calvo, F., Ege, N., Grande-García, A., Hooper, S., Jenkins, R. P., Chaudhry, S. I., ... & Sahai, E.** (2013). *Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. Nature Cell Biology, 15(6), 637–646.*
382. **Distler, J. H. W., et al.** (2019). *YAP/TAZ mediates fibroblast activation and matrix stiffening in systemic sclerosis. Nature Communications, 10(1), 1738.*
383. **Yang, K., Xu, J., Fan, M., Tu, F., Wang, X., et al.** (2020). *Lactate Suppresses Macrophage Pro-Inflammatory Response to LPS Stimulation by Inhibition of YAP and NF- $\kappa$ B Activation via GPR81-Mediated Signaling. Frontiers in Immunology, 11, 587913*
384. **Pan, D. & Zheng, Y.** (2019). *The Hippo signaling pathway in development and cancer. Developmental Cell, 50(3), 264–282.*
385. **Kim, M. H., Kim, J., Hong, H., Lee, S. H., Lee, J. K., Jung, E., ... & Lee, H.** (2017). *Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. The EMBO Journal, 36(4), 519–536.*
386. **Janse van Rensburg, H. J., Yang, X.** (2018). *The Hippo pathway component TAZ promotes immune evasion in human cancer through PD-L1. Nature Communications, 9, 4292.*

387. **Choi, S. Y., Bae, H., Jeong, S. H., Park, I., Cho, H., Lee, D., ... & Koh, G. Y.** (2020). *YAP/TAZ direct commitment and maturation of lymph node fibroblastic reticular cells. Nature Communications, 11, 5894.*
388. **Stampoglou, E., Cheng, N., Federico, A., Slaby, E., Monti, S., Szeto, G. L., & Varelas, X.** (2020). *Yap suppresses T-cell function and infiltration in the tumor microenvironment. PLOS Biology, 18(10), e3000591.*
389. **Hooglugt, A., Van der Stoel, M. M., Boon, R. A. & Huvencers S.** (2021). *Endothelial YAP/TAZ signaling in angiogenesis and tumor vasculature. Frontiers in Oncology, 10, 612802.*
390. **Qian, C., Liu, C., Liu, W., Zhou, R., & Zhao, L.** (2023). *Targeting vascular normalization: a promising strategy to improve immune–vascular crosstalk in cancer immunotherapy. Frontiers in Immunology, 14, 1291530.*
391. **Kyriazoglou, A., Ntanasis-Stathopoulos, I., Gavriatopoulou, M., Terpos, E., & Dimopoulos, M. A.** (2020). *Emerging insights into the role of the Hippo pathway in multiple myeloma and associated bone disease. Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia, 20(10), 671–678.*
392. **Clara, J. A., Monge, C., Yang, Y., & Takebe, N.** (2020). *Targeting signalling pathways and the immune microenvironment of cancer stem cells—a clinical update. Nature Reviews Clinical Oncology, 17(4), 204–232.*
393. **Noorbakhsh, N., Hayatmoghadam, B., Jamali, M., et al.** (2021). *The Hippo signaling pathway in leukemia: function, interaction, and carcinogenesis. Cancer Cell International, 21, 559.*
394. **Di Benedetto, G., Carbone, C., Pandolfo, R., & Melisi, D.** (2021). *The metabolic reprogramming induced by YAP/TAZ promotes a glycolytic phenotype in pancreatic stellate cells. European Journal of Cancer, 158, 182–196.*
395. **Zhang, C., Lin, M., Wu, R., Wang, X., Yang, B., & Wang, Z.** (2022). *Targeting YAP/TAZ in cancer metabolism: New opportunities for cancer therapy. Cancers, 15(2), 498.*
396. **Yamaguchi, H., & Taouk, G. M.** (2020). *A potential role of immune checkpoint and tumor microenvironment in regulating YAP/TAZ activity in cancer. Frontiers in Immunology, 11, 609539.*
397. **Hallek, M., Shanafelt, T. D., & Eichhorst, B.** (2019). *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the*

- International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL) updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. Blood, 131(25), 2745–2760.*
398. **Seifert, M., Sellmann, L., Bloehdorn, J., Wein, F., Stilgenbauer, S., Dürig, J., & Küppers, R. (2012).** *Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. The Journal of Experimental Medicine, 209(12), 2183–2198.*
399. **Sthoeger, Z. M., Wakai, M., Tse, D. B., Vinciguerra, V. P., & Lahita, R. G. (1989).** *The CD5 B cell. Pathobiology, 57(3), 148–157.*
400. **Matutes, E., Morilla, R., Owusu-Ankomah, K., Houlihan, A., Catovsky, D. (1994).** *The immunophenotype of hairy cell leukemia and its variants. Best Practice & Research Clinical Haematology, 7(2), 273–287.*
401. **Matutes, E., & Polliack, A. (2000).** *Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. Reviews in Clinical and Experimental Hematology, 4(1), 22–47.*
402. **Cornet, E., Delmer, A., Féfèr, P., & Leblond, V. (2015).** *Chronic lymphocytic leukemia: immunophenotypic and genetic features. Hématologie, 21(4), 207–216.*
403. **Hallek, M. (2019).** *Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. American Journal of Hematology, 94(11), 1266–1287.*
404. **Rawstron, A. C., Bennett, F. L., O'Connor, S. J., Kwok, M., Fenton, J. A. L., Plummer, M., ... & Hillmen, P. (2008).** *Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine, 359(6), 575–583.*
405. **Strati, P., & Shanafelt, T. D. (2015).** *Monoclonal B-cell lymphocytosis and early-stage chronic lymphocytic leukemia: diagnosis, natural history, and risk stratification. Blood,*
406. **Jain, P., & O'Brien, S. (2012).** *Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. Oncology, 26(12), 1146–1152.*
407. **Innocenti, I., Ciabatti, E., Puccetti, M., Salvi, F., Nardi, V., & Petrini, M. (2023).** *NOTCH1 and TP53 alterations in Richter transformation: insights into molecular pathogenesis and therapeutic targets. Cancers, 15(5), 1336.*
408. **Briski, R., & Taylor, J. (2023).** *Genetic drivers and clonal evolution in Richter transformation. Hematology/Oncology Clinics, 37(2), 285–302.*
409. **Stamatopoulos, K., Agathangelidis, A., Rosenquist, R., Ghia, P., & Chiorazzi, N. (2017).** *Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia, 31(2), 282–291.*

410. **Agathangelidis, A., Vardi, A., Sutton, L. A., Hadzidimitriou, A., Belessi, C., Darzentas, N., ... & Stamatopoulos, K. (2014).** *Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. Cancer Research, 74(16), 4211–4216.*
411. **Chiorazzi, N. (2007).** *Impaired death signaling and the survival of leukemic lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia. Cell Death & Differentiation, 14(11), 1958–1969.*
412. **Cornet, E., Debliquis, A., Rimelen, V., Civic, N., Sorel, N., et al. (2015).** *Developing molecular signatures for chronic lymphocytic leukemia. PLOS ONE, 10(7), e0128990.*
413. **Khoudoleeva, E., Bruggemann, M., & Kneba, M. (2011).** *The role of ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia: From prognostication to therapeutic targeting. Leukemia & Lymphoma, 52(6), 1083–1094.*
414. **Alikhan, M., & Venkataraman, G. (2017).** *Diagnostic and prognostic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 54(6), 380–395.*
415. **Le Roy C, Deglesne PA, Chevallier N, Beitar T, Eclache V, Quettier M, Boubaya M, Letestu R, Lévy V, Ajchenbaum-Cymbalista F, Varin-Blank N.** *The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2012 Jul 12;120(2):356-65.*
416. **Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marszak F, Beitar T, Salanoubat C, Sanhes L, Nataf J, Roger C, Varin-Blank N, Ajchenbaum-Cymbalista F.** *Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. Cancer Res. 2006 Jul 15;66(14):7158-66.*
417. **Stacchini, A., Aragno, M., Vallario, A., Alfarano, A., Circosta, P., Gottardi, D., ... & Caligaris-Cappio, F. (1999).** *MEC1 and MEC2: Two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. Leukemia Research, 23(2), 127–136.*
418. **Rosén, A., Bergh, A. C., Gogok, P., Evaldsson, C., Myhrinder, A. L., Hellqvist, E., ... & Rosenquist, R. (2012).** *Antileukemic activity of a novel signal transducer and activator of transcription 3 inhibitor. International Journal of Cancer, 130(9), 2204–2213.*

419. **Tedder, T. F., Inaoki, M., & Sato, S. (1997).** *The CD19–CD21 signal transduction complex of B lymphocytes regulates the balance between health and autoimmune disease. Immunity, 6(4), 331–342.*
420. **Matsumoto, A. K., Kopicky-Burd, J. A., Carter, R. H., Tuveson, D. A., Tedder, T. F., & Fearon, D. T. (1991).** *Intersection of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B lymphocyte membrane. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88(22), 10098–10102.*
421. **Baba, Y., & Kurosaki, T. (2016).** *Role of calcium signaling in B cell activation and biology. In T. Kurosaki (Ed.), B Cell Receptor Signaling. Current Topics in Microbiology and Immunology, 393, 143–158. Springer.*
422. **Küçüktürk, S., Karaselek, M. A., & Duran, T. (2025).** *CD19 Deficiency Leads to Dysregulation of PI3K/AKT and NF- $\kappa$ B Pathways in B Cells. Journal of Clinical Practice, Res 2025; 47(2): 111-118*
423. **Schmid, V. K., & Hobeika, E. (2024).** *B cell receptor signaling and associated pathways in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. Frontiers in Oncology, 14, Article 1339620.*
424. **Buchner, M., & Burger, M. (2023).** *Somatic hypermutation of IGHV genes in CLL: implications for pathogenesis and therapy. Current Opinion in Hematology, 30(1), 45–52.*
425. **Efremov, D. G., Turkalj, S., & Laurenti, L. (2020).** *Mechanisms of B cell receptor activation and responses to B cell receptor inhibitors in B cell malignancies. Cancers, 12(6), 1396.*
426. **Okkenhaug, K., & Burger, J. A. (2016).** *PI3K signaling in normal B cells and chronic lymphocytic leukemia (CLL). In B Cell Receptor Signaling (Vol. 393, pp. 123–142). Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer.*
427. **Burger, J. A., & Wiestner, A. (2018).** *Immunological changes with kinase inhibitor therapy for chronic lymphocytic leukemia. Leukemia & Lymphoma, 59(12), 2760–2770.*
428. **Pepper, C., Buggins, A. G., Pratt, G., & Fegan, C. (2015).** *Treatment strategies for unmutated IGHV chronic lymphocytic leukemia: a poor prognostic subgroup. Leukemia Research Reports, 4(2), 62–65.*

429. **Ten Hacken, E., & Burger, J. A.** (2014). *Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia—focus on the B-cell receptor. Clinical Cancer Research, 20(3), 548–556.*
430. **Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., & Zhao, J. J.** (2006). *Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. Nature Reviews Drug Discovery, 8(8), 627–644.*
431. **Magnuson, B., Ekim, B., & Fingar, D. C.** (2012). *Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signaling networks. Biochemical Journal, 441(1), 1–21.*
432. **Tang, J. Y., Chuang, Y. T., Shiau, J. P., Yang, K. H., & Chang, F. R.** (2022). *Long noncoding RNAs and circular RNAs regulate AKT and its effectors to control cell functions of cancer cells. Cells, 11(19), 2940.*
433. **Wiese, W., Barczuk, J., Racinska, O., et al.** (2023). *PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in blood malignancies—new therapeutic possibilities. Cancers, 15(21), 5297.*
434. **Haselager, M., Thijssen, R., West, C. et al.** (2021) *Regulation of Bcl-XL by non-canonical NF- $\kappa$ B in the context of CD40-induced drug resistance in CLL. Cell Death Differ 28, 1658–1668.*
435. **Schmid, V. K., & Hobeika, E.** (2024). *B cell receptor signaling and associated pathways in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. Frontiers in Oncology, 14, 1339620.*
436. **Solimando, A. G., Malerba, E., Leone, P., Prete, M., Lamanuzzi, A., et al.** (2022). *Drug resistance in multiple myeloma: Soldiers and weapons in the bone marrow niche. Frontiers in Oncology, 12, 973836.*
437. **Le Roy, C., Deglesne, P. A., Chevallier, N., Beitar, T., Gross, E., et al.** (2012). *The degree of BCR and NFAT activation predicts clinical outcomes in chronic lymphocytic leukemia. Blood, 120(2), 356–365.*
438. **Lu, D., Zhao, Y., Tawatao, R., Cottam, H. B., Sen, M., Leoni, L. M., Kipps, T. J., Carson, D. A., & Cantor, H.** (2004). *Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(9), 3118–3123.*
439. **Etet, P. F. S., Vecchio, L., & Kamdje, A. H. N.** (2012). *Interactions between bone marrow stromal microenvironment and B-chronic lymphocytic leukemia cells: any role for Notch, Wnt and Hh signaling pathways? Cellular Signalling, 24(7), 1433–1443.*

440. **Gutierrez Jr, A., Tschumper, R. C., Wu, X., Shanafelt, T. D., Zent, C. S., Jelinek, D. F., & Kay, N. E. (2010).** *LEF-1 is a prosurvival factor in chronic lymphocytic leukemia and is expressed in the preleukemic state of monoclonal B-cell lymphocytosis.* *Blood*, 116(16), 2975–2983.
441. **Nusse, R., & Clevers, H. (2022)** *Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities.* *Cell*, 184(22), 5389–5406.
442. **Clevers, H. (2006)** *Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease.* *Cell*, 127(3), 469–480.
443. **Yu, J., Chen, L., Cui, B., Wu, C., Choi, M. Y., Chen, Y., ... & Kipps, T. J. (2017).** *Cirmtuzumab inhibits Wnt5a-induced Rac1 activation in chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib.* *Leukemia*, 31(1), 133–141.
444. **Kaucká, M., Plevová, K., Pavlová, Š., Janovská, P., Mishra, A., Verner, J., ... & Bryja, V. (2013)** *The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of B-lymphocyte migration.* *Cancer Research*, 73(5), 1491–1501.
445. **Mihoub, I., Rharass, T., Ouriemmi, S., Oudar, A., Aubard, L., Gratio, V., Lazarian, G., Ferreira, J., Dondi, E., Cymbalista, F., Levy, V., Baran-Marszak, F., Varin-Blank, N., Ledoux, D., Le Roy, C., & Gardano, L. (2023).** *Identification of the Axis  $\beta$ -Catenin–BTK in the Dynamic Adhesion of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to Their Microenvironment.* *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17623.
446. **Gardano, L., Ferreira, J., Le Roy, C., Ledoux, D., & Varin-Blank, N. (2024).** *The survival grip: how cell adhesion promotes tumor maintenance within the microenvironment.* *FEBS Letters*, 598(1), e15074.
447. **Roessner, P. M., & Seiffert, M. (2020).** *T-cells in chronic lymphocytic leukemia: guardians or drivers of disease?* *Leukemia*, 34(8), 2012–2024.
448. **Remmerswaal, E. B. M. et al. (2009).** *Enhanced formation and survival of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup> T-cells in chronic lymphocytic leukemia.* *Leukemia & Lymphoma*, 50(5), 788–801.
449. **Giannopoulos, K. et al. (2008).** *Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia.* *Oncology Reports*, 20(3), 677–682.
450. **Biancotto, A. et al. (2012).** *Phenotypic complexity of T regulatory subsets in patients with B-chronic lymphocytic leukemia.* *Modern Pathology*, 25(2), 246–259.

451. **Jadidi-Niaragh, F. et al. (2013).** *Regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: implication for immunotherapeutic interventions. Tumor Biology, 34(5), 2617–2629.*
452. **Zhou, J., Wang, S., Sun, K., & Chng, W. J. (2016).** *The emerging roles of exosomes in leukemogenesis. Oncotarget, 7(34), 50698–50712.*
453. **Buechele, C. et al. (2020).** *Natural killer cells in chronic lymphocytic leukemia: functional impairment and therapeutic opportunities. Cancers, 12(2), 310.*
454. **Taghiloo, S., & Asgarian-Omran, H. (2024).** *Cross-talk between leukemic and immune cells at the tumor microenvironment in chronic lymphocytic leukemia: An update review. European Journal of Haematology.*
455. **Tsukada, N., Burger, J. A., Zvaifler, N. J., & Kipps, T. J. (2002).** *Distinctive features of “nurselike” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. Blood, 99(3), 1030–1037.*
456. **Boissard, F., Tosolini, M., Ligat, L., Quillet-Mary, A., Lopez, F., Fournié, J. J., & Ysebaert, L. (2016).** *Nurse-like cells promote CLL survival through LFA-3/CD2 interactions. Oncotarget, 8(32), 52225–52236.*
457. **Ochi, T., Sawai, T., Murakami, K., Kamataki, A., & Sakai, T. (2019).** *Nurse-like cells in rheumatoid arthritis: formation of survival niches cooperating between the cell types. Modern Rheumatology, 29(3), 401–409.*
458. **Fiorcari, S., Maffei, R., Atene, C. G., Potenza, L., & Luppi, M. (2021).** *Nurse-like cells and chronic lymphocytic leukemia B cells: A mutualistic crosstalk inside tissue microenvironments. Cells, 10(2), 217.*
459. **Zaaboub, R., Vimeux, L., Contremoulins, V., et al. (2022).** *Nurselike cells sequester B cells in disorganized lymph nodes in chronic lymphocytic leukemia via alternative production of CCL21. Blood Advances, 6(16), 4691–4705.*
460. **Filip, A. A., Cisel, B., & Wąsik-Szczepanek, E. (2015).** *Guilty bystanders: Nurse-like cells as a model of microenvironmental support for leukemic lymphocytes. Clinical and Experimental Medicine, 15(3), 333–344.*
461. **Mesaros, O., Jimbu, L., Neaga, A., Popescu, C., & Berceanu, I. (2020).** *Macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia: Nurse-like cells are the caretakers of leukemic cells. Biomedicines, 8(11), 516.*
462. **Giannoni, P., Pietra, G., Travaini, R., Quarto, R., Benelli, R., & Ferrini, S. (2019).** *Nurse-like cells express hepatocyte growth factor receptor (c-MET) and indoleamine 2,3-dioxygenase and display features of immunosuppressive cells in*

- chronic lymphocytic leukemia. International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5459.
463. **Fletcher, A. L., Acton, S. E., & Knoblich, K.** (2015). *Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. Nature Reviews Immunology*, 15(6), 350–361.
464. **Chyou, S., Ekland, E. H., Carpenter, A. C., Tzeng, T. C., Tian, S., Michaud, M., ... & Lu, T. T.** (2008). *Fibroblast-type reticular stromal cells regulate the lymph node vasculature. The Journal of Immunology*, 181(6), 3887–3896.
465. **Barone, F., Gardner, D. H., Nayar, S., Steinthal, N., Buckley, C. D., & Luther, S. A.** (2016). *Stromal fibroblasts in tertiary lymphoid structures: a novel target in chronic inflammation. Frontiers in Immunology*, 7, 477.
466. **Yasmin, H., Ramesh, R. P. G., & Joseph, A. M.** (2025). *Fibroblast heterogeneity and its role in generating protective immunity in the secondary lymphoid organs. Frontiers in Immunology*, 15, 1519789.
467. **Burger, J. A., & Kipps, T. J.** (2002). *Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. Leukemia & Lymphoma*, 43(3), 461–466.
468. **Guo, F., Wang, Y., Liu, J., Mok, S. C., Xue, F., & Zhang, W.** (2016). *CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. Oncogene*, 35, 816–826.
469. **Caplan AI, Correa D.** The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011 Jul 8;9(1):11-5.
470. **Uccelli A, Moretta L, Pistoia V.** *Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol*. 2008 Sep;8(9):726-36.
471. **Giallongo, S., Duminuco, A., Dulcamare, I., Zuppelli, T., & Romano, A.** (2023). *Engagement of Mesenchymal Stromal Cells in the Remodeling of the Bone Marrow Microenvironment in Hematological Cancers. Biomolecules*, 13 (12), 1701.
472. **Tirado, H. A., Balasundaram, N., Laouimir, L., Erdem, A., & Fortier, M.** (2023). *Metabolic crosstalk between stromal and malignant cells in the bone marrow niche. Bone Reports*, 18, 101376.
473. **Wu, C. H., Weng, T. F., Li, J. P., & Wu, K. H.** (2024). *Biology and therapeutic properties of mesenchymal stem cells in leukemia. International Journal of Molecular Sciences*, 25 (5), 2527.
474. **Ma, Z., Zhou, F., Jin, H., & Wu, X.** (2024). *Crosstalk between CXCL12/CXCR4/ACKR3 and the STAT3 pathway. Cells*, 13(12), 1027.

475. **Zhang, Y., Wang, Y., Yu, T., et al. (2021).** *VCAM-1 expression on mesenchymal stromal cells protects leukemic B cells from apoptosis through FAK/ERK signaling. Leukemia Research, 100, 106483.*
476. **Forte, D., García-Fernández, M., Sanchez-Aguilera, A., Stuckey, J., Valiente, A., Blasco, M. A., ... & Méndez-Ferrer, S. (2020).** *Bone marrow mesenchymal stem cells support acute myeloid leukemia bioenergetics and enhance antioxidant defense and escape from chemotherapy. Cell Metabolism, 32(5), 829–843.e9.*
477. **Ciciarello, M., Fallati, A., D’Amico, G., & Dander, E. (2021).** *Mesenchymal stromal cells (MSCs): an ally of B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) cells in disease maintenance and progression within the bone marrow niche. Cancers, 14(14), 3303.*
478. **Poggi, A., & Giuliani, M. (2016).** *Immunosuppressive features of mesenchymal stromal cells: From bench to bedside. Frontiers in Immunology, 7, 254.*
479. **Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005).** *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood, 105(4), 1815–1822.*
480. **Hess, D. A., Woodside, B. J., & Allan, D. S. (2023).** *MSC-driven adenosinergic immunomodulation via CD73/CD39 in the tumor microenvironment. Cells, 12(9), 1316.*
481. **O’Donnell, A., Pepper, C., Mitchell, S., & Pepper, A. (2023).** *NF- $\kappa$ B and the CLL microenvironment. Frontiers in Oncology, 13, 1169397.*
482. **Burley, T.A., Kennedy, E., Broad, G., Boyd, M., Li, D., Woo, T., ... & Rose-Zerilli, M. (2022).** *Targeting the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway in chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. Cancers, 14(6), 1489.*
483. **van Attekum, M.H.A., Terpstra, S., Slinger, E., von Lindern, M., Eldering, E., & Kater, A.P. (2017).** *Macrophages confer survival signals via CCR1-dependent translational MCL-1 induction in chronic lymphocytic leukemia. Oncogene, 36(47), 6538–6546.*
484. **Herishanu, Y., Pérez-Galán, P., Liu, D., Biancotto, A., Pittaluga, S., Vire, B., ... & Wiestner, A. (2011).** *The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- $\kappa$ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. Blood, 117(2), 563–574.*
485. **Ruetsch-Chelli, C. (2023).** *Étude de la reprogrammation métabolique des cellules de leucémie lymphoïde chronique dans un modèle ex-vivo de la niche lymphatique [Thèse de doctorat, Université de Strasbourg]. HAL.*

486. **Lazarian, G.** (2020). *Études de l'impact des anomalies génétiques dans l'initiation, l'évolution et la résistance au traitement dans la leucémie lymphoïde chronique [Thèse de doctorat, Université Sorbonne Paris Nord]. HAL.*
487. **Andreeff, M. et al.** (2020). *The bone marrow microenvironment: the haven for leukemic stem cells. Blood Reviews, 34, 100512.*
488. **Shafat MS, Oellerich T, Mohr S, Robinson SD, Edwards DR, Marlein CR, Piddock RE, Fenech M, Zaitseva L, Abdul-Aziz A, Turner J, Watkins JA, Lawes M, Bowles KM, Rushworth SA.** (2017) *Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. Blood. 129(10):1320-1332.*
489. **Thus, Y. J., Eldering, E., & Kater, A. P.** (2022). *Tipping the balance: toward rational combination therapies to overcome venetoclax resistance in mantle cell lymphoma. Leukemia, 36, 1941–1953.*
490. **Grégoire, M., & Pangault, C.** (2014). *Interaction of stromal cells and chronic lymphocytic leukemia cells: from the survival niche to the therapeutic target. Bulletin du Cancer, 101(9), 763–774.*
491. **Dumontet, E., Mancini, S. J. C., & Tarte, K.** (2021). *Bone marrow lymphoid niche adaptation to mature B cell neoplasms. Frontiers in Immunology, 12, 784691.*
492. **Dubois, N., Crompton, E., Meuleman, N., Bron, D., & Lagneaux, L.** (2020). *Importance of Crosstalk Between Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and the Stromal Microenvironment : Direct Contact, Soluble Factors, and Extracellular Vesicles. Frontiers in Oncology, 10, 1422.*
493. **Deynoux, M., Sunter, N., Ducrocq, E., Dakik, H., Guibon, R., Saada, V., ... & Souquet, M.** (2020). *A comparative study of the capacity of mesenchymal stromal cell lines to form spheroids. PLoS ONE, 15(12), e0225485.*
494. **Takagi, M.** (2005). *Cell processing engineering for ex-vivo expansion of hematopoietic cells. Journal of Bioscience and Bioengineering, 100(5), 470–478.*
495. **Cho, B. S., Kim, H. J., & Konopleva, M.** (2017). *Targeting the CXCL12/CXCR4 axis in acute myeloid leukemia: from bench to bedside. The Korean Journal of Internal Medicine, 32(2), 248–257.*
496. **Roecklein, B. A., & Torok-Storb, B.** (1995). *Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. Blood, 85(4), 997–1005.*
497. **Adamo, A., Delfino, P., Gatti, A., Bonato, A., Kamga, P. T., Bazzoni, R., & Krampera, M.** (2020). *HS-5 and HS-27A stromal cell lines to study bone marrow*

- mesenchymal stromal cell-mediated support to cancer development. Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 584232.
498. **Miari, K. E., & Williams, M. T. S.** (2023). *Stromal bone marrow fibroblasts and mesenchymal stem cells support acute myeloid leukaemia cells and promote therapy resistance. British Journal of Pharmacology.*
499. **Costé, É., & Rouleux-Bonnin, F.** (2020). *A validated strategy for choosing reference genes: Identification of miR-191-5p for normalization of miRNA expression in bone marrow mesenchymal stromal cells and HS27a/HS5 cell lines. Scientific Reports*, 10, 17442.
500. **Paggetti J, Haderk F, Seiffert M, Janji B, Distler U, Ammerlaan W, Kim YJ, Adam J, Lichter P, Solary E, Berchem G, Moussay E.** *Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. Blood.* 2015 Aug 27;126(9):1106-17.
501. **Lwin, T., Crespo, L. A., Wu, A., Dessureault, S., Shu, H. B., & Sotomayor, E.** (2009). *Lymphoma cell adhesion-induced expression of B cell-activating factor of the TNF family in bone marrow stromal cells protects non-Hodgkin's B lymphoma cells from apoptosis. Leukemia*, 23(1), 170–177.
502. **Vangapandu HV, Ayres ML, Bristow CA, Wierda WG, Keating MJ, Balakrishnan K, Stellrecht CM, Gandhi V.** *The Stromal Microenvironment Modulates Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. Neoplasia.* 2017 Oct;19(10):762-771.
503. **Steinmetz, G.** (2023). *Regulation of PD-L1 surface expression on CLL cells by small molecule inhibitors and the functional consequences on T cell mediated cytotoxicity [Doctoral dissertation, Universität zu Köln]. Universität zu Köln.*
504. **Basile, A., Giudice, V., Mettivier, L., Falco, A., Gorrese, M., Gatti, M. C., Maurea, N., & Selleri, C.** (2024). *Tuning the B-CLL microenvironment: evidence for BAG3 protein-mediated regulation of stromal fibroblasts activity. Cell Death Discovery*, 10, Article 153.
505. **Amigo-Jiménez, I., Bailón, E., Aguilera-Montilla, N., Terol, C., García-Marco, M., Sánchez-Beato, F., & Piris, M. A.** (2015). *Bone marrow stroma-induced resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to arsenic trioxide involves Mcl-1 upregulation and is overcome by inhibiting the PI3K $\delta$  pathway. Oncotarget*, 6(6), 44832–44844.

506. **Kay NE, Shanafelt TD, Strege AK, Lee YK, Bone ND, Raza A.** (2007) *Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an "angiogenic switch". Leuk Res. Jul;31(7):899-906.*
507. **Mangolini, M., & Ringshausen, I.** (2020). *Bone marrow stromal cells drive key hallmarks of B cell malignancies. International Journal of Molecular Sciences, 21(4), 1466.*
508. **Lutzny, G. E., Kocher, T., Schmidt-Supprian, M., Rudelius, M., Klein-Hitpass, L., Henschler, R., Beilhack, A., Engelhardt, M., & Rosenwald, A.** (2013). *Protein kinase C- $\beta$ -dependent activation of NF- $\kappa$ B in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vitro. Cancer Research, 73(8), 2725–2736.*
509. **Apollonio, B., Ioannou, N., Papazoglou, D., Caron, G., Grigoriou, M., Pizzitola, I., Courtois, G., Campo, E., & Ramsay, A. G.** (2021). *Understanding the immune-stroma microenvironment in B cell malignancies for effective immunotherapy. Frontiers in Oncology, 11, 626818.*
510. **Kumagai S, Koyama S, ... & Nishikawa H.** (2022) *Lactic acid promotes PD-1 expression in regulatory T cells in highly glycolytic tumor microenvironments. Cancer Cell. Feb 14;40(2):201-218.e9.*
511. **Geeraerts X, Fernández-García J, Hartmann FJ, ... Van Ginderachter JA.** (2021) *Macrophages are metabolically heterogeneous within the tumor microenvironment. Cell Rep. Dec 28;37(13):110171.*
512. **ten Hacken E, Burger JA.** (2014) *Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. Pharmacol Ther. Dec;144(3):338-48.*
513. **Caligaris-Cappio, F., & Ghia, P.** (2008). *Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: Are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? Journal of Clinical Oncology, 26(27), 4497–4503.*
514. **Byrd, J. C., Furman, R. R., Coutre, S. E., Flinn, I. W., Burger, J. A., Blum, K. A., ... & O'Brien, S. M.** (2013). *Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine, 369(1), 32–42.*
515. **Jennifer R. Brown** (2018) *How I treat CLL patients with ibrutinib. Blood ; 131(4): 379–386.*

516. **Chen, Z., Simon-Molas, H., Cretenet, G., Valle-Argos, B., Smith, L. D., Forconi, F., Schomakers, B. V., van Weeghel, M., Bryant, D. J., van Bruggen, J. A. C., Peters, F. S., Rathmell, J. C., van der Windt, G. J. W., Kater, A. P., Packham, G., & Eldering, E. (2022).** *Characterization of metabolic alterations of chronic lymphocytic leukemia in the lymph node microenvironment. Blood, 140(6), 630–641.*
517. **Pavlidis, S., Tsigos, A., Vera, I., Flomenberg, N., Frank, P. G., Casimiro, M. C., Wang, C., Pestell, R. G., Martinez-Outschoorn, U. E., Howell, A., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2009).** *The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. Cell Cycle, 8(23), 3984–4001.*
518. **Hou, X., Zhang, J., Wang, Y., Xiong, W., & Mi, J. (2017).** *TGFBR-IDH1-Cav1 axis promotes TGF- $\beta$  signalling in cancer-associated fibroblast. Oncotarget, 8(49), 83962–83974.*
519. **Beijer, N. R. M., Nauryzgaliyeva, Z. M., Arteaga, E. M., van den Broek, M. C. M., Mota, C., van Blitterswijk, C., & Moroni, L. (2019).** *Dynamic adaptation of mesenchymal stem cell physiology upon exposure to surface micropatterns. Scientific Reports, 9, 9536.*
520. **Kim M, Kim T, Johnson RL, Lim DS. (2015)** *Transcriptional co-repressor function of the hippo pathway transducers YAP and TAZ. Cell Rep. Apr 14;11(2):270-82.*
521. **Mostaço-Guidolin LB, Ko AC, Wang F, Xiang B, Hewko M, Tian G, Major A, Shiomi M, Sowa MG. (2013)** *Collagen morphology and texture analysis: from statistics to classification. Sci Rep. 2013; 3:2190.*
522. **Rice, W. L., Kaplan, D. L., & Georgakoudi, I. (2010).** *Two-photon microscopy for non-invasive, quantitative monitoring of stem cell differentiation. PLOS ONE, 5(4), e10075.*
523. **Burger, J. A. (2013).** *The CLL cell microenvironment. In J. A. Burger (Ed.), Advances in Chronic Lymphocytic Leukemia (pp. 25–43). Springer.*
524. **Nardone, G., Oliver-De La Cruz, J., Vrbsky, J., Martini, C., Pribyl, L., Skládal, P., Pešl, M., Caluori, C., Pagliari, S., Martino, F., Maceckova, Z., Hajduch, M., Sanz-Garcia, A., Pugno, N. M., Stepniak, E., de Sousa Lopes, S. M. C., & Forte, G. (2017).** *YAP regulates cell mechanics by controlling focal adhesion assembly. Nature Communications, 8, Article 15321.*
525. **Rausch, V., & Hansen, C. G. (2020).** *The Hippo pathway, YAP/TAZ, and the plasma membrane. Trends in Cell Biology, 30(1), 32–48.*

526. **Hogg, N., Richards, L., Jones, K., & Andrew, P. W.** (2011). *The integrins Mac-1 and  $\alpha 4\beta 1$  perform crucial roles in neutrophil and T cell recruitment to lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *The Journal of Immunology*, 186(10), 5907–5915.*
527. **Hemler, M. E.** (2005). *Tetraspanin functions and associated microdomains. Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(10), 801–811.
528. **Dustin, M. L., & Springer, T. A.** (1988). *Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. Journal of Cell Biology*, 107(1), 321–331.
529. **Brenet, M., Martínez, S., Pérez-Nuñez, R., Díaz, J., Leyton, L., & Pérez, L. A.** (2021). *Thy-1 (CD90)-Induced Metastatic Cancer Cell Migration and Invasion Are  $\beta 3$  Integrin-Dependent and Involve a  $Ca^{2+}$ /P2X7 Receptor Signaling Axis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, Article 592442.*
530. **Mitra, S. K., Hanson, D. A., & Schlaepfer, D. D.** (2005). *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(1), 56–68.
531. **Turner, C. E.** (2000). *Paxillin interactions. Journal of Cell Science*, 113(23), 4139–4140.
532. **Deakin, N. O., & Turner, C. E.** (2008). *Paxillin comes of age. Journal of Cell Science*, 121(15), 2435–2444.
533. **Pankov, R., & Yamada, K. M.** (2002). *Fibronectin at a glance. Journal of Cell Science*, 115(20), 3861–3863.
534. **Hynes, R. O.** (2009). *The extracellular matrix: not just pretty fibrils. Science*, 326(5957), 1216–1219.
535. **Hartsock, A., & Nelson, W. J.** (2008). *Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(3), 660–669.
536. **Weis WI, Nelson WJ.** (2006) *Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. J Biol Chem. Nov 24;281(47):35593-7. Epub 2006 Sep 27.*
537. **Kehrberg RJ, DeMali KA.** (2025) *E-Cadherin: A conductor of cellular signaling. Curr Opin Cell Biol. Jun 12; 95:102559.*
538. **Ahmad, U. S., Uttagomol, J., & Wan, H.** (2022). *The regulation of the Hippo pathway by intercellular junction proteins. Life*, 12(11), 1792.

539. **Sun Y, Zhang J, Ma L.** (2014)  *$\alpha$ -catenin. A tumor suppressor beyond adherens junctions. Cell Cycle. ;13(15):2334-9.*
540. **Lin, W.-H., Cooper, L. M., & Anastasiadis, P. Z.** (2023). *Cadherins and catenins in cancer: Connecting cancer pathways and tumor microenvironment. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 11, 1137013.*
541. **Tang, Y., Thiess, L., Weiler, S. M. E., Tóth, M., Rose, F., Longerich, T., et al.** (2023).  *$\alpha$ -catenin interaction with YAP/FoxM1/TEAD-induced CEP55 supports liver cancer cell migration. Cell Communication and Signaling, 21, 127.*
542. **Rosenbluh, J., Nijhawan, D., Cox, A. G., Li, X., Neal, J. T., Schafer, E. J., et al.** (2012).  *$\beta$ -catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. Cell, 151(7), 1457–1473.*
543. **Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordóñez, G. R., Villamor, N., ... & López-Otín, C.** (2011). *Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. Nature, 475(7354), 101–105.*
544. **Landau, D. A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A. N., Stewart, C., Reiter, J. G., Bahlo, J., ... & Wu, C. J.** (2015). *Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. Nature, 526(7574), 525–530.*
545. **Burger, J. A., & Gribben, J. G.** (2014). *The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies. Seminars in Cancer Biology, 24, 71–81.*
546. **Calissano C, Damle RN, Marsilio S, Yan XJ, Yancopoulos S, Hayes G, Emson C, Murphy EJ, Hellerstein MK, Sison C, Kaufman MS, Kolitz JE, Allen SL, Rai KR, Ivanovic I, Dozmorov IM, Roa S, Scharff MD, Li W, Chiorazzi N.** (2011) *Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. Mol Med. ;17(11-12):1374-82.*
547. **Ten Hacken E, Burger JA.** (2016) *Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. Biochim Biophys Acta. Mar;1863(3):401-413.*
548. **Ghia, P., Circosta, P., Scielzo, C., Vallario, A., Camporeale, A., Gottardi, D., ... & Caligaris-Cappio, F.** (2005). *Differential effects on CLL cell survival exerted by different microenvironmental elements. In: Chronic Lymphocytic Leukemia (pp. 121–136). Springer.*

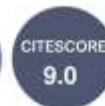
549. **Jitschin R, Braun M, Qorraj M, Saul D, Le Blanc K, Zenz T, Mougiakakos D.** (2015) *Stromal cell-mediated glycolytic switch in CLL cells involves Notch-c-Myc signaling.* *Blood.* May 28;125(22):3432-6.
550. **Ma, S., Meng, Z., Chen, R., & Guan, K. L.** (2019). *The Hippo pathway: biology and pathophysiology.* *Annual Review of Biochemistry,* 88, 577–604.
551. **Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Howell A, Pestell RG, Tanowitz HB, Sotgia F, Lisanti MP.** (2011) *Stromal-epithelial metabolic coupling in cancer: integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment.* *Int J Biochem Cell Biol.* Jul;43(7):1045-51.
552. **van Bruggen JAC, Martens AWJ, Fraietta JA, Hofland T, Tonino SH, Eldering E, Levin MD, Siska PJ, Endstra S, Rathmell JC, June CH, Porter DL, Melenhorst JJ, Kater AP, van der Windt GJW.** (2019) *Chronic lymphocytic leukemia cells impair mitochondrial fitness in CD8<sup>+</sup> T cells and impede CAR T-cell efficacy.* *Blood.* Jul 4;134(1):44-58.
553. **Rozovski U, Grgurevic S, Bueso-Ramos C, Harris DM, Li P, Liu Z, Wu JY, Jain P, Wierda W, Burger J, O'Brien S, Jain N, Ferrajoli A, Keating MJ, Estrov Z.** (2015) *Aberrant LPL Expression, Driven by STAT3, Mediates Free Fatty Acid Metabolism in CLL Cells.* *Mol Cancer Res.* May;13(5):944-53.
554. **Beloueche-Babari, M., Casals Galobart, T., Delgado-Goni, T., Wantuch, S., Parkes, H. G., Tandy, D., Arunan, V., Ragousis, V., Chung, Y. L., & Leach, M. O.** (2020). *Monocarboxylate transporter 1 blockade with AZD3965 inhibits lipid biosynthesis and increases tumour immune cell infiltration.* *British Journal of Cancer,* 122(6), 895–903.
555. **Yan X, Chen YG.** (2011) *Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- $\beta$  signalling.* *Biochem J.* Feb 15;434(1):1-10.
556. **Hofbauer JP, Heyder C, Denk U, Kocher T, Holler C, Trapin D, Asslaber D, Tinhofer I, Greil R, Egle A.** (2011) *Development of CLL in the TCL1 transgenic mouse model is associated with severe skewing of the T-cell compartment homologous to human CLL.* *Leukemia.* Sep;25(9):1452-8.
557. **Kalluri, R.** (2016). *The biology and function of fibroblasts in cancer.* *Nature Reviews Cancer,* 16(9), 582–598.
558. **Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP.** (2012) *Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis.* *Cell Cycle.* Nov 1 ;11(21) :3964-71. doi: 10.4161/cc.22137. Epub 2012 Sep 19.

559. **Gascard, P., & Tlsty, T. D. (2016).** *Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy.* *Genes & Development, 30(9), 1002–1019.*
560. **Colegio, O. R., Chu, N. Q., Szabo, A. L., Chu, T., Rhebergen, A. M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C. E., Eisenbarth, S. C., Phillips, G. M., & Medzhitov, R. (2014).** *Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid.* *Nature, 513(7519), 559–563.*
561. **Green, H., & Kehinde, O. (1974).** *Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid.* *Cell, 1(3), 113–116.*
562. **Rodriguez, A. M., Elabd, C., Delteil, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Marc, P., Guesnet, P., Guezennec, C. Y., Amri, E. Z., & Dani, C. (2004).** *Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue.* *Biochemical and Biophysical Research Communications, 315(2), 255–263.*
563. **Zaragosi, L. E., Wdziekonski, B., Brigand, K. L., Villageois, P., Mari, B., Waldmann, R., & Dani, C. (2011).** *Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis.* *Genome Biology, 12(7), R64.*
564. **Wada, K., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., & Sasaki, H. (2011).** *Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers.* *Development, 138(18), 3907–3914.*
565. **Schiller, H. B., & Fässler, R. (2013).** *Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell–matrix adhesions.* *EMBO Reports, 14(6), 509–519.*
566. **Hirata, H., Tatsumi, H., Lim, C. T., & Sokabe, M. (2014).** *Force-dependent vinculin binding to talin in live cells: a crucial step in anchoring the actin cytoskeleton to focal adhesions.* *American Journal of Physiology - Cell Physiology, 306(6), C607–C620.*
567. **Totaro A, Castellan M, Battilana G, Zanconato F, Azzolin L, Giulitti S, Cordenonsi M, Piccolo S. (2017)** *YAP/TAZ link cell mechanics to Notch signalling to control epidermal stem cell fate.* *Nat Commun. May 17; 8:15206.*
568. **Das, A., Fischer, R. S., Pan, D., & Waterman, C. M. (2016).** *YAP nuclear localization in the absence of cell–cell contact is mediated by a filamentous actin-dependent, myosin II– and phospho-YAP–independent pathway during extracellular matrix mechanosensing.* *Journal of Biological Chemistry, 291(12), 6096–6110.*
569. **Shimizu, Y., Newman, W., Gopal, T.V., Horgan, K.J., Graber, N., Beall, L.D., Van Seventer, G.A., Shaw, S. (1991).** *Four molecular pathways of T cell adhesion to*

- endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. The Journal of Cell Biology, 113(5), 1203–1212.*
570. **Springer, T.A.** (1994). *Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. Annual Review of Physiology, 57, 827–872.*
571. **Sawant M, Hinz B, Schönborn K, et al.** (2021) *A story of fibers and stress: Matrix-embedded signals for fibroblast activation in the skin. Wound Rep Reg.; 29: 515–530.*
572. **Nicola T, Hagood JS, James ML, Macewen MW, Williams TA, Hewitt MM, Schwiebert L, Bulger A, Oparil S, Chen YF, Ambalavanan N.** (2009) *Loss of Thy-1 inhibits alveolar development in the newborn mouse lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. May;296(5):L738-50.*
573. **Wetzel A, Chavakis T, Preissner KT, Sticherling M, Hausteil UF, Anderegg U, Saalbach A.** (2004) *Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). J Immunol. Mar 15;172(6):3850-9.*
574. **Barker, T. H., & Hagood, J. S.** (2009). *Getting a grip on Thy-1 signaling. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1793(5), 921–923.*
575. **Rege, T. A., & Hagood, J. S.** (2006). *Thy-1 as a regulator of cell–cell and cell–matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. The FASEB Journal, 20(8), 1045–1054.*
576. **Nader, G.P.F., Ezratty, E.J., & Gundersen, G.G.** (2016). *FAK, talin and PIPKI $\gamma$  regulate endocytosed integrin activation to polarize focal adhesion assembly. Nature Cell Biology, 18(5), 491–503.*
577. **Liu, T., Zhou, L., Yang, K., Iwasawa, K., Andl, T., & Zhang, Y.** (2019). *The  $\beta$ -catenin/YAP signaling axis is a key regulator of melanoma-associated fibroblasts. Signal Transduction and Targeted Therapy, 4(1), 63.*
578. **Athavale D, Balch C, Zhang Y, Yao X, Song S.** (2024) *The role of Hippo/YAP1 in cancer-associated fibroblasts: Literature review and future perspectives. Cancer Lett. Nov 1; 604:217244.*
579. **Burger, J.A., Tsukada, N., Burger, M., Zvaifler, N.J., Dell'Aquila, M., & Kipps, T.J.** (2000). *Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell–derived factor-1. Blood, 96(8), 2655–2663.*

580. **Bernard, S., Danglade, D., Gardano, L., Laguillier, C., Lazarian, G., Roger, C., Thieblemont, C., Marzec, J., Gribben, J., Cymbalista, F., Varin-Blank, N., Ledoux, D., & Baran-Marszak, F. (2015).** *Inhibitors of BCR signalling interrupt the survival signal mediated by the micro-environment in mantle cell lymphoma. International Journal of Cancer, 136(12), 2761–2774.*
581. **Kurtova, A. V., Balakrishnan, K., Chen, R., Ding, W., Schnabl, M. J., Abdelrahim, M., Keating, M. J., & Wierda, W. G. (2009).** *Stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion–mediated drug resistance. Blood, 114(20), 4441–4450.*
582. **Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J., & Horwitz, E. (2006).** *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 8(4), 315–317.*
583. **dos Santos Goldenberg, R.C., & de Carvalho, A.C.C. (Eds.). (2023).** *Resident Stem Cells and Regenerative Therapy: Sources and Clinical Applications. Springer. Chapter: CD90 and the modulation of canonical Wnt and TGF- $\beta$  pathways in mesenchymal stem cells.*
584. **Borlongan, M.C., & Wang, H. (2023).** *Profiling and targeting cancer stem cell signaling pathways for cancer therapeutics. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 11, 1125174.*
585. **Pérez, L. A., Leyton, L., & Valdivia, A. (2022).** *Thy-1 (CD90), integrins and syndecan 4 are key regulators of skin wound healing. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 10, 810474.*
586. **Paul, C. D., Mistriotis, P., & Konstantopoulos, K. (2017).** *Cancer cell motility: Lessons from migration in confined spaces. Nature Reviews Cancer, 17(2), 131–140.*
587. **Wisdom, K. M., Chaudhuri, O., et al. (2018).** *Matrix mechanical plasticity regulates cancer cell migration through confining microenvironments. Nature Communications, 9, 4144.*
588. **Deville, S. S., & Cordes, N. (2019).** *The extracellular, cellular, and nuclear stiffness, a trinity in the cancer resistome—A review. Frontiers in Oncology, 9, 1376.*

589. **Haselager, M.V., Perelaer, E., Kater, A.P., & Eldering, E. (2020).** *Development of a novel lymph node-based 3D culture system promoting chronic lymphocytic leukemia proliferation and survival. Blood, 136(1), 135–145.*
590. **Loos, R., Kater, A.P., Moerland, P.D., & Eldering, E. (2023).** *In vitro 3D spheroid culture system displays sustained T cell-dependent CLL proliferation and survival. HemaSphere, 7(4), e938.*
591. **Bertolio, R., Napoletano, F., & Del Sal, G. (2023).** *Dynamic links between mechanical forces and metabolism shape the tumor milieu. Current Opinion in Cell Biology, 84, 102239.*
592. **Romani, P., Valcarcel-Jimenez, L., Frezza, C., & Zaganjor, E. (2021).** *Crosstalk between mechanotransduction and metabolism. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 22(1), 22–38.*



## Article

# Identification of the Axis $\beta$ -Catenin–BTK in the Dynamic Adhesion of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to Their Microenvironment

Imane Mihoub, Tareck Rharass, Souhaïl Ouriemmi, Antonin Oudar, Laure Aubard, Valérie Gratio, Gregory Lazarian, Jordan Ferreira, Elisabetta Dondi, Florence Cymbalista et al.

## Special Issue

Recent Advances in Tumor Microenvironment and Molecular Targeting in Multiple Myeloma and Chronic Lymphocytic Leukemia

Edited by  
Dr. Cirino Botta and Dr. Massimo Gentile



<https://doi.org/10.3390/ijms242417623>



Article

# Identification of the Axis $\beta$ -Catenin–BTK in the Dynamic Adhesion of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to Their Microenvironment

Imane Mihoub <sup>1,2,†</sup>, Tareck Rharass <sup>1,2,†</sup>, Souhail Ouriemmi <sup>1,2</sup>, Antonin Oudar <sup>1,2</sup>, Laure Aubard <sup>1,2</sup>, Valérie Gratio <sup>3</sup>, Gregory Lazarian <sup>1,2,4</sup>, Jordan Ferreira <sup>1,2</sup>, Elisabetta Dondi <sup>1,2</sup>, Florence Cymbalista <sup>1,2,4</sup>, Vincent Levy <sup>5</sup>, Fanny Baran-Marszak <sup>1,2,4</sup>, Nadine Varin-Blank <sup>1,2,\*</sup>, Dominique Ledoux <sup>1,2</sup>, Christine Le Roy <sup>1,2,†</sup> and Laura Gardano <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> INSERM, U978, 93000 Bobigny, France; mihoub.imane993@gmail.com (I.M.); souhail.ouriemmi@univ-paris13.fr (S.O.); antonin.oudar@inserm.fr (A.O.); laure.aubard@inserm.fr (L.A.); gregory.lazarian@aphp.fr (G.L.); jordan.ferreira@univ-paris13.fr (J.F.); elisabetta.dondi@inserm.fr (E.D.); florence.cymbalista@aphp.fr (F.C.); fanny.baran-marszak@aphp.fr (F.B.-M.); ledoux@univ-paris13.fr (D.L.); christine.le-roy@inserm.fr (C.L.R.)
- <sup>2</sup> UFR SMBH, LabEx INFLAMEX, Université Paris 13—«Sorbonne Paris Nord», 93000 Bobigny, France
- <sup>3</sup> INSERM U1149, Université Paris Cité, Hôpital Bichat, 75018 Paris, France; valerie.gratio@inserm.fr
- <sup>4</sup> AP-HP Hôpital Avicenne, 93000 Bobigny, France
- <sup>5</sup> URC, AP-HP Hôpital Avicenne, 93000 Bobigny, France; vincent.levy@aphp.fr
- \* Correspondence: nadine.varin@inserm.fr (N.V.-B.); laura.gardano@univ-paris13.fr (L.G.)
- † These authors contributed equally to this work.
- ‡ These authors also contributed equally to this work.



**Citation:** Mihoub, I.; Rharass, T.; Ouriemmi, S.; Oudar, A.; Aubard, L.; Gratio, V.; Lazarian, G.; Ferreira, J.; Dondi, E.; Cymbalista, F.; et al. Identification of the Axis  $\beta$ -Catenin–BTK in the Dynamic Adhesion of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to Their Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 17623. <https://doi.org/10.3390/ijms242417623>

Academic Editors: Cirino Botta and Massimo Gentile

Received: 8 November 2023  
Revised: 1 December 2023  
Accepted: 11 December 2023  
Published: 18 December 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** In the microenvironment, cell interactions are established between different cell types to regulate their migration, survival and activation.  $\beta$ -Catenin is a multifunctional protein that stabilizes cell–cell interactions and regulates cell survival through its transcriptional activity. We used chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells as a cellular model to study the role of  $\beta$ -catenin in regulating the adhesion of tumor cells to their microenvironment, which is necessary for tumor cell survival and accumulation. When co-cultured with a stromal cell line (HS-5), a fraction of the CLL cells adhere to stromal cells in a dynamic fashion regulated by the different levels of  $\beta$ -catenin expression. In non-adherent cells,  $\beta$ -catenin is stabilized in the cytosol and translocates into the nucleus, increasing the expression of cyclin D1. In adherent cells, the level of cytosolic  $\beta$ -catenin is low but membrane  $\beta$ -catenin helps to stabilize the adhesion of CLL to stromal cells. Indeed, the overexpression of  $\beta$ -catenin enhances the interaction of CLL with HS-5 cells, suggesting that this protein behaves as a regulator of cell adhesion to the stromal component and of the transcriptional regulation of cell survival. Inhibitors that block the stabilization of  $\beta$ -catenin alter this equilibrium and effectively disrupt the support that CLL cells receive from the cross-talk with the stroma.

**Keywords:**  $\beta$ -catenin; microenvironment; CLL; BTK; stromal cells

## 1. Introduction

The trafficking of immune cells between the blood and secondary lymphoid organs is the result of the interplay between concentrations of specific chemokines and the expression of their receptors on immune cells. In the microenvironment, e.g., in blood, bone marrow or lymph nodes, immune cells interact with the different cell populations and regulate their trafficking, i.e., the balance between adhesion and migration [1]. The interaction with the microenvironment is critical for the tissue-specific accumulation of tumor cells in the majority of lymphomas, including mantle cell lymphoma (MCL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL), among others [2]. MCL and CLL cells rapidly undergo apoptosis when isolated from a patients' blood, whereas culture them on a feeder layer prolongs their life

and allows them to be maintained in culture for a long period of time [3]. This feeder layer, composed of bone-marrow-derived stromal cells, is used to mimic the microenvironment and study the interaction established between tumor cells and the stromal component of the microenvironment. Among the plethora of signaling pathways that are activated by the microenvironment and elicit a survival response, the Wnt signaling pathway has received much attention in CLL in recent years, as Wnt signaling effectors are frequently mutated in CLL cells, although none are drivers of the disease [4–7]. However, mutations that disable genes encoding Wnt signaling effectors, including  $\beta$ -catenin, exacerbate CLL phenotypes, suggesting that this pathway plays an important role in the hallmarks of the disease [6]. Wnt refers to a family of 19 glycoproteins that interact with cellular receptors to initiate signaling cascades to control cell proliferation, migration and differentiation [8]. The Wnt signaling pathway can be divided into canonical and non-canonical signaling pathways based on their dependence on the protein  $\beta$ -catenin as a signaling effector [8]. The non-canonical signaling pathway involves membrane proteins that mainly control the level of planar cell polarity (PCP) [9]. In CLL, the ligands Wnt5A and Wnt5B, which regulate the non-canonical Wnt/PCP pathway, and their effectors are overexpressed, and they regulate the communication of CLL cells with the microenvironment [10]. In addition, the activation of Wnt5a signaling enhances CLL chemotaxis towards CXCL12 [11–13]. On the other hand, the canonical signaling pathway depends on  $\beta$ -catenin, which is stabilized in response to Wnt ligands and translocates into the nucleus where it participates in the transcription of genes involved in cell cycle regulation, proliferation and migration [14]. In the absence of Wnt,  $\beta$ -catenin is degraded by the proteasome following its phosphorylation by casein kinase I at the serine residue S45, followed by GSK3 $\beta$  at S33, S37 and T41. According to the model, Wnt ligands inhibit GSK3 $\beta$  activity, thereby reducing the phosphorylation and degradation of  $\beta$ -catenin [15]. Upon its translocation into the nucleus,  $\beta$ -catenin interacts with the TCF/LEF family of transcription factors and activates the transcription of Wnt-dependent target genes. However, the interaction of  $\beta$ -catenin with nuclear partners is not restricted to the TCF/LEF family, as other transcription factors, such as Sox, FOXO and NF- $\kappa$ B are known to interact with  $\beta$ -catenin via both Wnt-dependent and -independent routes [16]. Previously, we have shown that  $\beta$ -catenin is a BCR effector in MCL, as it is stabilized in a BTK-dependent manner upon antigenic stimulation [17]. Its translocation into the nucleus contributes to the transcription of NF- $\kappa$ B target genes such as IL-6, thereby increasing the survival of MCL cells. In parallel to its involvement in the Wnt signaling pathway,  $\beta$ -catenin has other functions, such as stabilizing cellular junctions by interacting with the intracellular domain of cadherins [18]. The interaction between  $\beta$ -catenin and cadherins has been described to have both positive and negative roles on its transcriptional behavior, depending on the cell type [14,19,20]. Cadherins mediate homo- and heterotypic intercellular interactions, although they can also affect signaling pathways where ligands and receptors are exposed on the cell surfaces of interacting cells, e.g., notch/delta [21]. In a co-culture model of CLL cells with bone marrow stromal cells, stromal Notch2 was shown to contribute to  $\beta$ -catenin stabilization in CLL cells to enhance survival signals in the microenvironment [22]. In CLL cells, the kinase BTK integrates signals from the microenvironment as downstream effectors of several chemokines, such as CXCL12 [23]. The stimulation of CXCR4 by its ligand CXCL12 leads to the very rapid phosphorylation of BTK, followed by integrin activation, which increases CLL cell migration and adhesion to VCAM-1 expressed on the surfaces of microenvironmental cells [24]. The activity of BTK is controlled by its phosphorylation status, with the Lyn-dependent phosphorylation of the tyrosine residue located at the position 551 in the C-terminus (Y551) priming its autophosphorylation at Y223 in the SH3 domain, which fully activates the catalytic activity of BTK [25]. However, BTK kinase activity is not required for all of its functions, suggesting that BTK also acts as an adaptor molecule [26].

As two signaling effectors from the microenvironment, we investigated the roles of  $\beta$ -catenin and BTK in CLL cells in a co-culture model with human stromal cells (HS-5). We describe a dynamic interaction of CLL cells with the stromal component, resulting in an

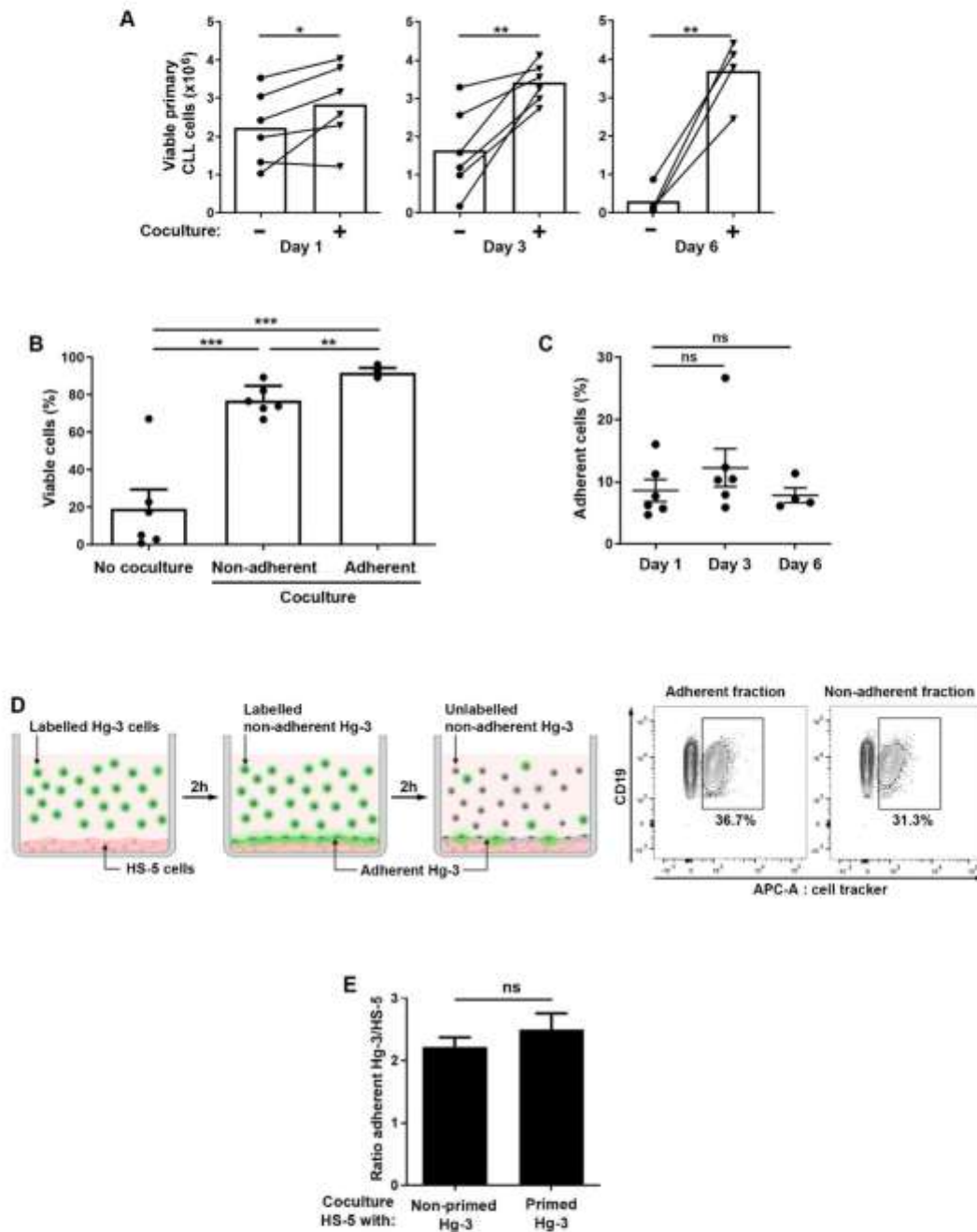
adhesion–detachment equilibrium. In CLL cells non-adhering to stromal cells,  $\beta$ -catenin is upregulated and accumulates in the nucleus. Conversely, in adherent CLL cells to the stromal component,  $\beta$ -catenin is detected only at the cell membrane, suggesting a role in cell adhesion. This model is supported by the observation that the overexpression of  $\beta$ -catenin in CLL cells increases their adhesion to the stromal component. Thus,  $\beta$ -catenin represents an important element that regulates the adhesion of CLL cells to the microenvironment.

## 2. Results

### 2.1. Relationship between the Adhesion and Survival of CLL B Cells in the Microenvironment

CLL cells rely on their interaction with the microenvironment for their survival and tumor maintenance. To dissect the molecular basis of tumor cell–microenvironment communication, we used a validated co-culture system to reproduce in vitro the microenvironment in which CLL cells can survive [27]. The co-culturing of CLL B cells with a feeder layer of a bone marrow stromal cell line (HS-5) prolongs their survival, as shown by the increase in the percentage of viable cells when co-cultured for up to 6 days as compared to cells maintained in culture without a feeder layer for the same amount of time (Figure 1A). When tumor CLL B cells are cultured with HS-5 cells, a fraction of them promptly adhere to the feeder layer. When we compared the viability of cells recovered with stromal cells versus the cells in the medium, we found a higher percentage of viable cells associated with stromal cells, indicating the existence of a relationship between adhesion and survival (Figure 1B). To investigate this relationship, we first analyzed the dynamic of the interaction of the CLL cells with the stromal component. When Hg-3 cells, a CLL cell line, were co-cultured with HS-5 cells for different time points, we observed that the percentage and the number of Hg-3 cells associated with HS-5 cells after the removal of the non-adherent CLL cells did not significantly change over this time range (Supplementary Figure S1A,B). The same results were found with primary CLL cells co-cultured with HS-5 for up to 6 days (Figure 1C). Next, we asked whether CLL cells were able to detach from HS-5 cells so that the percentage of adherent cells was the result of a dynamic attachment–detachment process. Hg-3 cells were labeled with a cell tracker and allowed to adhere to a layer of HS-5 cells for 2 h. After the removal of the labeled non-adherent Hg-3 (green cells in Figure 1), an equal number of unlabeled Hg-3 cells (gray cells) was added and the percentages of labeled Hg-3 cells were analyzed in the adherent and non-adherent fractions (Figure 1D, left panel). Labeled Hg-3 cells were detected in both fractions, indicating that Hg-3 cells detach from HS-5 cells (Figure 1D, right panel). In addition, after 2 h of co-culture of Hg-3 cells with HS-5 cells, the non-adherent Hg-3 cells were transferred to a new feeder layer (referred to as primed Hg-3 cells) and allowed to adhere for a further 2 h. The ratio of the number of Hg-3 cells to HS-5 cells was compared in a co-culture of HS-5-primed Hg-3 cells versus non-primed cells and was found to be unchanged in both conditions, indicating that non-adherent cells still possess adhesive properties (Figure 1E).

Taken together, these results suggest that tumor B cell adhesion to HS-5 stromal culture is a dynamic process in which cells adhere and detach, probably in response to soluble factors but also to mechanical cues from the microenvironment that contribute to their survival.



**Figure 1.** Adhesion and survival analyses of CLL cells cultured with stromal HS-5 cells. **(A)** An analysis of cell viability based on AnnexinV/7-AAD labeling of primary CLL cells in the presence or not of HS-5 cells for up to 6 days at a ratio of 10:1, respectively. Viable cells are those of AnnexinV/7-AAD- (n = 6 for days 1 and 3; n = 4 for day 6). **(B)** Percentage of viable primary CLL cells (AnnexinV-/7-AAD-) cultured in the presence or not of HS-5 cells and comparison of survival in adherent versus non-adherent cells (n = 6) at day 6. The data represent the mean ± SEM. **(C)** Flow cytometry was used to assess the adhesion of primary CLL cells to stromal cells (HS-5) in a co-culture

system. CLL cells and HS-5 cells were co-cultured for 1, 3 and 6 days. After the removal of the non-adherent cells, the HS-5 and adherent CLL cells were collected via trypsinization. The percentage of CLL cells recovered in the stromal fraction relative to the total number of CLL cells is shown on the graph ( $n = 6$  for days 1 and 3;  $n = 4$  for day 6). (D) Cartoon depicting the strategy used to determine the dynamics of CLL cell adhesion to stromal cells. On the right, a representative cytometry plot shows the gating strategy and the analysis of the Cell Tracker-APC-positive Hg-3 cells in the adherent and non-adherent fractions. (E) Graph showing the difference in adhesion between Hg-3 cells (non-primed Hg-3) and those previously exposed to HS-5 cells for 2 h in co-culture (primed Hg-3). Data are expressed as the ratio of CD19-positive cells (Hg-3) to CD90-positive cells (HS-5) ( $n = 3$ ). Note: ns: not significant; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Student's *t*-test.

### 2.2. $\beta$ -Catenin Levels and Cellular Localization Differ between CLL Cells Adhering or Not to Stromal Cells

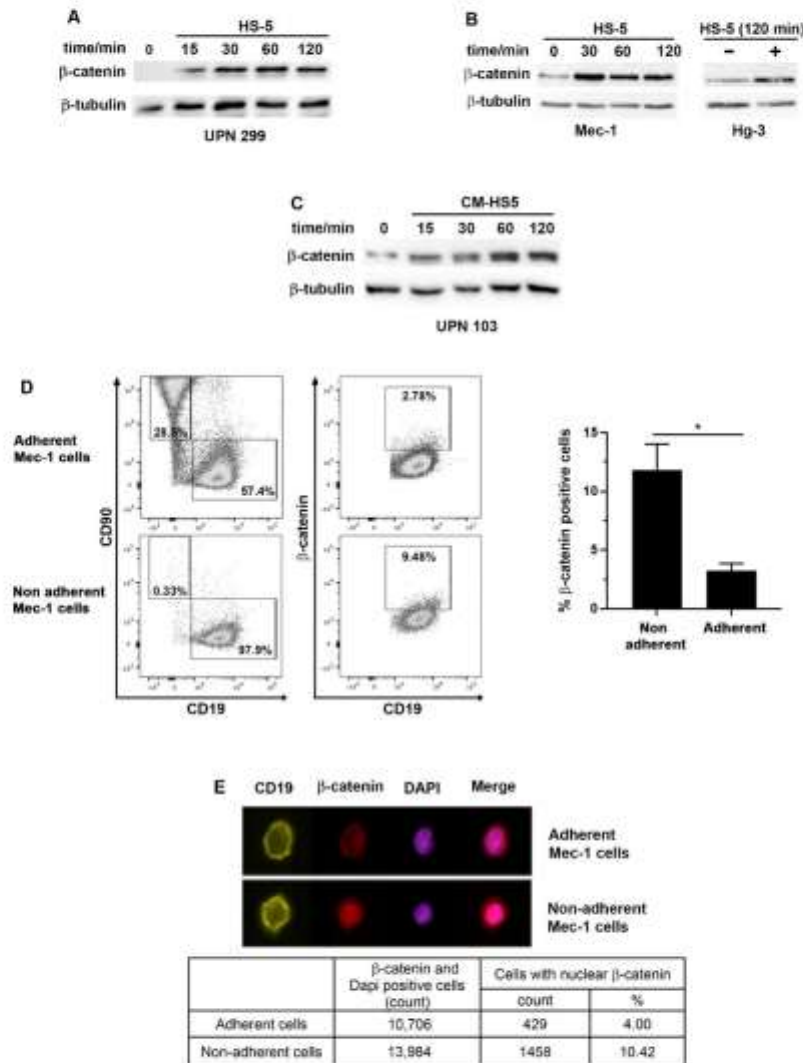
To investigate the link between adhesion and survival, we turned to  $\beta$ -catenin, a multifunctional protein involved in both the stabilization of adhesion complexes and the transcription of survival genes in several cell types.

An analysis of the dynamics of  $\beta$ -catenin in primary CLL cells not adherent to stromal cells was performed via Western blotting in co-cultures for different time periods. The level of  $\beta$ -catenin increased after 15 min of co-culture, reached maximum stability at 30 min and persisted for up to 2 h (Figure 2A). In addition to primary cells, we also observed  $\beta$ -catenin stabilization in the Hg-3 cells and Mec-1, another CLL cell line (Figure 2B). In order to confirm that the observed increase in  $\beta$ -catenin was only coming from B cells and not from contaminating stromal cells, we performed the kinetics with a conditioned medium (CM) issued from a 24 h culture of HS-5. We observed similar stabilization of  $\beta$ -catenin as in the presence of stromal cells (Figure 2C). These results indicate that soluble factors in the HS-5 supernatant triggered  $\beta$ -catenin stabilization in the CLL cells. Since  $\beta$ -catenin has different roles depending on its cellular localization, i.e., promoting adhesion when located at the plasma membrane or regulating transcription when in the nucleus, we determined whether  $\beta$ -catenin could play a role in regulating the balance between adherent and non-adherent cell behavior. We used flow cytometry to analyze the  $\beta$ -catenin levels in co-cultures distinguishing HS-5 and CLL cells labeled with anti-CD90 and -CD19 antibodies, respectively. Interestingly,  $\beta$ -catenin was detected at a lower percentage in adherent Mec-1 cells compared to Mec-1 cells that did not adhere to stromal cells (Figure 2D). These results were reproduced in Hg-3 cells (Supplementary Figure S2). In addition, an analysis of  $\beta$ -catenin localization via imaging cytometry in adherent versus non-adherent cells revealed that a higher percentage of cells with nuclear  $\beta$ -catenin was present in the non-adherent cell population (Figure 2E).

The different levels of  $\beta$ -catenin in the two cell pools suggest two different signaling situations. In adherent cells, as in the absence of Wnt or other stimulation, the cytosolic  $\beta$ -catenin is constantly degraded, leaving intact only the pool of  $\beta$ -catenin localized at the cell membrane; in non-adherent cells,  $\beta$ -catenin is stabilized, probably in response to a soluble ligand, and translocates into the nucleus to regulate transcription.

### 2.3. BTK and $\beta$ -Catenin Impact Cell Morphology in CLL Cells Co-Cultured with Stromal Cells

To test this hypothesis at a functional level, we first used confocal microscopy. CLL B cells in co-culture with HS-5 cells showed that adherent CLL cells form protrusions or ruffles to contact stromal cells, as evidenced by fluorescent phalloidin, which labels actin filaments, together with anti-CD20 to distinguish primary CLL from HS-5 cells (Figure 3A). Second, we analyzed via imaging cytometry cell doublets containing one Mec-1 cell in contact with one HS-5 cell and observed the localization of  $\beta$ -catenin at the contact surface between the two cell types. This polarized localization of  $\beta$ -catenin was observed despite the different levels of the protein in the two cell types (Figure 3B). These results were replicated in doublets containing Hg-3 and HS-5 cells in co-culture in the same conditions as for Mec-1 (Supplementary Figure S3A).



**Figure 2.** The levels of  $\beta$ -catenin expression and localization are different in adherent versus non-adherent CLL B cells. (A) A Western blot analysis of  $\beta$ -catenin from CLL B cells (UPN 299) co-cultured with the human stromal cell line HS-5 for different incubation times. Here,  $\beta$ -tubulin is used as a loading control. Images are representative of at least three independent experiments. (B) A Western blot analysis of  $\beta$ -catenin stabilization in Mec-1 and Hg-3 cells as described for primary cells. Only the 120 min time point is shown for Hg-3 cells. (C) A Western blot analysis of  $\beta$ -catenin from primary CLL cells (UPN 103) cultured in conditioned medium issued from a 24 h culture of HS-5. (D) Gating strategy used to detect  $\beta$ -catenin in co-cultures of Mec-1 cells (CD19<sup>+</sup>) and stromal cells (CD90<sup>+</sup>). Percentages of cells in each gate (rectangle) are indicated. The histogram on the right shows the statistical analysis of  $\beta$ -catenin-positive cells in adherent versus non-adherent cells performed on 3 independent experiments. Note: \*  $p < 0.05$ , Student's *t*-test. (E) Image and flow cytometric analyses of CLL cells in co-culture with HS-5 cells (Magnification 40 $\times$ ). After 2 h of co-culture, the non-adherent cells were removed and labeled separately from the adherent fraction obtained via trypsinization. The cells were labeled with CD19-PE to identify CLL cells. After fixation and permeabilization,  $\beta$ -catenin was labeled with an APC-conjugated antibody. The nuclei were labeled

with DAPI. CD19-positive cells were analyzed for the  $\beta$ -catenin signal and DAPI. The table shows the number of cells and the percentage of cells with overlapping  $\beta$ -catenin and DAPI signals for adherent and non-adherent cells.

The protein kinase BTK, which is a downstream effector of BCR activation and of several chemokines, affects cell adhesion, migration and membrane dynamics, inducing the formation of membrane ruffles in various cell types through the activation of Rac and Cdc42 [28].  $\beta$ -Catenin is known to regulate cell adhesion by bridging cadherins to the actin cytoskeleton but also localizes in the ruffles to regulate cell migration [20]. When we analyzed BTK and  $\beta$ -catenin in Mec-1 cells after two hours of co-culture, we observed that the adherent cells formed protrusions containing BTK and  $\beta$ -catenin, whereas the non-adherent cells maintained a more rounded shape (Figure 3C, left panel). This morphological phenotype was recapitulated by the shape factor that defines cell circularity, which was significantly lower in adherent cells compared to non-adherent cells with a rounder shape (Figure 3C, right panel).

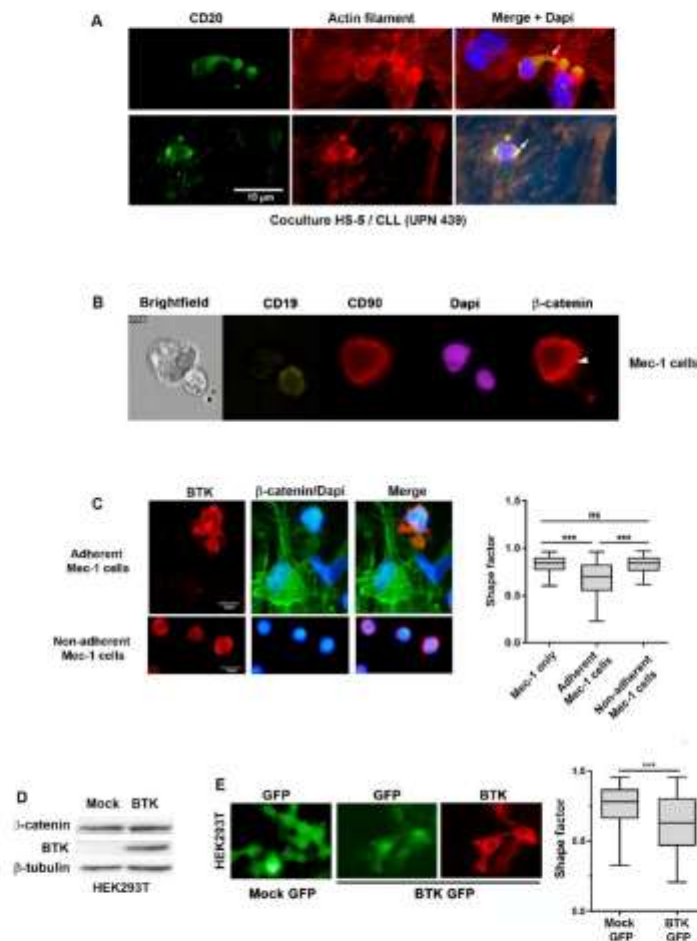
To explore a possible link between BTK and  $\beta$ -catenin in the regulation of the cell morphology, we transfected a plasmid carrying the sequence of the human BTK gene in HEK293T cells, which do not express BTK at detectable levels but do express endogenous  $\beta$ -catenin, as observed via Western blotting (Figure 3D). BTK was activated in these cells, as evidenced by the signal of the phosphorylated form at Y223 (Supplementary Figure S3B). Under basal conditions, BTK may not affect the stability of  $\beta$ -catenin, as its level did not change after BTK transfection in HEK293T cells (Figure 3D). To evaluate the impact of BTK on the cell morphology, a plasmid containing human BTK associated with an IRES-GFP cassette was used to select for transfected GFP-positive cells via immunofluorescence (Figure 3E, left panel). The GFP distribution was used to trace the cell contour and calculate the shape factor, which was significantly lower in BTK-transfected cells than in cells transfected with a GFP control plasmid (Figure 3E, right panel).

Overall, these data suggest a collaboration between BTK and  $\beta$ -catenin in shaping CLL cells in co-culture with stromal cells.

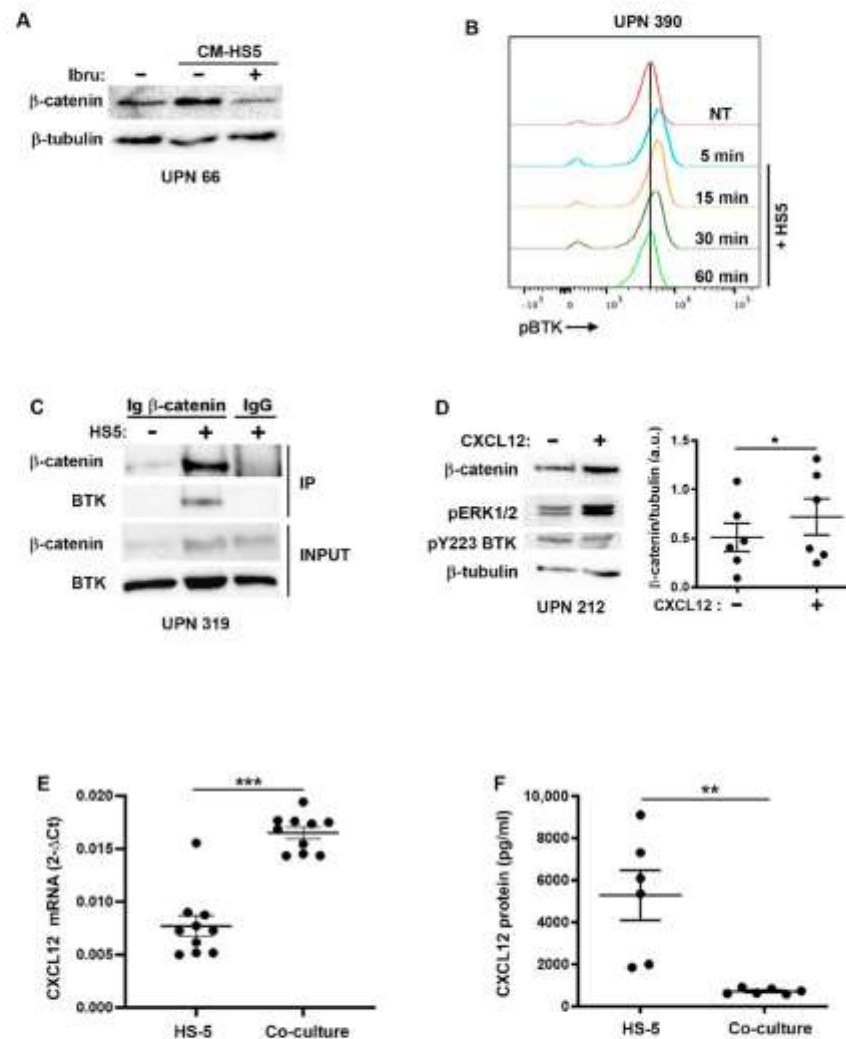
#### 2.4. $\beta$ -Catenin Stabilization Is Dependent on BTK

We have previously observed that in MCL, another lymphoproliferative disorder characterized by a strong dependence on the microenvironment, the stabilization of  $\beta$ -catenin upon BCR stimulation is associated with BTK activity [17]. Accordingly, the pretreatment of primary CLL B cells with ibrutinib, a potent inhibitor of BTK, prevented the stabilization of  $\beta$ -catenin, indicating that in the presence of stromal cells, BTK is involved in  $\beta$ -catenin stabilization (Figure 4A). However, when we examined the phosphorylation status of BTK (Y223) in CLL B cells at different incubation times with conditioned medium, we observed a slight increase in the pBTK MFI for some patients, although it did not reach significance for the entire cohort tested (Figure 4B and Supplementary Figure S4). The analysis of pBTK-positive cells showed that in the majority of samples tested, the percentage of pBTK-positive cells was already quite high and a further increase was not achievable (Supplementary Figure S4). In addition, the immunoprecipitation of  $\beta$ -catenin from the CLL cell extract after 1 h of co-culture with stromal cells showed that  $\beta$ -catenin and BTK belong to the same molecular complex. Interestingly, no signal for BTK was detected in the immune precipitate from CLL cells in the absence of stromal cells (Figure 4C). To further investigate which soluble factor might be involved in  $\beta$ -catenin stabilization in CLL cells, we incubated CLL cells with CXCL12, a cytokine secreted by stromal cells and known to signal via BTK [24,29]. Through Western blotting, we observed that recombinant CXCL12 increased the  $\beta$ -catenin levels after one hour of treatment together with pERK, while no significant increase in pBTK was observed at this time point (Figure 4D). Interestingly, we observed that the CXCL12 transcript was significantly induced in HS-5 cells by the co-culture with CLL cells (Figure 4E). However, when assayed using multiarray technology, CXCL12 is greatly reduced in the co-culture supernatant, likely because it is consumed by

CLL cells (Figure 4F). This result suggests that CLL cells educate stromal cells to produce CXCL12, which contributes to  $\beta$ -catenin stabilization in CLL cells via BTK.



**Figure 3.**  $\beta$ -Catenin and BTK cooperate to influence the CLL cell morphology in co-culture with stromal cells. (A) Immunofluorescence of co-culture of stromal cells (HS-5) and CLL cells labeled with an anti-CD20 antibody (green). Phalloidin labels the actin cytoskeleton (red). The white arrow in the merged image points to the protrusions formed by CLL cells in contact with stromal cells. The images are all issued from the same sample (UPN 439) but represent two different fields from the same coverslip. CLL cells from three different patients were analyzed in this experiment. (B) Image Stream analysis of doublets of Mec-1/HS-5 cells showing the localization of  $\beta$ -catenin (white arrow) in the two cell types. (C) Immunofluorescence images showing BTK and  $\beta$ -catenin in Mec-1 cells that adhere (top images) and do not adhere (bottom images) to stromal HS-5 cells. BTK and  $\beta$ -catenin are labeled by antibodies and are shown in red and green, respectively. The panel on the right shows the shape factor. An average of 200 cells were used to calculate and compare the shape factors between primary CLL cells cultured alone (Mec-1 only) and in the non-adherent and adherent fractions. (D) Immunoblotting of protein extracts from HEK293T cells transfected with a plasmid carrying the human BTK gene or with an empty plasmid, using anti-BTK and anti- $\beta$ -catenin antibodies.  $\beta$ -Tubulin was used as a loading control. (E) Microscopy images of HEK293T cells transfected with human BTK-IRES-GFP or a GFP-containing vector (mock) (Magnification 40 $\times$ ). A shape factor analysis compares the cell morphologies in these two conditions. Note: ns: not significant; \*\*\*  $p < 0.001$ , Student's  $t$ -test.



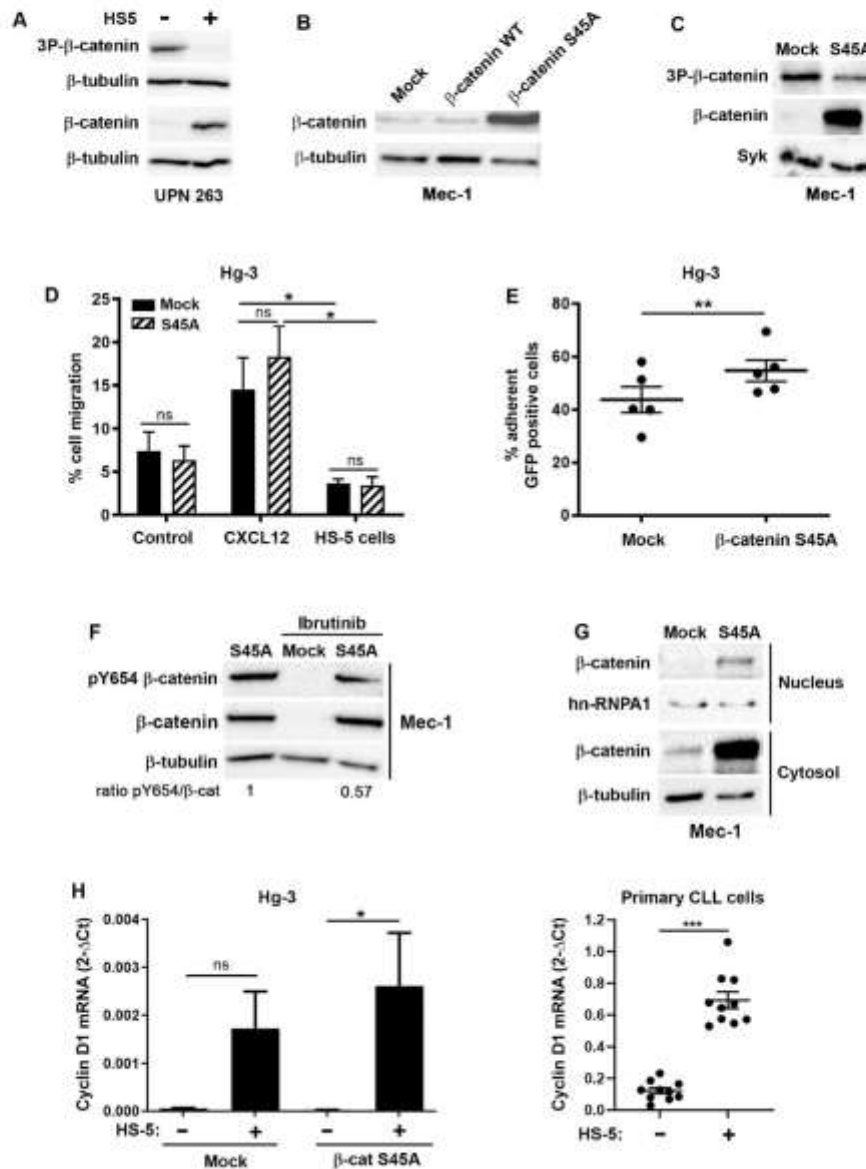
**Figure 4.** BTK is involved in  $\beta$ -catenin stabilization in CLL cells co-cultured with HS-5. (A) Primary CLL cells (UPN 66) were pretreated or not with ibrutinib (100 nM) for 1 h prior to incubation with conditioned medium issued from a 24 h culture of stromal cells. The  $\beta$ -catenin and  $\beta$ -tubulin were detected via Western blotting. (B) Histogram representing the analysis via phosphoflow of pBTK (pY223). (C) Co-immunoprecipitation of  $\beta$ -catenin and BTK from purified primary CLL B cells (UPN 319) co-cultured with or without HS-5 stromal cells for one hour. The input represents 10% of the total lysate and was set aside prior to immunoprecipitation. Mouse IgG was used as a negative control for the immunoprecipitation. (D) Representative immunoblot (UPN 212) and quantification of  $\beta$ -catenin levels after treatment with CXCL12 (100 ng/mL) for 1 h from purified primary CLL cells ( $n = 6$ ). The pERK1/2 was used as a positive control for the stimulation, pY223 BTK as an activated protein marker and  $\beta$ -tubulin as a loading control. (E) RT-qPCR to detect CXCL12 transcript in HS-5 after 24-h co-culture with primary CLL cells ( $n = 10$ ). GAPDH was used as a housekeeping gene in this experiment. (F) Multiarray technology was used to quantify CXCL12 in the supernatants of 24-h co-cultures of primary CLL cells and HS-5 cells ( $n = 6$ ). Note: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Student's *t*-test.

### 2.5. $\beta$ -Catenin Stabilization Induces Tumor Cell Adhesion to Stromal Cells

In the canonical Wnt signaling pathway,  $\beta$ -catenin stabilization is associated with a decrease in GSK-3 $\beta$ -dependent triple phosphorylation at the residues S33, S37 and T41. Accordingly, in our co-culture model, the increased stability of  $\beta$ -catenin observed in primary CLL cells in the presence of stromal cells corresponded to a decrease in the signal for its triple phosphorylation, once again confirming the activity of the proteasome in regulating  $\beta$ -catenin levels in CLL cells (Figure 5A). Furthermore, the overexpression of wild-type  $\beta$ -catenin did not lead to an increase in the recombinant protein, likely because it was subjected to the same post-translational regulation as the endogenous one and was constantly degraded (Figure 5B). To bypass this regulation, we constructed a mutant  $\beta$ -catenin (S45A) that could not be phosphorylated by either CKI or GSK-3 $\beta$ , and which after evading proteasomal degradation accumulated in cells, as shown in Mec-1 transfected with this mutant (Figure 5B,C). The involvement of CXCL12 in the stabilization of  $\beta$ -catenin led us to ask whether a higher level of  $\beta$ -catenin leads to increased migration towards this chemokine. The transfection of the stable form of  $\beta$ -catenin did not modify the migratory capacity towards CXCL12 nor stromal cells (Figure 5D). In these migration experiments, HS-5 cells were unable to induce cell migration, consistent with hMSCs having an inhibitory effect on B cell migration [30]. Overall, stabilized  $\beta$ -catenin did not confer a migratory phenotype to CLL cells. However, S45A- $\beta$ -catenin-transfected Hg-3 cells adhere more strongly to the stromal cells, as we recovered a higher proportion of S45A- $\beta$ -catenin-transfected cells when we collected HS-5 via trypsinization after removing the non-adherent cells (Figure 5E).

Since  $\beta$ -catenin's stability and cellular distribution are also regulated by other phosphorylation sites, we observed that the mutant S45A- $\beta$ -catenin was phosphorylated at Y654, which is known to weaken the interaction with cadherins and favor  $\beta$ -catenin's nuclear accumulation [31] (Figure 5F). Interestingly, the ibrutinib treatment decreased the signal for phospho-Y654, indicating that BTK was responsible for this phosphorylation, as previously suggested in other models [31].

The nuclear enrichment of  $\beta$ -catenin observed via imaging cytometry in non-adherent CLL cells (Figure 2E), supported by the phosphorylation of Y654 detected on S45A- $\beta$ -catenin (Figure 5F), prompted us to verify the localization of the S45A- $\beta$ -catenin mutant and its transcriptional activity. Indeed, cell fractionation coupled with Western blotting showed that S45A- $\beta$ -catenin is present both in the cytoplasm and the nucleus of transfected Mec-1 cells (Figure 5G). However, the transcription of Axin-2, a Wnt/ $\beta$ -catenin-regulated gene in most cell types, remained unchanged regardless of the presence of S45A- $\beta$ -catenin-transfected cells or the co-culture with HS-5 cells (Supplementary Figure S5A). The lack of induction of Axin-2 was recapitulated in primary B cells, although the co-culture with stromal cells tended to reduce the transcription of this gene (Supplementary Figure S5B). We tested the transcriptional induction of other genes, such as cyclin D1 and c-Myc, Dll 1 and Hes 1, known to be regulated by transcription factors that are partners of  $\beta$ -catenin, such as TCF, Notch and NF- $\kappa$ B. Of all the genes tested, only cyclin D1 was induced by S45A- $\beta$ -catenin but only in the presence of stromal cells (Figure 5H, left panel; Supplementary Figure S5C). This induction was also observed in primary cells in overnight co-cultures with HS-5 (Figure 5H, right panel). This result implies that in non-adherent CLL cells,  $\beta$ -catenin might possess transcriptional activity to induce cell-cycle-regulatory genes and that this activity is regulated by the microenvironment.



**Figure 5.** Functional involvement of  $\beta$ -catenin in CLL cells. **(A)** A Western blot analysis of the phosphorylation status of  $\beta$ -catenin after co-culture or not with HS-5 stromal cells for 1 h. Whole-cell lysates of primary purified CLL cells (UPN 263) were probed with the antibodies directed against the triple phosphorylation sites S33, S37 and T41 (3P- $\beta$ -catenin); total  $\beta$ -catenin; or  $\beta$ -tubulin. The cell lysates were loaded onto two different membranes probed with anti-3P- $\beta$ -catenin and total  $\beta$ -catenin, respectively. The loading controls ( $\beta$ -tubulin) of the two membranes are shown. **(B)** A Western blot analysis of the whole-cell lysates of Mec-1 cells transfected with an empty plasmid (mock) or a plasmid carrying the wild-type human  $\beta$ -catenin gene or the mutant form (S45A). **(C)** A Western blot analysis of the whole-cell extracts of Mec-1 cells transfected with an empty plasmid (mock) or a plasmid carrying the mutated form of  $\beta$ -catenin (S45A). The immunoblot was probed with anti- $\beta$ -catenin or 3P- $\beta$ -catenin antibodies; Syk was used as a loading control. **(D)** Migration

experiments performed in a transwell (8  $\mu\text{m}$  diameter pores) with Hg-3 cells transfected with an empty plasmid (mock) or the S45A- $\beta$ -catenin. Transfected Hg-3 cells were seeded on the upper chamber and allowed to migrate for 4 h towards the lower chamber containing RPMI, CXCL12 or HS-5 cells. The graph shows the percentage of migrated cells over the total number of seeded cells from 3 independent experiments. (E) Graph of the flow cytometry data used to calculate the percentage of S45A- $\beta$ -catenin versus empty plasmid (mock) transfected Hg-3 cells adhering to HS-5 after 1 h of co-culture. GFP was used to count transfected Hg-3 cells as described in the Section 4 ( $n = 5$ ). (F) An analysis of the phosphorylation of  $\beta$ -catenin at Y654 in Mec-1 cells transfected with the S45A mutant or an empty plasmid (mock). Where indicated, the cells were pretreated or not with ibrutinib (100 nM) for 1 h. The Western blot is representative of 3 independent experiments. (G) A cell fractionation protocol followed by immunoblotting was used to detect  $\beta$ -catenin with specific antibodies in the cytosol and nucleus of Hg-3 cells transfected with the plasmid carrying S45A- $\beta$ -catenin or an empty plasmid (mock).  $\beta$ -Tubulin and hnRNP A1 were used as loading controls for the cytosolic and nuclear fractions, respectively. (H) RT-qPCR for cyclin D1 performed on Hg-3 (left panel) and primary CLL cells (right panel). Hg-3 cells were transfected with an empty plasmid (mock) or with S45A- $\beta$ -catenin and cultured in the presence or absence of HS-5 cells for 4 h. The graphs represent the average data from 3 independent experiments. Primary CLL cells were cultured with HS-5 cells for 24 h before the RNA extraction ( $n = 10$ ). Delta Ct values are calculated as subtractions of cyclin D1  $C_t$  and of the housekeeping gene,  $\beta 2$  microglobulin. Note: ns: not significant, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Student's  $t$ -test.

### 3. Discussion

$\beta$ -Catenin is at the core of the canonical Wnt signaling pathway, where it translocates into the nucleus to participate in the transcription of survival genes, including Axin2 and cyclin D1 [8]. In addition,  $\beta$ -catenin also has an important structural role in the cell membrane to stabilize cell–cell contacts in cooperation with cadherins. There is no consensus on the interplay between the two pools of cellular  $\beta$ -catenin and the regulation of the two functions [19]. In some cases, the membrane  $\beta$ -catenin appears to reduce the amount of  $\beta$ -catenin available for the translocation into the nucleus, and in others the two pools do not appear to compete [20,32]. In CLL cells, the Wnt signaling pathway has received much attention because Wnt ligands are present in the microenvironment and are also secreted by CLL cells [33]. Furthermore, mutations in Wnt signaling effectors increase cell survival and resistance to apoptosis in CLL cells [6].

In this study, we focused our attention on the role of  $\beta$ -catenin in regulating adhesion and the relationship that may occur between adhesion and survival. When co-cultured with bone marrow stromal cells (HS-5) to mimic the microenvironment, CLL cells divide into two fractions: one pool of cells adheres to the stromal component and one pool remains in suspension. These two pools are dynamic, as the cells in suspension retain their ability to adhere when transferred to a new feeder layer of stromal cells. In turn, the adhesion is not permanent and adherent cells detach from the stromal cells. In non-adherent cells,  $\beta$ -catenin is rapidly stabilized by soluble factors and translocates to the nucleus to induce the transcription of cyclin D1, a target gene of the Wnt, NF- $\kappa$ B or STAT3 signaling pathways [34]. This increase in cyclin D1 via co-culture and  $\beta$ -catenin stabilization contributes to the enhanced survival of CLL cells in the presence of stromal cells. The amount of total  $\beta$ -catenin in the adherent CLL cells is low, suggesting that in adherent CLL cells,  $\beta$ -catenin is degraded in the destruction complex, as it occurs in the absence of Wnt or other stabilizing stimuli. In adherent CLL cells to the stromal cells,  $\beta$ -catenin rather contributes to stromal cell adhesion, as the overexpression of  $\beta$ -catenin increases the proportion of CLL cells that are recovered with the stromal component. In addition,  $\beta$ -catenin localizes in the cell membrane with polarization towards the contact zone with stromal cells. In addition, these CLL cells show ruffles as a sign of the reorganization of adhesion structures. Various observations implicate B cell signaling pathways in the functional distribution of  $\beta$ -catenin. First,  $\beta$ -catenin interacts with BTK in CLL cells in the presence of stromal cells. Second, our group has previously published the interaction

between Vav1, a GTPase exchange factor (GEF) for the Rho family of GTPases expressed in hematopoietic cells, and  $\beta$ -catenin to affect its phosphorylation status, cellular distribution and cell morphology in a manner similar to that reported for BTK in this work [35]. Third,  $\beta$ -catenin interacts with Syk, which is responsible for its phosphorylation at Y142 and Y654, as we also observed for BTK in our model [36]. All of these elements come together into a model in which the B cell signaling complexes, regulated either by chemokines or stromal factors, affect the  $\beta$ -catenin dynamics, which ultimately tunes the balance between adhesion and transcriptional activities in these cells. The presence of a soluble factor such as CXCL12, which binds to its cognate receptor CXCR4 and activates BTK, leads to an increase in  $\beta$ -catenin, inducing its transcriptional activity but also its localization in the cell membrane. Interestingly, CXCL12 transcription is induced in stromal cells via a co-culture with tumor cells as part of the dialogue that exists between the two cell types. The influence on stromal cells by tumor cells allows the secretion of molecules such as CXCL12, which in turn signals to the tumor cells to increase their migration and adhesion through  $\beta$ -catenin and other adhesion molecules such as integrin, as previously described [24]. Membrane  $\beta$ -catenin favors the interaction of CLL cells with stromal cells, most likely through the interaction with cadherins, which have been reported to be enhanced via co-culture with stromal cells [22]. Using flow cytometry, we were unable to distinguish two distinct populations based on their  $\beta$ -catenin contents. Rather, the distribution of  $\beta$ -catenin labeling seems to indicate variable amounts in CLL cells. Thus, it is tempting to suggest that the adhesion of CLL cells to the stroma is a transient behavior linked to the fluctuations of  $\beta$ -catenin and other proteins and dictated by the stimuli that the cells receive from the microenvironment. The increase in  $\beta$ -catenin is important for cell adhesion to the stromal component, as ibrutinib treatment, which is opposed to  $\beta$ -catenin stabilization, is known to disrupt CLL cell adhesion to the cells of the microenvironment [37]. It is interesting to underline that ibrutinib does not affect the membrane expression of the integrin VLA-4 involved in CLL cell adhesion and regulated by BCR signaling [38]. Once the CLL cells adhere to the stromal component, the destruction complex could be reactivated by a negative feedback driven by mechanotransduction, leading to a decrease in cytosolic  $\beta$ -catenin but leaving intact the membrane pool. Other changes must occur to trigger the release of the CLL cells from the stromal cells. The phosphorylation of  $\beta$ -catenin in tyrosine 654 decreases its affinity for cadherins, thereby enhancing its transcriptional activity but potentially reducing its adhesion capacity by removing  $\beta$ -catenin from the membrane. BTK is responsible for Y654 phosphorylation in our model, thereby making this kinase an element that might tune the amount, localization and functions of  $\beta$ -catenin.

This work defines a new axis comprising BTK and  $\beta$ -catenin, which partakes in the cross-talk between tumor cells and the microenvironment and that can be targeted by ibrutinib. In addition,  $\beta$ -catenin is an important effector with functions in cell adhesion and transcription that intervenes in the balance between adhesion and signal transduction in response to soluble factors and mechanical cues. It is important to enrich the model of communication of CLL cells with their microenvironment because although therapeutic strategies targeting this communication are successful, resistance to treatment can develop. Therefore, finding a target to bypass this resistance will allow the effective control of a disease that is still incurable.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Cell Cultures

The primary CLL B cells were collected from patients after receiving informed consent during routine workup at the Avicenne Hospital (APHP, Bobigny, France). All patients gave written consent, validated by the Ethics Committee of the Avicenne Hospital in accordance with the Declaration of Helsinki. The information on the patient samples used in this manuscript is summarized in Supplementary Table S1. The primary CLL B cells were isolated from fresh blood samples using the Pan B Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Teterow, Germany) according to the manufacturer's instructions. The isolated B

cells were maintained in RPMI medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), penicillin/streptomycin and glutamine and, cultured at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> or stored frozen in liquid nitrogen in a medium consisting of 10% DMSO in FCS.

The Mec-1 and Hg-3 cells were purchased from DSMZ (Berlin, Germany), and these cell lines were cultured as described for the primary tumor B cells. The HEK293T cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, penicillin/streptomycin and glutamine and maintained at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

For the co-culture experiments, the ratio of HS-5 to B cells was 1:5 unless otherwise indicated. The stromal cells were plated 24 h prior to the co-culture. The ibrutinib (Selleck Chem, Cologne, Germany) was used at 100 nM. The primary CLL cells were pretreated with ibrutinib for one hour prior to the co-culture or resuspension in conditioned medium. The conditioned medium was obtained from a confluent plate of HS-5 cells that were plated 24 h before the experiment.

#### 4.2. Western Blotting, Cell Fractionation and Immunoprecipitation

For the Western blots, the cells were lysed in a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5 mM EDTA and 10% glycerol, supplemented with protease and phosphatase inhibitors (leupeptin, pepstatin, aprotinin, PMSF, NaF, sodium orthovanadate). The cell lysates were sonicated with 5 cycles of 30 sec on and off with high-amplitude pulses. After clarification by centrifugation, the protein extracts were assayed using the Bicinchoninic Acid Assay (BCA) (Pierce, Waltham, WA, USA) according to the manufacturer's instructions. Here, 30 µg of total proteins was added of Laemmli buffer and boiled before loading onto SDS-PAGE gels. After the protein transfer, the membranes were blocked with 5% skimmed milk or BSA in TBS 0.1% Tween-20 prior to overnight incubation with primary antibodies in 2.5% skimmed milk or BSA in TBST at 4 °C. The following antibodies were used in all experiments: mouse monoclonal anti β-catenin (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) (Clone 14/Beta-catenin, cat# 610153), dilution 1/2000; mouse monoclonal anti-β-tubulin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Clone DM1A; cat#F2168), dilution 1/4000; rabbit anti-pS33, S37 and T41 β-catenin (Cell Signaling Technology, Saint Cyr l'Ecole, France; cat#9561), dilution 1/1000; rabbit anti-pY654 β-catenin (ECM Biosciences, Aurora, CO, USA), cat#4021, dilution 1/500; anti-BTK (Cell Signaling Technology; clone D3H5, cat#8547), dilution 1/1000; and anti-(pY223)phospho-BTK (Cell Signaling Technology, cat #5082), dilution 1/500. Incubation with the secondary antibodies, HRP-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulins (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France; cat#0300-0108 and STAR124P), was performed at room temperature for 45 min in 2.5% skimmed milk or BSA in TBST. The chemiluminescence signal was detected using the Clarity ECL Western blot substrate (Bio-Rad) and images of the membrane were captured using a Gel-Doc EZ imaging system and ChemiDoc (Bio-Rad). The images were analyzed with the software ImageLab v.6.1 (Bio-Rad).

The cell fractionation was performed using the Subcellular Cell Fractionation Kit (Pierce) according to the manufacturer's instructions, starting from  $10 \times 10^6$  of primary purified CLL B cells or  $2.5 \times 10^6$  Mec-1 cells. The total proteins of each fraction (cytoplasmic and nuclear) were extracted and the protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Pierce).

Twenty million cells were used for each immunoprecipitation (IP) experiment. For each IP, 1 mg of total protein extract was used. Here, 2 µg of the antibody was preincubated with magnetic beads, namely Dynabeads protein A (Life Technologies, Saint-Aubin, France), for 4 h in a wash buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 5 mM EDTA, 10% glycerol and 5% BSA. The lysates were incubated with the beads and an antibody overnight at 4 °C on a rotating wheel. After five washes, the beads were resuspended in Laemmli buffer prior to migration on 8% acrylamide gel for SDS-PAGE. The antibody against BTK used for immunoprecipitation was the same as that used for the Western blotting and the negative control was rabbit isotype IgG (2 µg; Diagenode, Liège, Belgium).

#### 4.3. Confocal and Fluorescence Microscopy

Cells grown on glass coverslips precoated with poly-D-lysine (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) were fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) and 4% sucrose (Sigma) for 20 min followed by 10 min of quenching with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl (Sigma) and 5 min of permeabilization with 0.2% Triton X-100 (Sigma) at RT. Non-specific binding sites were blocked with 1% gelatin (Sigma) for 1 h. The cells were incubated for 1 h in a humidified chamber with primary antibodies diluted in the permeabilization buffer as follows: mouse anti- $\beta$ -catenin (BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France; 1:50 dilution); rabbit anti-BTK (Cell Signaling Technology; 1:100 dilution). After performing gelatin rinses, the following secondary antibodies were applied for 45 min: anti-rabbit or anti-mouse Alexa Fluor 488; anti-rabbit or anti-mouse Alexa Fluor 647 (all from Life technologies, Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France; dilution 1:300). The cell nuclei and actin filaments were stained with DAPI and Alexa Fluor 546 phalloidin (Invitrogen, Thermo Fisher, Villebon sur Yvette, France) 0.3  $\mu$ M and 45 min, respectively. To prevent any antibody leakage, an additional post-fixation step was performed with 2% paraformaldehyde and 2% sucrose for 10 min followed by a quenching step with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl for 5 min. The coverslips were mounted using Prolong<sup>TM</sup> glass antifade mountant (Molecular probes—Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA, USA).

The 3D imaging was performed using a Zeiss LSM 780 confocal microscope system equipped with a Plan-Apochromat 63 $\times$ /1.40 Oil DIC M27 objective (Zeiss, Rueil Malmaison, France). Fluorescence images were also acquired using a Zeiss Axio Observer D1 inverted-phase contrast fluorescence microscope using an EC Plan-Neofluar 100 $\times$ /1.3 oil DIC objective (all from Zeiss). The shape factor was calculated using the plug-in available for ImageJ software v1.53. Over 200 cells were analyzed to perform the statistical analysis.

#### 4.4. Flow Cytometry and ImageStream

For the analysis of the cell viability, a combination of anti-CD19 BV786 (clone SJ25C1, BD Biosciences) and anti-CD90 BUV496 (clone 5E10, BD Biosciences) was resuspended in Brilliant Blue staining buffer and added to the 50,000 cells. After 20 min of incubation at 4 °C in the dark, a washing step was performed using a binding buffer solution. The pellet was resuspended in the binding buffer solution and Annexin-V APC and 7-AAD (BD Biosciences) were added according to manufacturer's instructions. After 15 min of incubation at room temperature in the dark, a washing step was performed using the binding buffer solution. The cells were analyzed with BDFACS Symphony A3.

For the flow cytometry experiments, the CLL B cells were labeled with anti-CD19-PE (clone HIB19, BD Biosciences) and HS-5 with anti-CD90-PE-Cy5 (clone 5E10, BD Biosciences). For the intracellular labeling of  $\beta$ -catenin, the Cytotfix/Cytoperm Kit was used according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences). After fixation for 20 min, the cells were washed with the permeabilization solution and incubated with anti- $\beta$ -catenin conjugated to Alexa488 or anti- $\beta$ -catenin APC conjugated (clone 14, cat#562505, BD Biosciences) for 1 h before acquisition on a Canto II cytometer (BD Biosciences). A control with extracellular labeling only was used as the FMO (fluorescence minus one) to determine the positivity of the intracellular staining. For the labeling of pBTK, Alexa488 anti-pBTK (Y223) (BD Biosciences, cat#564846) was used after fixation in paraformaldehyde 2% in PBS at RT for 20 min, followed by permeabilization with a buffer containing 0.5% saponin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1% bovine serum albumin in PBS 1 $\times$  for 30 min at RT. The cells were incubated with pBTK for 1 h at 4 °C.

For the analysis on the ImageStream system (MKII-Luminex, Merck, Darmstadt, Germany), the protocol was the same as for the intracellular staining, except that the DAPI (dilution 1/10,000) was added 5 min before acquisition. A statistical analysis was performed using the predefined nuclear translocation template from IDEAS software v.6.0 after the establishment of a compensation matrix.

#### 4.5. Cell Transfection and Cell Adhesion Assay

HEK293T cells were plated the day before transfection to reach 70% confluence on the day of transfection. Trans-IT (Euromedex, Souffelweyersheim, France) was used to transfect the HEK293T cells with 2.5 µg of DNA with the plasmid SFVL containing the coding region of human BTK, which was a gift from Prof. S. Stilgenbauer (University of Ulm, Ulm, Germany).

The plasmid pcDNA3.1 containing the wild-type β-catenin coding region was a gift from Dr. E. Fearon (Addgene, Watertown, MA, USA; cat#16828). The S45A mutant was generated via site-directed mutagenesis. A total of  $7.5 \times 10^6$  Hg-3 cells were co-transfected with either 10 µg of pcDNA-S45Aβ-catenin or the control plasmid and 1 µg of pmax GFP supplied with the Amaxa kit using the Amaxa B cell line Nucleofector Kit V according to the manufacturer's instructions with the U-14 program (Amaxa Lonza, Cologne, Germany). Twenty-four hours after nucleofection,  $5 \times 10^6$  Hg-3 cells were co-cultured for 2 h with  $1 \times 10^6$  of HS-5 cells, which were preseeded 24 h prior to the co-culture in 6-well plates. The non-adherent Hg-3 cells were removed and the adherent Hg-3 and HS-5 cells were carefully washed four times with DPBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA, USA). The HS-5 and adherent Hg-3 cells were trypsinized and analyzed via flow cytometry. The HS-5 cells were labeled with anti-CD90-PE antibody, whereas the Hg-3 cells were labeled with anti-CD19-PE-Cy7 antibody. The proportions of transfected and adherent Hg-3 to HS-5 cells were determined by selecting CD19<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cells.

For the adhesion–detachment experiments,  $7.5 \times 10^5$  HS-5 cells were plated in a 6-well plate 24 h before the adhesion experiment. Hg-3 cells were labeled with Deep Red Dye solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA, USA) and added to the HS-5 feeder layer at a HS-5/Hg-3 ratio of 1:5. The cells were allowed to adhere for 2 h prior to the removal of the non-adherent cells. The same number of unlabeled Hg-3 cells were added to the same feeder layer and allowed to adhere for a further 2 h before counting the labeled and unlabeled Hg-3 cells in the adherent and non-adherent fractions via flow cytometry. Anti-CD90 PE and anti-CD19 APC-Cy7 antibodies were used to label the HS-5 cells and Hg-3, respectively.

#### 4.6. Cell Migration Assay

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

#### 4.7. Quantification of Cytokine Secretion

CXCL12 was quantified in the supernatants of HS-5 cells when cultured alone or co-cultured with CLL B cells for 24 h using U-Plex assays (MSD, Rockville, MD, USA) according to the manufacturer's protocol.

#### 4.8. RT-qPCR

The total RNA was purified using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Les Ulis, France) and at least 500 ng of total RNA was retro-transcribed using iSCRIPT (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. The amplicons were amplified and quantified using SYBR Green with the following primer sets: β-catenin forward 5'-CGTGACATCAGGATACCCA-3' and reverse 5'-ATTTCTTCCATGCGGACCCC-3'; c-myc forward 5'-CTCCGTCCTCGG ATTCTCTG-3' and reverse 5'-CTGTTCCTCCTCAGAGTCGC-3'; Dll1 forward 5'-AGAAG

GATGAGTGCAT-3' and reverse 5'-TTTAAGAGAAACGGGAGTCTTG-3'; -Hes1 forward 5'-GAAGAAAGATAGCTCGCGG-3' and reverse 5'-TTCCGGAGGTGCTTAC-3'; cyclin D1 forward 5'-ACCTGGATGCTGGAGGTCT-3' and reverse 5'-GCTCTTTTTCACGGGCTCCA-3';  $\beta$ -2microglobulin used as housekeeping gene forward 5'-CTCCGTGGCCTTAGCTGTG-3' and reverse 5'-TTTGGAGTACGCTGGATAGCCT-3'; Axin-2 forward 5'-GGACAGGAATCATTGCGCCA-3' and Axin-2 reverse 5'-ACCTGCCAGTTTCTTTGGCT-3'.

The qPCR was performed on a StepOnePlus™ system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA, USA) and the data were analyzed using StepOne software v.2.3 and GraphPad 6.0c for the statistics.

The expression of CXCL12 and cyclin D1 was analyzed using TaqMan Gene Expression Assay probes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA, USA) (CXCL12 probe Hs03676656\_mH; cyclin D1 probe Hs00765553\_m1) on a 7500 Real-Time PCR system (Life Technologies, Saint-Aubin, France). The target gene expression was normalized to the mean Ct values of the housekeeping gene GAPDH (Hs02786624\_g1). The normalized ratio is expressed as  $2^{-\Delta Ct}$ . All tests were performed in duplicate.

**Supplementary Materials:** The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms242417623/s1>.

**Author Contributions:** L.G. and D.L. designed the experiments, supervised the project and wrote the manuscript. I.M., T.R. and S.O. performed the experiments. A.O., G.L. and J.F. generated the RT-QPCR data. A.O. performed the site-directed mutagenesis of the  $\beta$ -catenin gene. L.A. performed the cytometry experiments and analysis. E.D. assisted in the immunofluorescence experiments. V.G. and E.D. performed and assisted with the Amnis ImageStream experiments and analysis. N.V.-B. and C.L.R. contributed to the project design and edited the manuscript. F.B.-M., G.L., F.C. and V.L. provided CLL patient samples and their clinical–biological data. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This project was supported by Labex Inflammex, ANR11 IDEX 00502 and Transcan H2020 Fire CLL. I.M. and S.O. received fellowships from the University Paris 13.

**Informed Consent Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Avicenne Hospital (protocol code DC-2020-4057, 31 July 2020).

**Data Availability Statement:** All data generated and analyzed in this work are available from the corresponding authors upon request.

**Acknowledgments:** We thank Eric R. Fearon for the plasmid pcDNA3.1 containing the human  $\beta$ -catenin gene.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Millán-Salanova, M.; Vicente-Manzanares, M. The interface between biochemical signaling and cell mechanics shapes T lymphocyte migration and activation. *Eur. J. Cell Biol.* **2022**, *101*, 151236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mangolini, M.; Ringshausen, I. Bone Marrow Stromal Cells Drive Key Hallmarks of B Cell Malignancies. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Bernard, S.; Danglade, D.; Gardano, L.; Laguillier, C.; Lazarian, G.; Roger, C.; Thieblemont, C.; Marzec, J.; Gribben, J.; Cymbalista, F.; et al. Inhibitors of BCR signalling interrupt the survival signal mediated by the micro-environment in mantle cell lymphoma. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, 2761–2774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kipps, T.J.; Stevenson, F.K.; Wu, C.J.; Croce, C.M.; Packham, G.; Wierda, W.G.; O'Brien, S.; Gribben, J.; Rai, K. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2017**, *3*, 16096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Janovská, P.; Bryja, V. Wnt signalling pathways in chronic lymphocytic leukaemia and B-cell lymphomas. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 4701–4715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Wang, L.; Shalek, A.K.; Lawrence, M.; Ding, R.; Gaublot, J.T.; Pochet, N.; Stojanov, P.; Sougnez, C.; Shukla, S.A.; Stevenson, K.E.; et al. Somatic mutation as a mechanism of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation in CLL. *Blood* **2014**, *124*, 1089–1098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Wang, L.; Lawrence, M.S.; Wan, Y.; Stojanov, P.; Sougnez, C.; Stevenson, K.; Werner, L.; Sivachenko, A.; DeLuca, D.S.; Zhang, L.; et al. *SF3B1* and Other Novel Cancer Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 2497–2506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Clevers, H.; Nusse, R. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Disease. *Cell* **2012**, *149*, 1192–1205. [[CrossRef](#)]
9. Amin, N. The Wnt signaling pathways and cell adhesion. *Front. Biosci.* **2012**, *17*, 784. [[CrossRef](#)]
10. Kaucká, M.; Plevová, K.; Pavlová, S.; Janovská, P.; Mishra, A.; Verner, J.; Procházková, J.; Krejčí, P.; Kotašková, J.; Ovesná, P.; et al. The Planar Cell Polarity Pathway Drives Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia by the Regulation of B-Lymphocyte Migration. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1491–1501. [[CrossRef](#)]
11. Yu, J.; Chen, L.; Cui, B.; Widhopf, G.F.; Shen, Z.; Wu, R.; Zhang, L.; Zhang, S.; Briggs, S.P.; Kipps, T.J. Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *J. Clin. Investig.* **2015**, *126*, 585–598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hasan, M.K.; Yu, J.; Chen, L.; Cui, B.; Ii, G.F.W.; Rassenti, L.; Shen, Z.; Briggs, S.P.; Kipps, T.J. Wnt5a induces ROR1 to complex with HSI to enhance migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **2017**, *31*, 2615–2622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hasan, M.K.; Rassenti, L.; Widhopf, G.F.; Yu, J.; Kipps, T.J. Wnt5a causes ROR1 to complex and activate cortactin to enhance migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **2019**, *33*, 653–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nusse, R.; Clevers, H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* **2017**, *169*, 985–999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Aberle, H.; Bauer, A.; Stappert, J.; Kispert, A.; Kemler, R.  $\beta$ -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. *EMBO J.* **1997**, *16*, 3797–3804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Fagotto, F. Looking beyond the Wnt pathway for the deep nature of  $\beta$ -catenin. *EMBO Rep.* **2013**, *14*, 422–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lazarian, G.; Friedrich, C.; Quinquenel, A.; Iran, J.; Ouriemmi, S.; Dondi, E.; Martin, A.; Mihoub, I.; Chiron, D.; Bellanger, C.; et al. Stabilization of  $\beta$ -catenin upon B-cell receptor signaling promotes NF- $\kappa$ B target genes transcription in mantle cell lymphoma. *Oncogene* **2020**, *39*, 2934–2947. [[CrossRef](#)]
18. Peifer, M. The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J. Cell Biol.* **1992**, *118*, 681–691. [[CrossRef](#)]
19. McCrea, P.D.; Maher, M.T.; Gottardi, C.J. Nuclear Signaling from Cadherin Adhesion Complexes. In *Current Topics in Developmental Biology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; Volume 112, pp. 129–196.
20. Daugherty, R.L.; Gottardi, C.J. Phospho-regulation of  $\beta$ -Catenin Adhesion and Signaling Functions. *Physiology* **2007**, *22*, 303–309. [[CrossRef](#)]
21. Ferreira, A.C.; Suriano, G.; Mendes, N.; Gomes, B.; Wen, X.; Carneiro, F.; Seruca, R.; Machado, J.C. E-cadherin impairment increases cell survival through Notch-dependent upregulation of Bcl-2. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 334–343. [[CrossRef](#)]
22. Mangolini, M.; Gotte, F.; Moore, A.; Ammon, T.; Oeslner, M.; Lutzy-Geier, G.; Klein-Hitpass, L.; Williams, J.C.; Lehner, P.J.; During, J.; et al. Notch2 controls non-autonomous Wnt-signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dadashian, E.L.; McAuley, E.M.; Liu, D.; Shaffer, A.L.; Young, R.M.; Iyer, J.R.; Kruhlak, M.J.; Staudt, L.M.; Wiestner, A.; Herman, S.E.M. TLR Signaling Is Activated in Lymph Node-Resident CLL Cells and Is Only Partially Inhibited by Ibrutinib. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 360–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Montresor, A.; Toffali, L.; Rigo, A.; Ferrarini, I.; Vinante, F.; Laudanna, C. CXCR4- and BCR-triggered integrin activation in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells depends on JAK2-activated Bruton's tyrosine kinase. *Oncotarget* **2018**, *9*, 35123–35140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wahl, M.I.; Fluckiger, A.C.; Kato, R.M.; Witte, O.N.; Rawlings, D.J. Phosphorylation of two regulatory tyrosine residues in the activation of Bruton's tyrosine kinase via alternative receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 11526–11533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Middendorp, S.; Dingjan, G.M.; Maas, A.; Dahlenborg, K.; Hendriks, R.W. Function of Bruton's Tyrosine Kinase during B Cell Development Is Partially Independent of Its Catalytic Activity. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 5988–5996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Adamo, A.; Delfino, P.; Gatti, A.; Bonato, A.; Kamga, P.T.; Bazzoni, R.; Ugel, S.; Mercuri, A.; Caligola, S.; Krampera, M. HS-5 and HS-27A Stromal Cell Lines to Study Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Support to Cancer Development. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 584232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Nore, B.F.; Vargas, L.; Mohamed, A.J.; Branden, L.J.; Backesjo, C.-M.; Islam, T.C.; Mattsson, P.T.; Hultenbu, K.; Christensson, B.; Smith, C.I.E. Redistribution of Bruton's tyrosine kinase by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho-family GTPases. *Eur. J. Immunol.* **2000**, *30*, 145–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. De Gorter, D.J.J.; Beuling, E.A.; Kersseboom, R.; Middendorp, S.; van Gils, J.M.; Hendriks, R.W.; Pals, S.T.; Spaargaren, M. Bruton's Tyrosine Kinase and Phospholipase  $\text{C}\gamma 2$  Mediate Chemokine-Controlled B Cell Migration and Homing. *Immunity* **2007**, *26*, 93–104. [[CrossRef](#)]
30. Corcione, A.; Benvenuto, F.; Ferretti, E.; Giunti, D.; Cappiello, V.; Cazzanti, F.; Risso, M.; Gualandi, F.; Mancardi, G.L.; Pistoia, V.; et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **2006**, *107*, 367–372. [[CrossRef](#)]
31. Hamada-Kawaguchi, N.; Nore, B.F.; Kuwada, Y.; Smith, C.I.E.; Yamamoto, D. Btk29A Promotes Wnt4 Signaling in the Niche to Terminate Germ Cell Proliferation in *Drosophila*. *Science* **2014**, *343*, 294–297. [[CrossRef](#)]

32. An De Wetering, M.; Barker, N.; Harkes, I.C.; Van Der Heyden, M.; Dijk, N.J.; Hollestelle, A.; Klijn, J.G.; Clevers, H.; Schutte, M. Mutant E-cadherin breast cancer cells do not display constitutive Wnt signaling. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 278–284.
33. Lu, D.; Zhao, Y.; Tawatao, R.; Cottam, H.B.; Sen, M.; Leoni, L.M.; Kipps, T.J.; Corr, M.; Carson, D.A. Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 3118–3123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Klein, E.A.; Assoian, R.K. Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 3853–3857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Razanadrakoto, L.; Cormier, F.; Laurienté, V.; Dondi, E.; Gardano, L.; Katzav, S.; Guittat, L.; Varin-Blank, N. Mutation of Vav1 adaptor region reveals a new oncogenic activation. *Oncotarget* **2015**, *6*, 2524–2538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Boudria, R.; Lauriente, V.; Oudar, A.; Rachidi, S.H.; Dondi, E.; Le Roy, C.; Gardano, L.; Varin-Blank, N.; Guittat, L. Regulatory interplay between Vav1, Syk and  $\beta$ -catenin occurs in lung cancer cells. *Cell. Signal.* **2021**, *86*, 110079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Niemann, C.U.; Herman, S.E.; Maric, I.; Gomez-Rodriguez, J.; Biancotto, A.; Chang, B.Y.; Martyr, S.; Stetler-Stevenson, M.; Yuan, C.M.; Calvo, K.R.; et al. Disruption of in vivo Chronic Lymphocytic Leukemia Tumor–Microenvironment Interactions by Ibrutinib—Findings from an Investigator-Initiated Phase II Study. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 1572–1582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Tissino, E.; Benedetti, D.; Herman, S.E.; Hacken, E.T.; Ahn, L.E.; Chaffee, K.G.; Rossi, F.M.; Bo, M.D.; Bulian, P.; Bomben, R.; et al. Functional and clinical relevance of VLA-4 (CD49d/CD29) in ibrutinib-treated chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **2018**, *215*, 681–697. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## REVIEW

## The survival grip—how cell adhesion promotes tumor maintenance within the microenvironment

Laura Gardano<sup>1,2</sup> , Jordan Ferreira<sup>1,2</sup>, Christine Le Roy<sup>1,2</sup>, Dominique Ledoux<sup>1,2</sup> and Nadine Varin-Blank<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INSERM U978, Bobigny, France

<sup>2</sup> UFR SMBH Université Sorbonne Paris Nord, Bobigny, France

### Correspondence

L. Gardano, INSERM U978, 1 rue Chablis -  
 93000 Bobigny, France  
 Tel: +33-(0)148388858  
 E-mail: [laura.gardano@univ-paris13.fr](mailto:laura.gardano@univ-paris13.fr)

(Received 23 July 2024, revised 11  
 November 2024, accepted 18 November  
 2024)

doi:10.1002/1873-3468.15074

Edited by Martina Seiffert

Cell adhesion is warranted by proteins that are crucial for the maintenance of tissue integrity and homeostasis. Most of these proteins behave as receptors to link adhesion to the control of cell survival and their expression or regulation are often altered in cancers. B-cell malignancies do not evade this principle as they are sustained in relapsed niches by interacting with the microenvironment that includes cells and their secreted factors. Focusing on chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma, this Review delves with the molecules involved in the dialog between the adhesion platforms and signaling pathways known to regulate both cell adhesion and survival. Current therapeutic strategies disrupt adhesive structures and compromise the microenvironment support to tumor cells, rendering them sensitive to immune recognition. The development of organ-on-chip and 3D culture systems, such as spheroids, have revealed the importance of mechanical cues in regulating signaling pathways to organize cell adhesion and survival. All these elements contribute to the elaboration of the crosstalk of lymphoma cells with the microenvironment and the education processes that allow the establishment of the supportive niche.

**Keywords:** BCR; cadherins; cell adhesion; chemokines; CLL; integrins; MCL; microenvironment;  $\beta$ -catenin

In most of elderly B-cell malignancies, such as chronic lymphocytic leukemia (CLL) and mantle cell lymphoma (MCL), the survival of tumor cells is guaranteed by interactions with cells of the microenvironment. CLL and MCL are two lymphoproliferative disorders characterized by the accumulation in the peripheral circulation of mature monoclonal B cells expressing the phenotypic markers CD19 and CD5. CLL is a heterogeneous disease that manifests in two main forms: indolent and progressive. The most severe forms of CLL

require therapeutic intervention to alleviate symptoms, though this does not constitute a cure. These cells carry potentially chromosomal aberrations or recurrent mutations and develop in protective niches, primarily in the lymph nodes and bone marrow [1,2]. *In vivo*, besides the blood, CLL and MCL cells accumulate in these preferential microenvironments and in the spleen, but extra-nodal involvement has been described in both diseases and associated with poor prognosis [3]. As part of the microenvironment, the antigenic or B-cell receptor

### Abbreviations

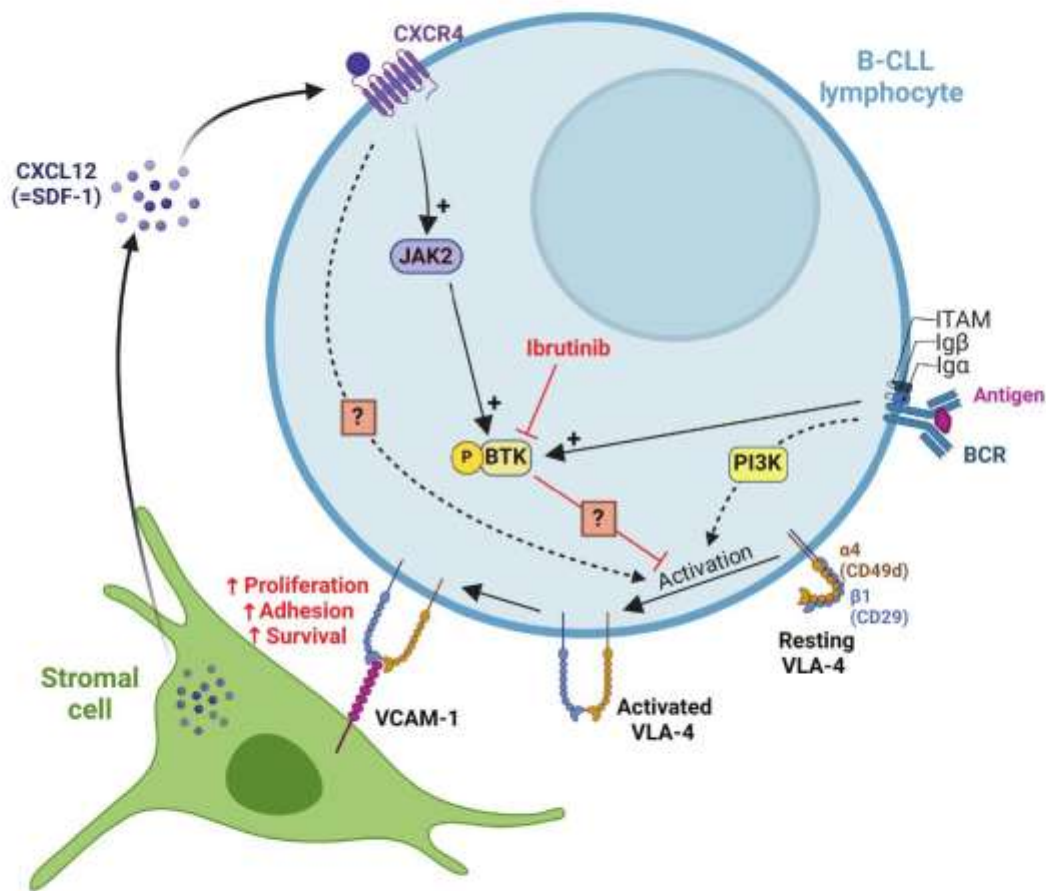
BCR, B-cell receptor; BTK, Bruton's tyrosine kinase; CAF, cancer-associated fibroblasts; CLL, chronic lymphocytic leukemia; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; ECM, extracellular matrix; FDC, follicular dendritic cells; FRC, follicular reticular cells; ICAM, intercellular cell adhesion molecule; MCL, mantle cell lymphoma; MSC, mesenchymal stromal cells; PCP, planar cell polarity; Syk, Spleen tyrosine kinase; TME, tumor microenvironment; VCAM, vascular adhesion molecule.

(BCR) signaling pathway is highly relevant in both diseases as shown by the success of the therapeutic strategy in targeting this pathway, for example, by Ibrutinib and its derivatives [4,5]. In addition, CLL and MCL are divided into two subtypes, that is, unmutated (UM) and mutated (M) based on the recombination or not of immunoglobulin heavy chains genes that occur upon antigen encounter. UM cases are generally associated with worse prognosis than M cases, in both diseases. In CLL, *tri(12)*, *del(13q)*, and *del(11q)* are among the most frequent genomic alterations. Genetically, a number of predisposing mutations have been described in CLL. Over 60 genes, mutations are considered drivers of the disease including genes implicated in the DNA damage response, such as *POT1*, *ATM*, or signaling effectors as *NOTCH* or splicing regulators as *SF3B1* [6,7]. In contrast, the genetic landscape in MCL is rather homogeneous. The translocation *t(11;14)* of the immunoglobulin promoter upstream of the cyclin D1 gene causes its overexpression and a deregulation of the cell cycle. MCL cells that do not present *t(11;14)* have mutation in *SOX11*, an oncogenic transcription factor that regulates cell differentiation and proliferation and whose mutation favors leukemogenesis. In both neoplasms, aberrations in TP53 gene aggravate the course of the disease [8,9].

The isolation of leukemic cells results in relatively rapid cell death, however CLL and MCL cells in coculture with stromal cell lines gain a survival advantage [10–13]. Moreover, in such conditions, the proportion of living cells is higher among the tumor cells recovered with the stroma as compared to those that do not adhere [10,14–16]. This suggests a link between adhesion and survival of tumor cells within the microenvironment. The integrity of tissues and organs is maintained by the interactions among cells that are mainly dependent on tight, adherens and gap junctions, desmosomes and hemidesmosomes. It is less intuitive to evaluate the importance of cell-to-cell contact when studying cells that, by nature, are not adherent and whose role is to patrol the environment looking for antigens and triggering the immune response. However, cell–cell interaction molecules, that is, integrins and cadherins, share transduction effectors with cell survival signaling pathways, which supports the notion that, even in immune cells, survival and adhesion are linked. Furthermore, therapeutic strategies in CLL and MCL target the crosstalk of tumor cells with the tumor microenvironment (TME) resulting in the egress of leukemic cells from the lymph node into the blood. This makes them more sensitive to cell death by immune recognition [4,17,18]. In a physiological context, B cells move in and out of the lymph

node to fulfill their immunological function of surveying the presence of antigen displayed on antigen-presenting cells, such as macrophages and dendritic cells, or soluble antigens [19,20]. While the encounter with an antigen initiates a BCR signaling response and B-cell survival, its absence induces the egress of the B cell from the lymph node, enabling it to continue its patrolling activity in other parts of the body. The entry into the lymph node is facilitated by the action of chemokines, such as CXCL12 or CXCL13, which bind to their cognate receptors on B cells, namely CXCR4 and CXCR5, respectively. In contrast, the egress from the lymph node is regulated by the S1PR1 receptor [21]. BCR engagement exacerbates the adhesion of lymphocytes to the microenvironment, notably by triggering the conformational change necessary to the activation of integrin  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) to adhere to VCAM-1 and fibronectin within the microenvironment [22] (Fig. 1). *In vitro* treatment of CLL cells with Ibrutinib, an inhibitor of the BCR effectors Bruton's tyrosine kinase (BTK), counteracts integrin activation and causes the detachment of cells from fibronectin or VCAM-1 [18]. Interestingly, the kinase BTK is also a downstream effector of CXCL12 stimulation upon interaction with its receptor CXCR4 enhancing the interaction with the microenvironment and VLA-4 activation [18,23]. *In vivo*, Ibrutinib and its alternative treatments cause the release of tumor cells into the blood elevating the lymphocytosis and decreasing the nodal accumulation in the first months of treatment [24–26]. However, BCR triggering in Ibrutinib-treated cells still confers the possibility of activating VLA-4 to increase adhesion to the microenvironment, indicating that an alternative BTK-independent and likely PI3K-dependent mechanism of integrin activation exists in these cells [24–26]. Moreover, although *in vitro* treatment with Ibrutinib is effective in targeting both CLL adhesion and migration elicited by CXCL12, VLA-4 activation persists when patients CLL cells are concomitantly stimulated by CXCL12 and treated with BTK inhibitors [26]. This confirms the involvement of multiple players in the regulation of VLA-4 conformational change and CLL cell's adhesive properties.

B-cell malignancies are characterized by an altered trafficking of tumor B cells within the lymph node or bone marrow, which results in an exacerbated accumulation of tumor cells in these microenvironments. Altered membrane expression or dynamics of CXCR4, CXCR5, and CD62L are responsible for the retention of CLL cells within the nodal microenvironment [27–29]. While leukemia progression is notably driven by the accumulation of genetic mutations that alter



**Fig. 1.** Overview of the survival grip in a CLL microenvironment. B-CLL cells express receptors such as CXCR4 and the B-cell receptor (BCR) to respond to different signals from the microenvironment. CXCL12/CXCR4 axis and BCR stimulation increase adhesion to the microenvironment by activating the conformational change of integrins such as VLA-4 that interacts with VCAM-1 expressed on the cells within the microenvironment. Integrin-dependent adhesion translates into proliferation and survival response. *In vitro* studies suggest that inhibition of the BCR effector, BTK via Ibrutinib opposes to VLA-4 conformational change causing the release of CLL cells from the microenvironment. However, in the presence of BCR activation or CXCL12 stimulation, VLA-4 conformational change is still observed even in the presence of Ibrutinib, indicating the existence of BTK-independent integrins activation processes. A BTK bypass exists for VLA-4 activation in the presence of BCR stimulation and it involves PI3K.

cell-intrinsic signaling pathways, it needs also the support of the microenvironment, which provides pro-survival factors and assures the immunological evasion that are crucial for tumor maintenance [4,30].

Focusing mainly on chronic CLL and MCL, this Review will offer a picture of the molecular protagonists of cell adhesion in B-cell malignancies and the signaling pathways that regulate cell survival upon cell interaction. Furthermore, the adhesion molecules expressed by the TME will be described, along with the modifications that are triggered by tumor cells as part of the reshaping process necessary for tumor development.

### Stromal cells in the lymph node and the bone marrow

An efficient immune response is based on a series of cell-to-cell interactions established between the various immune cell types comprising B cells within the microenvironment of the lymph node. Immune cells interact with the stromal component, which provides the motorway that supports T- and B-cell trafficking in search of antigens [31–33]. In addition, the lymph node represents a privileged microenvironment for the accumulation and expansion of numerous B-cell malignancies, including CLL and MCL [2]. Nevertheless, tumor cells can

also accumulate in other locations, such as the bone marrow, intestine, skin, and nasal cavities [1,2].

In the complex organization of the lymph node, chemokine gradients are responsible for the attraction and regulation of trafficking of T and B cells. Within the extrafollicular zone, follicular reticular cells (FRC), which secrete CXCL12 and CCL19 are responsible for the activation and the antigen presentation to B and T cells [34]. In parallel, within the follicular region, follicular dendritic cells (FDC), through the secretion of CXCL13, regulate the movement and maturation process of B cells. During the development of neoplasm, the stromal cells of the lymph node undergo modifications in response to molecules secreted by the cancer cells [35,36]. In healthy donors, the lymph node FRC and FDC networks define B- and T-cell zones, regulating cell behavior and function. However, this organization is lost in CLL lymph nodes as a result of the invasion of tumor cells disrupting the normal trafficking of immune cells and altering the immune response [37]. Furthermore, the absence of FDC markers in CLL nodal biopsies provides further evidence of the disorganization of tumor lymph nodes [38]. In addition, nurse-like cells (NLC), which are derived from CLL monocytes and exhibit M2-like characteristics, accumulate in the lymph node and secrete CXCL12, CXCL13, BAFF/APRIL [30,39,40]. NLCs secrete also CCL21, which attracts and maintains the tumor bulk in the microenvironment. It is noteworthy that during the secretion process, CCL21 remains exposed on the extracellular side of NLC, rather than being released. This contributes to the retention of CLL cells by physically trapping them through the interaction with CCR7, which is highly expressed on CLL B cells [38]. It is well established that chemokines not only attract and trigger B-cell migration but also mediate adhesion by activating integrins clustering [41,42]. Other nonhematopoietic cells present in the lymph node include vascular endothelial cells, also known as high endothelial venules (HEV), which express adhesion molecules that facilitate the entry of lymphocytes from the bloodstream into the lymph node [37]. In particular, CLL cells from patients showing a bulky disease with large lymph nodes and spleen can express a high level of L-selectin (CD62L), which contributes to the intense trafficking into the lymph node via the interaction with the HEV [43]. However, the high level of expression of CD62L is not a common feature of all CLL cells as several patients presenting a bulky disease may have low CD62L surface expression [43]. This observation is in agreement with the previous description that the lower expression of CD62L on CLL cells is responsible for impaired migration [44].

The majority of B-cell malignancies exhibit varying degrees of localization in the bone marrow [45]. The bone marrow is a complex organ with the function of releasing immune cells into the bloodstream. Consequently, it provides the structure and functional support necessary for the development and maintenance of hematopoietic stem cells. Besides these undifferentiated cells, the bone marrow is populated by mesenchymal stromal cells (MSC), which also possess stem-like properties, as they can differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes. This feature, in conjunction with the expression of phenotypic markers such as CD90, CD73, and CD105, allows the definition of MSC [46]. The plasticity of these cells renders them highly susceptible to the reshaping properties of tumor cells. Indeed, MSCs acquire cancer-associated fibroblast (CAF)-like features in coculture with CLL cells, thereby enhancing their ability to support tumor development [47,48].

### Adhesion molecules and cell survival

Integrins are membrane proteins that function as heterodimers, consisting of the association of an alpha and beta subunits, whose combination gives rise to a variety of integrins expressed at the cell membrane [33]. Integrins mediate the interaction with the extracellular matrix (ECM) and other cells in a heterotypic or homotypic fashion, depending on whether the two cells interacting are of the same type or not [49]. Integrin engagement in cell–cell or cell–ECM interactions results in increased adhesiveness, which is achieved through both affinity and avidity; this implies molecular conformational changes and micro-clustering [50]. The ECM is a complex array of macromolecules such as fibrous proteins (i.e., elastin and fibronectin) and glycosaminoglycans (GAG-)rich proteoglycans that regulate the tissue architecture and homeostasis [51]. Several integrins bind the protein component of the ECM, that is, laminins, collagens, and fibronectin. These proteins share the RGD (Arg-Gly-Asp) amino acid sequence recognized by the extracellular ligand binding domain on integrins [52]. Some integrins also bind to protein ligands expressed on other cells, for example, a disintegrin and metalloprotease (ADAM), immunoglobulin-type receptors such as intercellular cell adhesion molecule (ICAM), or vascular cell adhesion molecule (VCAM). The binding of integrin to their ligand leads to integrin clustering and reorganization of actin cytoskeleton supported by proteins, such as talin, paxillin,  $\alpha$ -actinin, and filamin [53]. Among the cellular effectors of integrin-mediated signaling, there are Ras/ERK, PI3K/AKT, and YAP/TAZ for mechano-transduction [54].

The integrins  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) and  $\alpha_L\beta_2$  (LFA-1 or CD11a/CD18) are the most efficient integrins in B- and T-cell biology, regulating adhesion and migration within the microenvironment [55,56]. Main binding partners of  $\alpha_4\beta_1$  are the ECM protein fibronectin and VCAM-1 expressed on stromal and endothelial cells [57]. In CLL, VCAM-1 showed higher expression on bone marrow stromal cells from patients presenting poor prognostic biomarkers [58]. Also, soluble VCAM-1 was detected in the plasma of CLL patients' samples, able to activate VLA-4 and contribute to increase cell survival of circulating lymphocytes [59]. In addition, VLA-4 expressed on CLL cells binds elastin microfibril interfacier-1 (EMILIN-1), a glycoprotein expressed in lymph node, spleen, and bone marrow and capable of protecting CLL cells from spontaneous apoptosis [60]. In normal B cells, LFA-1 binds ICAM-1 expressed on follicular dendritic cells (FDC) in the lymph node germinal centers, and its activation in conjunction with VLA-4 activation increases cell survival [61].

Chemokines, such as CCL21, CXCL12, and CXCL13, attract T and B lymphocytes to the nodal microenvironment and, after binding to their cognate receptor, activate signaling pathways to trigger an integrin conformational change referred to as 'inside-out signaling' [62]. In normal T and B cells, LFA-1 inside-out activation, in response to CXCL12, is regulated by small GTPases, that is, RhoA and Rac-1 enhance adhesion to ICAM-1 whereas Cdc42 behaves as negative regulator of adhesion [63,64]. However, in B-CLL cells the role of Rac-1 and Cdc42 in LFA-1 conformational change is highly heterogeneous, displaying an altered mechanism of integrin activation [64]. Indeed, the majority of CLL cells have a reduced expression of LFA-1 and an impaired capacity of activating it [65–67]. Exceptions are CLL cells harboring trisomy 12, that possess high level of LFA-1. Interestingly, this particular genotype is associated with higher proliferative capacity linked to a stronger dependence and ability to respond to microenvironmental signals [68]. Because of the lower expression of LFA-1, CLL cells show a less efficient migration into secondary lymphoid organs except the spleen, where migration is LFA-1 independent. These migration defects can be rescued by autocrine signaling from vascular endothelial growth factor (VEGF) and the activation of VLA-4, supporting the collaboration of these two integrins in the regulation of CLL cell trafficking [66,67]. The inability of CLL cells to change the conformation of LFA-1 in response to CXCL12 is linked to the impaired endosomal recycling of the small GTPase Rap1 that uncouples it from its GTPase exchange factor (GEF) [69]. Interestingly, 48 h of *ex-vivo* culture

restores the responsiveness to CXCL12 by reactivating Rap1 and LFA-1 [69]. Mechanistically, *in vitro* studies suggested that CXCL12/CXCR4 activates BTK via phosphorylation in a JAK2-PI3K-dependent fashion and leads to the activation of RhoA and LFA1, explaining the increased adhesion of CLL cells to VCAM-1 and ICAM-1 [70]. BTK is also downstream of BCR activation, which enhances the adhesion of MCL and CLL cells to stromal cells in coculture models (Fig. 1) [18,22]. However, there is no LFA1 conformational change when BTK is activated by BCR engagement, suggesting the existence of other molecules that increase adhesion [70]. One possibility is the involvement of VLA-4 or cadherin/catenin.

An important element within the microenvironment is the mechanical stress represented by two important parameters, the stiffness of the ECM and the shear stress, that is, the movement of fluids enriched by cells. The ECM can present with various degrees of stiffness depending on the density of its constituents. The stiffness of the ECM impacts the movement of tumor and immune cells in the microenvironment thus the ECM composition and alteration have become an interesting area of investigation and targeting in cancer research [51]. In solid cancers, the ECM stiffness activates signaling effectors, such as the transcriptional activator YAP, that increases the tumor cell metabolism to sustain proliferation [71]. In murine lymphoma models, such as those of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), the lymph node stiffness is higher as compared to control. Using hydrogel models containing stromal cells where it is possible to recapitulate a physiological lymph node stiffness, it was shown that rigidity increased cell proliferation of DLBCL tumor cells embedded in the hydrogel [72].

Besides ECM stiffness, another biophysical parameter that can affect tumor cell proliferation and survival is fluid shear stress. When tumor cells reach the lymph node, they accumulate and proliferate so they are subjected to the higher pressure by fluid movement in the microenvironment [73]. In a cellular model of DLBCL, the modeling of fluid flow caused an activation of integrin and of BCR signaling rendering the cells more responsive to survival signals within the microenvironment [73]. In a similar study on CLL cells, shear stress was modulated in a bioreactor using a microfluidic system containing fibers lined with endothelial cells. Upon circulation, the expression of molecules important for adhesion and cell migration such as CD62L, CD49d, and CXCR4 increased, indicating the influence of shear stress on protein expression and cellular responses [74]. In addition, a biophysical study in CLL showed that these cells have lower deformability than healthy B

cells [75]. Although the molecular explanation of this finding is still lacking, one possibility is the enlarged nucleus observed in CLL cells that may confer a higher stiffness to these cells [75]. The altered deformability and cellular stiffness affect cell movement in the blood vessels and the dynamic of tumor dissemination.

Some biomechanical parameters that affect lymphomas development can be recapitulated by the establishment of 3D culture systems including microenvironment cell types such as stromal or immune cells, besides tumor cell. Spheroids are aggregates of different types of cells that grow on a scaffold or in a scaffold-free system, but they are unable to regenerate. As it is sometimes challenging to reproduce all the possible cell–cell interactions and the mechanical stresses within the microenvironment, microfluidic systems have been developed to generate gradients of cytokines or chemokines to model cell polarization, migration and perform shear stress studies [73,76]. It has been demonstrated that mechanical cues, which are driven by cell-to-cell contacts and fluid flow, are important elements in the survival of lymphoma cells [72]. Indeed, the generation of organoids containing stromal cells benefitted the research to explore the mechanisms of therapy resistance, particularly in B and T lymphomas [77–79]. The generation of spheroids using multiple cell types, including stromal and T cells, and a suitable cytokine cocktail allowed the maintenance of primary CLL cells in culture for a longer period than in 2D cultures, where CLL cells tend to enter apoptosis quite rapidly. Furthermore, the spontaneous formation of pseudo-follicles where CLL cells proliferate was observed, allowing to test the effect of potential drugs on the communication of tumor cells with the microenvironment and to investigate the molecular determinants of tumor resistance to therapy [80]. Similarly, patient-derived 3D organoids have been developed using MCL cells with T cells and monocytes together with cytokines that allow tumor cell proliferation and analysis. Several features of MCL tumor were recapitulated in this system, including the response to Ibrutinib shown by a reduction of MCL cells viability upon 3D culture [78]. MCL cells cultured in 3D system regulate the transcription of genes involved in ECM organization, such as collagen, indicating the capacity of remodeling the architecture of their microenvironment [78].

### **VLA-4 (CD49d) in CLL: from the inside-out signal transducer to a prognostic marker**

VLA-4 has received considerable attention in recent years, with studies demonstrating its high expression levels on CD19/CD5-positive cells, particularly in CLL

patients with adverse prognosis [24,81,82]. VLA-A is the key molecule for CLL homing in the bone marrow in response to CXCL12, ligand of CXCR4 [83]. In CD34-positive immature B cells, CXCL12 triggers VLA-A4 conformational change necessary to increase adhesion to VCAM-1. This is true also for CLL cells unless they harbor the trisomy 12 where the activation of VLA-4 is stimulated by another chemokine, CCL21 [59]. The expression of CD49d, the alpha chain of the VLA-4 integrin, is variable among cases, although it is possible to establish a cutoff and stratify patients according to CD49d expression. In particular, the detection of CD49d on over 30% of CLL cells associates with a lower overall survival and shorter treatment-free survival [84]. In addition, some patients present with a bimodal expression of CD49d, which correspond to the simultaneous presence of CD49d-negative and positive populations [85]. In the presence of the bimodal expression, the CD49d-positive cells show higher proliferation rate as compared to CD49d-negative cells [85]. In Ibrutinib-treated patients, the bimodal CD49d expression confers progression-free survival comparable to CD49d-positive patients and shorter than CD49d-negative patients, reinforcing the relevance of CD49d as a prognostic factor [85]. The stark increase in lymphocytosis observed in CD49d-negative patients is not observed in CD49d-positive or bimodal CD49d upon treatment with Ibrutinib and Acalabrutinib, hinting at the higher retention of CD49d-expressing cells in the nodal microenvironment [26,85]. In CD49d-positive patients, circulating CLL cells present with constitutively active VLA-4 as assessed by conformation-specific antibodies. The level of soluble sVCAM-1 in the blood samples of these patients is also elevated and the activation of VLA-4 associates with autonomous BCR signaling to increase cell survival [86]. Indeed, CD49d-positive cells express higher levels of survival factors and pro-survival cytokines, indicating a greater survival and migration potential as compared to CD49d-negative cells [26]. Elevated CD49d expression is observed on the CXCR4<sup>dim</sup>/CD5<sup>high</sup> subpopulation of tumor B cells in CLL, representing the proliferative bulk that has just egressed from the lymph node [87]. These CXCR4<sup>dim</sup>/CD5<sup>high</sup> cells exhibit enhanced metabolic activity when compared to their CXCR4<sup>high</sup>/CD5<sup>dim</sup> counterparts, as evidenced by their increased glucose uptake and mitochondrial mass following BCR stimulation [88]. In addition, these subsets express higher levels of PD-L1, induced by the stroma via the Notch-c-Myc axis, indicating their potential for evading the immune response triggered by the communication with the microenvironment [89].

Another interesting aspect of VLA-4 biology is linked to its glycosylation, particularly the presence of

sialic acid residues. Hypersialylated glycans residues decorate VLA-4 on B cells from CLL patients and enhance the migratory behavior of the cells toward gradients of fibronectin and VCAM-1 [90]. In addition, Ibrutinib treatment seems to alter the sialylation profile of VLA-4, thus affecting CLL trafficking and recognition by the immune system [90].

### Adhesion molecules provided by the TME components

The entry of T and B cells into the lymph node occurs via specialized vessels called high endothelial venules (HEV) [91] that owe their name to their peculiar high morphology that facilitates the migration and transmigration of immune cells into the lymphoid tissues. HEV possess a developed glycocalyx for the entrapment of chemokines necessary to attract the lymphocytes whereas sialomucins, expressed at their surface, interact with L-selectin on T and B lymphocytes to tether them and facilitate the interaction with chemokines. The movement of lymphocytes from the blood to peripheral tissues is divided into sequential steps. The rolling of the lymphocytes is warranted by weaker interactions of L-selectin (CD62L) expressed on lymphocytes to its ligands expressed on endothelial cells. The arrest phase depends on the activation of integrins such as VLA-4 and LFA-1, upon response to chemotactic stimuli by CCL19, CCL21, ligands of CCR7 and to a lesser extent CXCL12, ligand of CXCR4 [92]. Following chemokines binding to their receptors, the GTPases RhoA, Rap1, and Talin are responsible for the inside-out activation of integrins to stabilize the interaction with the endothelium. The polarization of the lymphocytes is the premise that allows the migration to the endothelial junctions where the transmigration occurs. The polarization is the result of a spatial reorganization of the cytoskeleton, chemokine receptors, and integrins maturation to define the leading and uropod edges. High affinity integrins, such as LFA-1, concentrate in the leading edge in a Rap-1-dependent fashion [93]. Following polarization, the migration through the intra-endothelium junctions requires another GTPase, Rac-1, responsible of the cytoskeleton remodeling necessary for lamellipodia formation at the leading edge. The spatial regulation of Rac-1 activity, that is, active at the leading and inactive at the tailing edge, depends on the optimal interplay of phosphorylation/dephosphorylation of  $\alpha_4$  integrin and its reversible binding to the adapter paxillin [94]. On endothelial cells, lymphocytes integrins binding to ICAM-1 triggers its clustering and

recruitment of VCAM to reinforce the arrest of lymphocytes. The engagement of ICAM-1 and VCAM-1 triggers Src- and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent events and results in the cytoskeleton remodeling that will facilitate the reorganization of endothelial adhesive structures [95]. This process implies endothelial VE-cadherin dephosphorylation and endocytosis that allows the generation of large gaps between endothelial cells for lymphocytes extravasation [96]. The breaching of lymphocytes through the inter-endothelial gaps results in an important change of morphology both of the lymphocyte and the endothelial cell that are the result of a cytoskeleton remodeling in GTPases-dependent manner. Endothelial actin stress fibers and a F-actin ring, generated where the lymphocyte squeezes, restrict the passage to the only lymphocytes and ensures the tissue integrity during transmigration [97]. Upon entry into the LN, the extravasation through the HEV requires the extracellular activity of autotaxin to produce lysophosphatidic acid (LPA). This chemical mediator allows the RhoA-dependent endothelial morphology change and the detachment of lymphocytes to allow their entry into the LN parenchyma [98].

Within the lymph node, FRC and FDC expression of ICAM and VCAM and their interaction with integrins expressed on immune cells regulate their survival, homing and trafficking [99–101]. In some B-cell malignancies, the expression of VCAM on stromal cells contributes to the enhanced survival of tumor cells and chemotherapy resistance in a PI-3K-dependent fashion [102]. VCAM-1 expression on endothelial and stromal cells is induced by macrophages upon CCL3 production by CLL cells following CD38 engagement [58]. Overexpression of VCAM-1 is the result of the response to  $\text{TNF}\alpha$  and depends on  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  activity [58,103].

Besides adhesion proteins expressed at the surface of stromal cells, another crucial element of the microenvironment is the ECM, a three-dimensional organization of macromolecules that provides tissue mechanical properties and homeostasis [104]. It is well established that ECM organization and composition are altered in cancer as a consequence of the crosstalk between malignant cells and the surrounding microenvironment [104]. CLL cells are capable of modifying their surrounding environment through the secretion of extracellular vesicles (exosomes), which confer CAF-like properties to the stromal cells. These cells are characterized by the deposition of the ECM and are recognized as relevant elements for cancer development and maintenance [48,105]. The contact of CLL cells and bone marrow stromal cells induces the expression of the kinase PKC $\beta$ II in stromal cells that, in turns,

activate the NF- $\kappa$ B transcriptional activity required to support CLL cells survival [106]. The impairment of NF- $\kappa$ B activation affects negatively CLL cell survival possibly by affecting the expression of adhesion molecules and survival cytokines [106]. Interestingly, human bone marrow stromal cells (HS-5) lacking the kinase Lyn and cocultured with CLL cells exhibit a change in the expression of genes involved in the regulation of the ECM, such collagen, and GAG metabolism when compared to wild-type stromal cells. These findings demonstrate that CLL cells induce transcriptional reprogramming in stromal cells, resulting in a CAF-like phenotype that enhances the adhesion and survival of malignant cells. Indeed, the downregulation in stromal cells of proteins involved in ECM organization, such as the proteoglycan Biglycan, resulted in a reduction in CLL cell survival, confirming that the integrity of adhesion platforms is necessary for tumor maintenance [107]. In addition, the overexpression of the ECM protein thrombospondin-1 (THBP1) was able to elicit apoptosis of CLL cells in coculture via the engagement of CD47. In Lyn<sup>ko</sup> stromal cells, *THBP1* transcript showed to be increased upon coculture with CLL cells [107]. Lyn is an essential component of B-cell development and its invalidation in CLL mouse models highlighted also its considerable role in the microenvironment, notably by regulating the adhesion to CLL cells [108].

## Signaling pathways regulated/promoted by cell adhesion

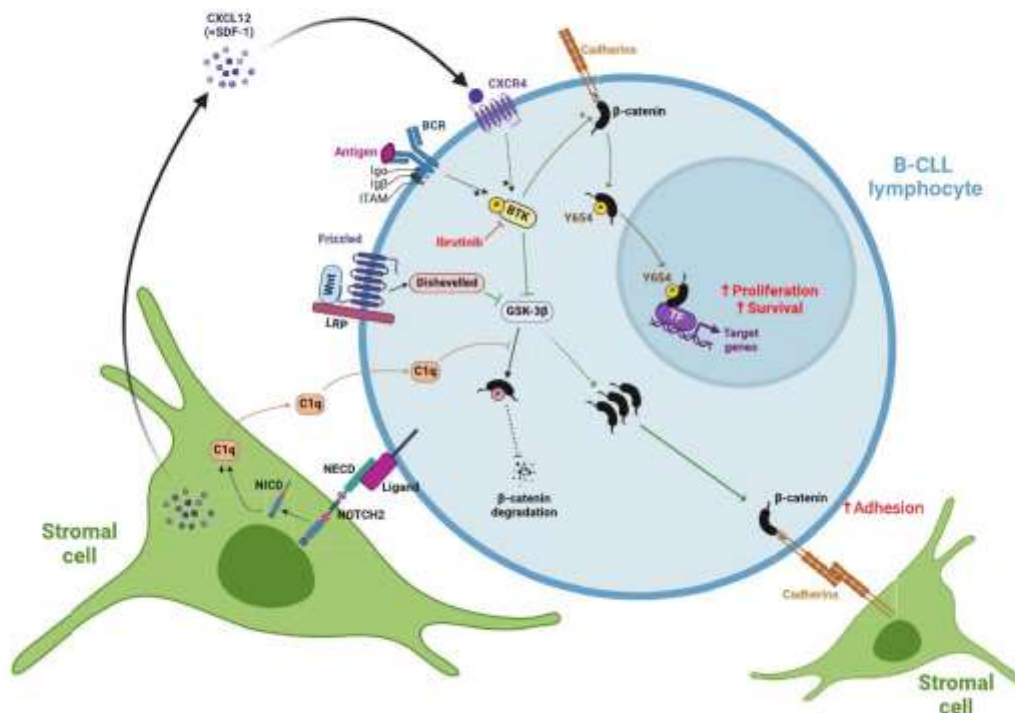
### BCR signaling and its effectors

The antigen recognition by the B-cell receptor represents a significant signaling pathway that sustains cell survival in both normal and pathological B cells. The BCR signal transduction cascade relies upon a kinase cascade that culminates with the mobilization of Ca<sup>2+</sup> and activation of the activity of transcription factors such as NFAT and NF- $\kappa$ B, which regulate the transcription of pro-survival effectors [109].

Several factors converge to indicate that the BCR signaling plays a role in the pathogenesis of various B-cell lymphomas. In CLL, two subtypes can be distinguished based on whether the hypersomatic mutation occurs (mutated, M subtype) or not (UM, unmutated). The UM subtype is associated with a worse prognosis than the M subtype [110–112]. Although specific antigens recognized by tumor CLL cells are not entirely identified, there is a limited repertoire of the variable complementarity determining regions, that is, HCDR3 in the IgM of the BCR in CLL cells. These characteristics indicate

that a specific clone of CLL cells is preferentially expanded during the development of CLL [113,114]. The BCR is constituted of surface IgM and/or IgD that recognize the antigen and transduce the signal through the associated intracellular Ig $\alpha$  and Ig $\beta$  that contain ITAM domains [115,116]. The antigen-dependent signal transduction necessitates the formation of BCR-containing micro-clusters at the cell membrane, which are generated by the cytoskeleton remodeling and are essential for the organization of the signalosome, the protein complex that allows propagation of the signal inside the cell [117–119]. The link between the BCR structural organization and the cytoskeleton is highlighted by the treatment with latrunculin A, an inhibitor of F-actin polymerization, which results in BCR activation [119]. The full activation of the BCR requires a conformational change in an inside-out fashion dependent on the kinase Syk, which is recruited at the ITAMs domain upon its phosphorylation by the Src family of kinases, such as Fyn and Lyn [120]. Although B cells respond to soluble antigens, the response to tethered antigens is more pronounced and more efficient. The expression of integrins LFA1 and VLA4 on normal B cells allows for enhanced interactions with stromal cells and other antigen-presenting cells, which in turn facilitate the recognition of the antigen by the BCR [32,121]. Syk interacts with pITAM in the Ig $\alpha$  and  $\beta$  via its SH2 domains, which are located at the N terminus of the protein. Recruitment of Syk allows a conformational change that results from its phosphorylation by itself or by other proteins, such as the Src kinases [122–124]. However, Syk can also interact with the cytoplasmic tail of the  $\beta$ 3 integrin upon binding to its extracellular ligand. This interaction allows Syk to be recruited at the cell membrane, where it can be phosphorylated and/or autophosphorylated in a pITAM-independent manner [125–127]. Thus, Syk activity both pITAM-dependent and pITAM-independent plays a role in the regulation of the adhesion process and signal transduction events [128].

The BCR signalosome comprises Vav, a small GTPase exchange factor that plays a pivotal role in cytoskeleton remodeling through the regulation of Rac activity. Vav acts also as an adapter protein for signal transduction [129,130]. In both hematopoietic and nonhematopoietic models, both Syk and Vav1 interact with  $\beta$ -catenin, regulating its stability and localization, and the cell membrane-anchored to cadherins [129,131]. In addition, the invalidation of Syk and Vav1 permitted the establishment of their role in EMT and cell migration [132]. Although the interplay between Syk, Vav, and  $\beta$ -catenin has not been fully established in B cells, it is interesting to reinforce once more the link that exists between the antigenic



**Fig. 2.** Schematic representation of  $\beta$ -catenin role in CLL cell survival. BTK-dependent inhibition of GSK-3 $\beta$  protein in B-CLL cells by various microenvironmental stimuli prevents the phosphorylation and degradation of  $\beta$ -catenin and leads to its accumulation (green arrow).  $\beta$ -catenin distributes to the cell membrane and stabilizes cadherin-dependent adhesion structures. In parallel, BTK can phosphorylate  $\beta$ -catenin on Y654, thereby favoring its nuclear import and transcriptional activity on target genes involved in proliferation and survival of B-CLL cells. BCR and CXCL12/CXCR4 activation stabilize  $\beta$ -catenin. In addition, C1q produced following stromal Notch2 signaling also contributes to  $\beta$ -catenin stabilization and transcriptional activity. Interestingly, activation of NOTCH2 signaling in stromal cells by B-CLL ligand highlights the ability of these cells to educate their microenvironment to their advantage.

response, cytoskeleton remodeling, and cell adhesion. In MCL cells, BCR stimulation results in enhanced adhesion to the stromal component in coculture experiments, which in turn enhances tumor cell survival [13]. One of the molecular mediators of this increased adhesion could be  $\beta$ -catenin, which is stabilized upon BCR stimulation in a BTK and GSK-3-dependent fashion (Fig. 2) [133]. Consequently, the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin is also induced as a consequence of its stabilization, thereby contributing to the regulation of NF- $\kappa$ B-dependent genes, such as IL-6 and WNT-16. The latter contributes to the long-term stabilization of  $\beta$ -catenin in MCL cells in an autocrine/paracrine manner. Wnt16 represents a particularly intriguing target of BCR signaling, given its crosstalk with Notch signaling [134]. The latter is implicated in B-cell malignancies as a regulator of survival, but also in its dialog with the microenvironment, as discussed in the following paragraph.

### Notch signaling and cell adhesion

Notch and Delta gene products were initially described in *Drosophila melanogaster* as adhesion molecules, as their expression in nonadherent fly cells resulted in the formation of cell aggregates [135,136]. Subsequently, the signaling pathway was delineated, whereby the Notch receptor is engaged by the binding of ligands Delta (Dll1, Dll3, and Dll4) or Jagged (Jagged-1 or 2) expressed at the surface of a neighboring cell [137]. The Notch receptor contains several EGF-like repeats on the extracellular domain. The engagement of the receptor with one of the ligands initiates two proteolytic events, catalyzed by ADAM10 and  $\gamma$ -secretase, which result in the release of the intracellular domain (NICD). The latter translocates to the nucleus, where it regulates the transcription of genes involved in cell differentiation and proliferation [138]. Immune cells express Notch receptors and ligands that regulate

numerous immunological functions, including adhesion and signaling molecules [139]. For instance, mast cells expressing Notch receptors have enhanced adhesion to stromal cells expressing Dll ligands [140]. This increased adhesion is partly due to the upregulation of integrin  $\beta 1$  at the cell surface [141].

In CLL, Notch mutations are presented by patients with a poor prognosis [7,142]. The most frequent mutations localize in the intracellular domain, resulting in the generation of a truncated protein lacking the PEST domain, which regulates the ubiquitination and elimination of the protein. This leads to a persistent Notch activity [7,143]. Impairment of Notch in the CLL cell line Mec-1 causes a reduction in cell viability and expression of CCR7, the CCL19/21 receptor responsible for lymph node chemotaxis [144]. Additionally, Notch activation triggers the transcriptional expression of BCR effectors genes such as *Lyn*, *BTk*, and *BLNK*, conferring a survival advantage to CLL cells. Primary CLL cells with mutated Notch exhibit increased surface IgM, further strengthening the link between Notch and BCR signaling pathways. The transduction of the Notch intracellular domain imparts a survival advantage to CLL cells and facilitates the entry into the S-phase of cell cycle. Moreover, it also enhances the BCR response as measured by an increased  $\text{Ca}^{2+}$  flux [145]. Notch1-ICD transduced cells express higher levels of CD38 and CD49d (VLA-4), both of which are used as markers of unfavorable prognosis in CLL patients. CD38 is a membrane glycoprotein that behaves as an enzyme in the NAD metabolism, conferring a survival advantage to CLL cells by enhancing homing properties and restricting the antitumor immune response [146]. Higher Notch activity coincides with enhanced protein translation rate and superior metabolic fitness [147,148]. Notch signaling is activated independently of the presence of mutation by the contact of CLL cells with stromal cells expressing Notch ligand, resulting in the activation of c-myc [148]. In addition to regulating metabolic genes, such as those of glycolysis, c-myc transcribes PD-L1 upon direct contact of CLL with stromal cells via Notch [89]. In primary cells isolated from CLL patients, the  $\text{CXCR4}^{\text{dim}}/\text{CD5}^{\text{hi}}$  subpopulation, emigrating from the lymph node, expresses a higher level of PD-L1, which promotes tumor evasion [89]. A similar immunosuppressive phenotype was observed in MCL cells transduced with Notch2-ICD, which is structurally related to Notch1-ICD [145].

Notch signaling is not only important in tumor cells, but it is also activated in the stromal counterpart in coculture of CLL cells. This occurs as part of

the microenvironment reshaping that takes place during CLL development [47,149]. Notch activation regulates the secretion of C1q, which in turn stabilizes  $\beta$ -catenin in CLL cells in a GSK-3 $\beta$ -dependent manner and upregulates the expression of N-cadherin at the cell surface of CLL and stromal cells, thereby strengthening the contact between CLL and stromal cells [149]. The relationship between Notch and N-cadherin serves to reinforce the link between mechanical cues and signal transduction, which translates into microenvironment reshaping and tumor development [150].

### Cadherins and $\beta$ -catenin

Cadherins refer to a large family of membrane glycoproteins expressed at the cell membrane, which mediate homo- and heterotypic cell interactions and organize adherens junctions (AJ) [151]. Cadherins possess large extracellular domains constituted of a variable number of ectodomains (EC), which mediate the interaction with other cadherins expressed on the interacting cells in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner [151]. According to tissue specificity, different types of cadherins have been described, including E-cadherin in epithelia, N-cadherin in the nervous system, and VE-cadherin in the vascular system. In addition to their role in the formation of structured tight and adherens junctions, which contribute to the rigidity of tissues and organs, cadherins are also involved in the regulation of more dynamic heterotypic cell–cell interactions. In CLL, the upregulation of N-cadherin in response to Notch2-dependent signaling from stromal cells is responsible for an enhanced interaction of tumor cells with the stroma. The increase in N-cadherin expression at the cell membrane is driven by  $\beta$ -catenin stabilization in response to Notch signaling activation in CLL cells [149].  $\beta$ -catenin interacts with the intracellular domain of cadherins, is indispensable for the establishment of cell–cell interaction structures and serves to establish a connection between cadherins and the cytoskeleton via  $\alpha$ -catenin [152,153].  $\beta$ -catenin has been identified as the main transducer of the Wnt-signaling pathway, which regulates cell differentiation and proliferation. The binding of Wnt ligands to their receptors of the Frizzled family inhibits the phosphorylation-dependent degradation of  $\beta$ -catenin, thereby stabilizing it. Stable  $\beta$ -catenin translocates into the nucleus and interacts with transcription factors belonging to the TCF/LEF family to regulate the transcription of axin 2, c-myc, and cyclin D1 among others [153]. Several genes belonging to the Wnt pathway are mutated in CLL

cells and the invalidation of some of these genes, for example, *disheveled*,  $\beta$ -catenin, and *Lef1*, affect negatively cell survival, indicating the importance of this pathway in CLL pathogenesis [154]. In CLL and MCL cells, the stabilization of  $\beta$ -catenin, which is triggered by the BCR signal transduction or the coculture with stromal cells, enhances on one hand the interaction with the stroma and on the other hand its transcriptional activity (Fig. 2) [14,133]. Interestingly, although the stabilization of  $\beta$ -catenin facilitates the interaction with the stroma, adherent CLL cells to the stromal component exhibit a lower level of cytosolic  $\beta$ -catenin, indicating that the degradation machinery that maintains  $\beta$ -catenin at a low level is active in these cells [14]. In the absence of Wnt or other stimuli, cytosolic  $\beta$ -catenin is continuously phosphorylated within the degradation complex and degraded by the proteasome, as a mean of controlling its transcriptional activity [153]. Among the soluble factors secreted by the stroma that facilitate the stabilization of  $\beta$ -catenin, CXCL12 contributes to this process via the CXCR4/BTK axis. Indeed, the inhibition of BTK by Ibrutinib re-establishes the basal level of  $\beta$ -catenin in both MCL and CLL cells indicating the role of this kinase in the stabilization of  $\beta$ -catenin and its activity. The role of CXCL12 in enhancing  $\beta$ -catenin stabilization and the higher expression of integrin at the cell membrane to enhance cell adhesion adds another element to the crosstalk between cadherins and integrins as part of the cell adhesion machinery. Integrins and cadherins constitute the focal adhesion (FA) and adherens junctions (AJ), respectively. Proteins such as vinculin and alpha-actinin but also enzymes like Src and Rho-GTPases are involved in the crosstalk between the two adhesion systems. For instance, Src signaling reduces E-cadherin expression at the membrane in a manner that is dependent on integrin activity [155,156]. Small Rho-GTPases are known to be involved in the regulation of cell migration promoted by cytoskeleton remodeling, as they are targeted to the cell membrane rich in F-actin and myosin [157]. The activities of Rac-1 and RhoA are reciprocally regulated as, when Rac-1 is activated, Rho is inhibited, thereby strengthening cadherin-dependent cell adhesion in certain cell types [158–160]. The activity of Rho-GTPases is regulated by GTP exchanging factors (GEF) and GAPs that behave as activator and inhibitors, respectively. One such GEF in hematopoietic cells is Vav that activates Rac in coordination with its participation to the BCR signal transduction [161–163]. As part of their involvement in cytoskeleton and plasma membrane dynamics, the small GTPases are also downstream effectors of the noncanonical Wnt-signaling pathway that regulates

the planar cell polarity (PCP) necessary to tissue organization but also sensing of the microenvironment.

### Noncanonical Wnt and PCP signaling pathway

The Wnt ligand-dependent signals can be divided into two branches, depending on the involvement of  $\beta$ -catenin as effector. The  $\beta$ -catenin-independent Wnt transduction machinery is primarily associated with the regulation of planar cell polarity (PCP) that is established perpendicularly to the apical–basal polarity. The PCP organization is a crucial element of tissue development and integrity [164]. Membrane proteins involved in adhesion, migration, and proliferation act as effectors of the PCP signaling pathway, including the transmembrane receptor Frizzled, the atypical cadherin Flamingo (or Celsr), and the tetraspanin-like protein Vangl2 [165]. Among the downstream effectors are Pk1, *disheveled*, and small GTPase such as Rho and Rac [166]. The elements of the PCP were found to be highly expressed in CLL cells as compared to healthy B cells [167]. This heightened expression of PCP elements was found to be linked to the enhanced response of tumor cells to migration cues triggered by CXCL12 and other chemokines in the presence of Wnt5a, which consequently resulted in a higher survival rate of tumor cells [167–169]. The Wnt5a signal transduction pathway contemplates the hetero-oligomerization of the receptor tyrosine kinase-like orphan receptor ROR1/ROR2 with Rho and Rac as downstream effectors, which regulate chemotaxis and cell proliferation, respectively [168]. The inhibition of ROR by a blocking antibody, Cirmtuzumab, has been demonstrated to strongly reduce CLL migration and to interfere with the cell division promoted by Wnt5a, especially in combination with Ibrutinib [168,170,171]. Higher expression of ROR1 at the cell surface of CLL cells reduces the sensitivity to venetoclax, a Bcl-2 inhibitor and therapeutic agent used to trigger CLL cell apoptosis [172]. Wnt5a from the microenvironment, triggering ROR1 signaling cascade can implement venetoclax resistance. Furthermore, long-term treatment with venetoclax can help selection for cells expressing higher level of ROR1 resulting in their expansion independently of the presence of Bcl2 mutations described to hinder the binding of the inhibitor [172,173].

The canonical and noncanonical Wnt signal transduction machineries share some effectors, including the kinase *disheveled* (Dvl), which explains the reciprocal control of these two pathways. In particular, Wnt5a exerts a negative regulation of the  $\beta$ -catenin-dependent signal transduction. This could partially explain why CLL cells appear to be unresponsive to canonical ligands, such as Wnt3a *in vitro* [167].

## Conclusions and perspectives

Cell adhesion mechanisms are important elements of the crosstalk between tumor cells and the microenvironment, which supports tumor development and maintenance. BCR and chemokines signaling lead to an increase of tumor cell adhesion to the microenvironment and the finding that adhering cells have better survival implies a link between adhesion and cell survival. Central to the enhancement of adhesion are integrins such as  $\alpha_4\beta_1$  but also the complex cadherins/ $\beta$ -catenin. Molecules such as Ibrutinib and derivatives interfering with the antigen and chemokine signaling pathways cause a release of tumor cells from the nodal and medullar microenvironments and result in the increase of lymphocytosis which render tumor cells more sensitive to cell death by evading the protective environment [18,174–176]. The development of resistance to conventional therapies, such as Ibrutinib, reveals the importance of alternative strategies to target the molecular determinants of adhesion and survival [177]. For example, targeting CD49d with antisense oligonucleotides in mouse cell culture models of acute lymphoblastic leukemia proved effective in lowering the level of CD49d and the functional integrin. Although not effective in *in vivo* mouse models, this strategy revealed the potential of modulating adhesion elements that could be explored [178]. The inhibition of cellular migration and proliferation both in CLL and MCL by cirmtuzumab that affects Wnt5a/ROR is alternative to the mechanism of action of Ibrutinib, making these two molecules complementary in targeting these lymphomas [170,179]. Tumor cells are able to modify their environment to gain a proliferative advantage. Reshaping the microenvironment implies metabolic and immunological reprogramming that favor tumor cells survival and immune escape. Nevertheless, the reorganization of the ECM architecture is an important part of this process, facilitating the structure of a platform where tumor cells can receive supportive signals [78,107]. Lenalidomide demonstrated antitumor effects on several B-cell malignancies including DLBCL, follicular lymphoma and MCL as it affects cell cycle, induces apoptosis and downregulates the expression of immune-checkpoints, such as PD-L1 [180]. Interestingly, Lenalidomide showed to reduce the secretion of CXCL12 by mesenchymal stromal cells, the main bone marrow stromal cells, potentially altering the trafficking of tumor B cells [181].

Two-dimensional (2D) systems are limited in their ability to accurately reproduce all the features of the adhesion processes that occur in a physiological three-

dimensional (3D) environment. Thus, the development of organoids or spheroids to more accurately reflect the complexities of the interactions between tumor cells and the microenvironment has gained considerable interest in recent years.

In conclusion, the intricate interactions between tumor B cells and their microenvironment remain a subject of active research. Future work investigating the molecular mechanisms of cell communication during cancer development, with a particular focus on the roles of adhesion molecules such as integrins and cadherins should identify new molecular signaling mediators that could lead to the development of targeted therapies and treatment approaches for CLL and MCL.

## Acknowledgements

Jordan Ferreira's project is supported by a MRT fellowship from Doctoral School Galilée – Université Sorbonne Paris Nord (USPN). Our projects are funded by ANR11 IDEX 00502 and 'Appel à projet d'établissement' from USPN. The cartoons in this review were prepared with Biorender.

## Author contributions

LG wrote the manuscript. JF prepared the cartoons. CLR, DL, and NVB edited the manuscript.

## References

- Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, Gibellini F, Njuguna N, Lee E, Stennett L *et al.* (2011) The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- $\kappa$ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **117**, 563–574.
- Herndon TM, Chen SS, Saba NS, Valdez J, Emson C, Gatmaitan M, Tian X, Hughes TE, Sun C, Arthur DC *et al.* (2017) Direct *in vivo* evidence for increased proliferation of CLL cells in lymph nodes compared to bone marrow and peripheral blood. *Leukemia* **31**, 1340–1347.
- Puente XS, Jares P and Campo E (2018) Chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma: crossroads of genetic and microenvironment interactions. *Blood* **131**, 2283–2296.
- ten Hacken E and Burger JA (2014) Microenvironment dependency in chronic lymphocytic leukemia: the basis for new targeted therapies. *Pharmacol Ther* **144**, 338–348.
- Ten Hacken E and Burger JA (2016) Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: implications

- for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta* **1863**, 401–413.
- 6 Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, Kluth S, Bozic I, Lawrence M, Böttcher S *et al.* (2015) Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* **526**, 525–530.
  - 7 Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Beà S, González-Díaz M *et al.* (2011) Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **475**, 101–105.
  - 8 Lazarian G, Tausch E, Eclache V, Sebaa A, Bianchi V, Letestu R, Collon JF, Lefebvre V, Gardano L, Varin-Blank N *et al.* (2016) TP53 mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes: early TP53 mutations in CLL and clonal evolution. *Int J Cancer* **139**, 1759–1763.
  - 9 Nadeu F, Martín-García D, Clot G, Díaz-Navarro A, Duran-Ferrer M, Navarro A, Vilarrasa-Blasi R, Kulis M, Royo R, Gutiérrez-Abril J *et al.* (2020) Genomic and epigenomic insights into the origin, pathogenesis, and clinical behavior of mantle cell lymphoma subtypes. *Blood* **136**, 1419–1432.
  - 10 Medina DJ, Goodell L, Glod J, Gélinas C, Rabson AB and Strair RK (2012) Mesenchymal stromal cells protect mantle cell lymphoma cells from spontaneous and drug-induced apoptosis through secretion of B-cell activating factor and activation of the canonical and non-canonical nuclear factor B pathways. *Haematologica* **97**, 1255–1263.
  - 11 Lagneaux L, Delforge A, de Bruyn C, Bernier M and Bron D (1999) Adhesion to bone marrow stroma inhibits apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* **35**, 445–453.
  - 12 Dubois N, Crompton E, Meuleman N, Bron D, Lagneaux L and Stamatopoulos B (2020) Importance of crosstalk between chronic lymphocytic leukemia cells and the stromal microenvironment: direct contact, soluble factors, and extracellular vesicles. *Front Oncol* **10**, 1422.
  - 13 Bernard S, Danglade D, Gardano L, Laguillier C, Lazarian G, Roger C, Thieblemont C, Marzec J, Gribben J, Cymbalista F *et al.* (2015) Inhibitors of BCR signalling interrupt the survival signal mediated by the micro-environment in mantle cell lymphoma: BCR inhibition in MCL. *Int J Cancer* **136**, 2761–2774.
  - 14 Mihoub I, Rharass T, Ouriemmi S, Oudar A, Aubard L, Gratio V, Lazarian G, Ferreira J, Dondi E, Cymbalista F *et al.* (2023) Identification of the axis  $\beta$ -catenin–BTK in the dynamic adhesion of chronic lymphocytic leukemia cells to their microenvironment. *Int J Mol Sci* **24**, 17623.
  - 15 Arvidsson G, Henriksson J, Sander B and Wright AP (2018) Mixed-species RNAseq analysis of human lymphoma cells adhering to mouse stromal cells identifies a core gene set that is also differentially expressed in the lymph node microenvironment of mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia patients. *Haematologica* **103**, 666–678.
  - 16 Kurtova AV, Tamayo AT, Ford RJ and Burger JA (2009) Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood* **113**, 4604–4613.
  - 17 Mraz M, Zent CS, Church AK, Jelinek DF, Wu X, Pospisilova S, Ansell SM, Novak AJ, Kay NE, Witzig TE *et al.* (2011) Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin  $\alpha$ -4- $\beta$ -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol* **155**, 53–64.
  - 18 De Rooij MFM, Kuil A, Geest CR, Eldering E, Chang BY, Buggy JJ, Pals ST and Spaargaren M (2012) The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **119**, 2590–2594.
  - 19 Batista FD and Harwood NE (2009) The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* **9**, 15–27.
  - 20 Cremasco V, Woodruff MC, Onder L, Cupovic J, Nieves-Bonilla JM, Schildberg FA, Chang J, Cremasco F, Harvey CJ, Wucherpfennig K *et al.* (2014) B cell homeostasis and follicle confinement are governed by fibroblastic reticular cells. *Nat Immunol* **15**, 973–981.
  - 21 Cyster JG and Schwab SR (2012) Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* **30**, 69–94.
  - 22 Spaargaren M, Beuling EA, Rurup ML, Meijer HP, Klok MD, Middendorp S, Hendriks RW and Pals ST (2003) The B cell antigen receptor controls integrin activity through Btk and PLC $\gamma$ 2. *J Exp Med* **198**, 1539–1550.
  - 23 Montresor A, Toffali L, Rigo A, Ferrarini I, Vinante F and Laudanna C (2018) CXCR4- and BCR-triggered integrin activation in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells depends on JAK2-activated Bruton's tyrosine kinase. *Oncotarget* **9**, 35123–35140.
  - 24 Tissino E, Benedetti D, Herman SEM, ten Hacken E, Ahn IE, Chaffee KG, Rossi FM, Dal Bo M, Bulian P, Bomben R *et al.* (2018) Functional and clinical relevance of VLA-4 (CD49d/CD29) in ibrutinib-treated chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* **215**, 681–697.
  - 25 Tissino E, Bomben R, Gattei V and Zucchetto A (2023) BCR/integrin interaction in CLL: a physiologic

- remnant with clinical relevance. *Clin Cancer Res* **29**, 3560–3562.
- 26 Alsadhan A, Chen J, Gaglione EM, Underbayev C, Tuma PL, Tian X, Freeman LA, Baskar S, Nierman P, Soto S *et al.* (2023) CD49d expression identifies a biologically distinct subtype of chronic lymphocytic leukemia with inferior progression-free survival on BTK inhibitor therapy. *Clin Cancer Res* **29**, 3612–3621.
  - 27 Patrussi L, Capitani N, Martini V, Pizzi M, Trimarco V, Frezzato F, Marino F, Semenzato G, Trentin L and Baldari CT (2015) Enhanced chemokine receptor recycling and impaired S1P1 expression promote leukemic cell infiltration of lymph nodes in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* **75**, 4153–4163.
  - 28 Saint-Georges S, Quettier M, Bouyaba M, Le Coquil S, Laurienté V, Guittat L, Lévy V, Ajchenbaum-Cymbalista F, Varin-Blank N, Le Roy C *et al.* (2016) Protein kinase D-dependent CXCR4 down-regulation upon BCR triggering is linked to lymphadenopathy in chronic lymphocytic leukaemia. *Oncotarget* **7**, 41031–41046.
  - 29 Vlad A, Deglesne PA, Letestu R, Saint-Georges S, Chevallier N, Baran-Marszak F, Varin-Blank N, Ajchenbaum-Cymbalista F and Ledoux D (2009) Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res* **69**, 6387–6395.
  - 30 Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M and Kipps TJ (2000) Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* **96**, 2655–2663.
  - 31 Junt T, Scandella E and Ludewig B (2008) Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol* **8**, 764–775.
  - 32 Carrasco YR, Fleire SJ, Cameron T, Dustin ML and Batista FD (2004) LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation. *Immunity* **20**, 589–599.
  - 33 Dustin ML (2019) Integrins and their role in immune cell adhesion. *Cell* **177**, 499–501.
  - 34 Katakai T, Hara T, Sugai M, Gonda H and Shimizu A (2004) Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J Exp Med* **200**, 783–795.
  - 35 Mourcin F, Verdière L, Roulois D, Amin R, Lamaison C, Sibut V, Thamphya B, Pangault C, Monvoisin C, Huet S *et al.* (2021) Follicular lymphoma triggers phenotypic and functional remodeling of the human lymphoid stromal cell landscape. *Immunity* **54**, 1788–1806.e7.
  - 36 Riedel A, Shorthouse D, Haas L, Hall BA and Shields J (2016) Tumor-induced stromal reprogramming drives lymph node transformation. *Nat Immunol* **17**, 1118–1127.
  - 37 Mueller SN and Germain RN (2009) Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**, 618–629.
  - 38 Zaaboub R, Vimeux L, Contremoulins V, Cymbalista F, Lévy V, Donnadiou E, Varin-Blank N, Martin A and Dondi E (2022) Nurse-like cells sequester B cells in disorganized lymph nodes in chronic lymphocytic leukemia via alternative production of CCL21. *Blood Adv* **6**, 4691–4704.
  - 39 Bürkle A, Niedermeier M, Schmitt-Gräff A, Wierda WG, Keating MJ and Burger JA (2007) Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **110**, 3316–3325.
  - 40 Nishio M, Endo T, Tsukada N, Ohata J, Kitada S, Reed JC, Zvaifler NJ and Kipps TJ (2005) Nurse-like cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 $\alpha$ . *Blood* **106**, 1012–1020.
  - 41 Laufer JM, Lyck R and Legler DF (2018) ZAP70 expression enhances chemokine-driven chronic lymphocytic leukemia cell migration and arrest by valency regulation of integrins. *FASEB J* **32**, 4824–4835.
  - 42 Alon R and Feigelson SW (2012) Chemokine-triggered leukocyte arrest: force-regulated bi-directional integrin activation in quantal adhesive contacts. *Curr Opin Cell Biol* **24**, 670–676.
  - 43 Lafouresse F, Bellard E, Laurent C, Moussion C, Fournié JJ, Ysebaert L and Girard JP (2015) L-selectin controls trafficking of chronic lymphocytic leukemia cells in lymph node high endothelial venules in vivo. *Blood* **126**, 1336–1345.
  - 44 Gu B, Dao L-P and Wiley J (2001) Impaired transendothelial migration of B-CLL lymphocytes: a defect linked to low L-selectin expression. *Leuk Lymphoma* **42**, 5–12.
  - 45 Dumontet E, Mancini SJC and Tarte K (2021) Bone marrow lymphoid niche adaptation to mature B cell neoplasms. *Front Immunol* **12**, 784691.
  - 46 Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, Krampera M, Leblanc K, Martin I, Nolte J, Phinney DG and Sensebe L (2019) Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) mesenchymal stromal cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy* **21**, 1019–1024.
  - 47 Mangolini M and Ringshausen I (2020) Bone marrow stromal cells drive key hallmarks of B cell malignancies. *Int J Mol Sci* **21**, 1466.

- 48 Paggetti J, Haderk F, Sciffert M, Janji B, Distler U, Ammerlaan W, Kim YJ, Adam J, Lichter P, Solary E *et al.* (2015) Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood* **126**, 1106–1117.
- 49 Huvencsers S and Danen EHJ (2009) Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* **122**, 1059–1069.
- 50 Hynes RO (2002) Integrins. *Cell* **110**, 673–687.
- 51 Mai Z, Lin Y, Lin P, Zhao X and Cui L (2024) Modulating extracellular matrix stiffness: a strategic approach to boost cancer immunotherapy. *Cell Death Dis* **15**, 307.
- 52 Barczyk M, Carracedo S and Gullberg D (2010) Integrins. *Cell Tissue Res* **339**, 269–280.
- 53 Brakebusch C (2003) New EMBO Member's review: the integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J* **22**, 2324–2333.
- 54 Cooper J and Giancotti FG (2019) Integrin signaling in cancer: mechanotransduction, stemness, epithelial plasticity, and therapeutic resistance. *Cancer Cell* **35**, 347–367.
- 55 Kinashi T (2005) Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **5**, 546–559.
- 56 Chan JR, Hyduk SJ and Cybulsky MI (2000)  $\alpha_4 \beta_1$  integrin/VCAM-1 interaction activates  $\alpha_L \beta_2$  integrin-mediated adhesion to ICAM-1 in human T cells. *J Immunol* **164**, 746–753.
- 57 Vonderheide RH and Springer TA (1992) Lymphocyte adhesion through very late antigen 4: evidence for a novel binding site in the alternatively spliced domain of vascular cell adhesion molecule 1 and an additional alpha 4 integrin counter-receptor on stimulated endothelium. *J Exp Med* **175**, 1433–1442.
- 58 Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, Bomben R, Dal Bo M, Marconi D, Bossi F, Lorenzon D, Degan M, Rossi FM *et al.* (2009) CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* **69**, 4001–4009.
- 59 Benedetti D, Tissino E, Caldana C, Dal Bo M, Bomben R, Marconi D, Ganghammer S, Zaja F, Pozzato G, Di Raimondo F *et al.* (2016) Persistent CD49d engagement in circulating CLL cells: a role for blood-borne ligands? *Leukemia* **30**, 513–517.
- 60 Tissino E, Pivetta E, Capuano A, Capasso G, Bomben R, Caldana C, Rossi FM, Pozzo F, Benedetti D, Boldorini R *et al.* (2022) Elastin Microfibril Interfacier1 (EMILIN-1) is an alternative prosurvival VLA-4 ligand in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol* **40**, 181–190.
- 61 Koopman G, Keehnen RM, Lindhout E, Newman W, Shimizu Y, van Seventer GA, de Groot C and Pals ST (1994) Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells. *J Immunol* **152**, 3760–3767.
- 62 Okada T, Ngo VN, Eklund EH, Förster R, Lipp M, Littman DR and Cyster JG (2002) Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med* **196**, 65–75.
- 63 Bolomini-Vittori M, Montresor A, Giagulli C, Staunton D, Rossi B, Martinello M, Constantin G and Laudanna C (2009) Regulation of conformer-specific activation of the integrin LFA-1 by a chemokine-triggered Rho signaling module. *Nat Immunol* **10**, 185–194.
- 64 Montresor A, Bolomini-Vittori M, Simon SI, Rigo A, Vinante F and Laudanna C (2009) Comparative analysis of normal versus CLL B-lymphocytes reveals patient-specific variability in signaling mechanisms controlling LFA-1 activation by chemokines. *Cancer Res* **69**, 9281–9290.
- 65 Hartmann TN, Grabovsky V, Wang W, Desch P, Rubenzer G, Wollner S, Binsky I, Vallon-Eberhard A, Sapozhnikov A, Burger M *et al.* (2009) Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer Res* **69**, 3121–3130.
- 66 Till KJ, Harris RJ, Linford A, Spiller DG, Zuzel M and Cawley JC (2008) Cell motility in chronic lymphocytic leukemia: defective Rap1 and  $\alpha L \beta 2$  activation by chemokine. *Cancer Res* **68**, 8429–8436.
- 67 Till KJ, Spiller DG, Harris RJ, Chen H, Zuzel M and Cawley JC (2005) CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and  $\alpha 4 \beta 1$  integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood* **105**, 4813–4819.
- 68 Hutterer E, Asslauer D, Caldana C, Krenn PW, Zucchetto A, Gattei V, Greil R and Hartmann TN (2015) CD18 (ITGB2) expression in chronic lymphocytic leukaemia is regulated by DNA methylation-dependent and -independent mechanisms. *Br J Haematol* **169**, 286–289.
- 69 Pye DS, Rubio I, Pusch R, Lin K, Pettitt AR and Till KJ (2013) Chemokine unresponsiveness of chronic lymphocytic leukemia cells results from impaired endosomal recycling of Rap1 and is associated with a distinctive type of immunological anergy. *J Immunol* **191**, 1496–1504.
- 70 Montresor A, Toffali L, Mirenda M, Rigo A, Vinante F and Laudanna C (2015) JAK2 tyrosine kinase mediates integrin activation induced by CXCL12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* **6**, 34245–34257.

- 71 Liu Q-P, Luo Q, Deng B, Ju Y and Song G-B (2020) Stiffer matrix accelerates migration of hepatocellular carcinoma cells through enhanced aerobic glycolysis via the MAPK-YAP signaling. *Cancer* **12**, 490.
- 72 Apoorva FNU, Tian YF, Pierpont TM, Bassen DM, Cerchietti L, Butcher JT, Weiss RS and Singh A (2017) Award Winner in the Young Investigator Category, 2017 Society for Biomaterials Annual Meeting and Exposition, Minneapolis, MN, April 05–08, 2017: lymph node stiffness-mimicking hydrogels regulate human B-cell lymphoma growth and cell surface receptor expression in a molecular subtype-specific manner. *J Biomed Mater Res A* **105**, 1833–1844.
- 73 Apoorva F, Loiben AM, Shah SB, Purwada A, Fontan L, Goldstein R, Kirby BJ, Melnick AM, Cosgrove BD and Singh A (2018) How biophysical forces regulate human B cell lymphomas. *Cell Rep* **23**, 499–511.
- 74 Walsby E, Buggins A, Devereux S, Jones C, Pratt G, Brennan P, Fegan C and Pepper C (2014) Development and characterization of a physiologically relevant model of lymphocyte migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **123**, 3607–3617.
- 75 Zheng Y, Wen J, Nguyen J, Cachia MA, Wang C and Sun Y (2015) Decreased deformability of lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Sci Rep* **5**, 7613.
- 76 Bessy T, Candelas A, Souquet B, Saadallah K, Schaeffer A, Vianay B, Cuvelier D, Gobaa S, Nakid-Cordero C, Lion J et al. (2021) Hematopoietic progenitors polarize in contact with bone marrow stromal cells in response to SDF1. *J Cell Biol* **220**, e202005085.
- 77 Tian YF, Ahn H, Schneider RS, Yang SN, Roman-Gonzalez L, Melnick AM, Cerchietti L and Singh A (2015) Integrin-specific hydrogels as adaptable tumor organoids for malignant B and T cells. *Biomaterials* **73**, 110–119.
- 78 Araujo-Ayala F, Dobaño-López C, Valero JG, Nadeu F, Gava F, Faria C, Norlund M, Morin R, Bernes-Lasserre P, Serrat N et al. (2023) A novel patient-derived 3D model recapitulates mantle cell lymphoma lymph node signaling, immune profile and in vivo ibrutinib responses. *Leukemia* **37**, 1311–1323.
- 79 Dobaño-López C, Valero JG, Araujo-Ayala F, Nadeu F, Gava F, Faria C, Norlund M, Morin R, Bernes-Lasserre P, Arenas F et al. (2024) Patient-derived follicular lymphoma spheroids recapitulate lymph node signaling and immune profile uncovering galectin-9 as a novel immunotherapeutic target. *Blood Cancer J* **14**, 75.
- 80 Haselager MV, van Driel BF, Perelaer E, de Rooij D, Lashgari D, Loos R, Kater AP, Moerland PD and Eldering E (2023) In vitro 3D spheroid culture system displays sustained T cell-dependent CLL proliferation and survival. *Hemasphere* **7**, e938.
- 81 Shanafelt TD, Geyer SM, Bone ND, Tschumper RC, Witzig TE, Nowakowski GS, Zent CS, Call TG, LaPlant B, Dewald GW et al. (2008) CD49d expression is an independent predictor of overall survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a prognostic parameter with therapeutic potential. *Br J Haematol* **140**, 537–546.
- 82 Gattei V, Bulian P, del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, Bomben R, Dal-Bo M, Luciano F, Rossi FM et al. (2008) Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **111**, 865–873.
- 83 Brachtl G, Sahakyan K, Denk U, Girbl T, Alinger B, Hofbauer SW, Neureiter D, Hofbauer JP, Egle A, Greil R et al. (2011) Differential bone marrow homing capacity of VLA-4 and CD38 high expressing chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS One* **6**, e23758.
- 84 Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nüchel H, Baldini L, Kurtova AV, Ferrajoli A, Burger JA et al. (2014) CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* **32**, 897–904.
- 85 Tissino E, Pozzo F, Benedetti D, Caldana C, Bittolo T, Rossi FM, Bomben R, Nanni P, Chivilò H, Cattarossi I et al. (2020) CD49d promotes disease progression in chronic lymphocytic leukemia: new insights from CD49d bimodal expression. *Blood* **135**, 1244–1254.
- 86 Tissino E, Gaglio A, Nicolò A, Pozzo F, Bittolo T, Rossi FM, Bomben R, Nanni P, Cattarossi I, Zaina E et al. (2024) The VLA-4 integrin is constitutively active in circulating chronic lymphocytic leukemia cells via BCR autonomous signaling: a novel anchor-independent mechanism exploiting soluble blood-borne ligands. *Leukemia* **38**, 2127–2140.
- 87 Calissano C, Damle RN, Marsilio S, Yan XJ, Yancopoulos S, Hayes G, Emson C, Murphy EJ, Hellerstein MK, Sison C et al. (2011) Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Mol Med* **17**, 1374–1382.
- 88 Chen Z, Simon-Molas H, Cretenet G, Valle-Argos B, Smith LD, Forconi F, Schomakers BV, van Weeghel M, Bryant DJ, van Bruggen JAC et al. (2022) Characterization of metabolic alterations of chronic lymphocytic leukemia in the lymph node microenvironment. *Blood* **140**, 630–643.
- 89 Böttcher M, Bruns H, Völkl S, Lu J, Chartomatsidou E, Papakonstantinou N, Mentz K, Büttner-Herold M, Zenz T, Herling M et al. (2021) Control of PD-L1 expression in CLL-cells by stromal triggering of the Notch-c-Myc-EZH2 oncogenic signaling axis. *J Immunother Cancer* **9**, e001889.

- 90 Natori A, Cerreto M, De Propriis MS, Del Giudice I, Soscia R, Peragine N, Intoppa S, Milani ML, Guarini A and Foà R (2023) Sialylation regulates migration in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **108**, 1851–1860.
- 91 Blanchard L and Girard J-P (2021) High endothelial venules (HEVs) in immunity, inflammation and cancer. *Angiogenesis* **24**, 719–753.
- 92 Von Andrian UH and Mempel TR (2003) Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* **3**, 867–878.
- 93 Rose DM, Alon R and Ginsberg MH (2007) Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunol Rev* **218**, 126–134.
- 94 Han J, Rose DM, Woodside DG, Goldfinger LE and Ginsberg MH (2003) Integrin  $\alpha 4 \beta 1$ -dependent T cell migration requires both phosphorylation and dephosphorylation of the  $\alpha 4$  cytoplasmic domain to regulate the reversible binding of paxillin. *J Biol Chem* **278**, 34845–34853.
- 95 Nourshargh S and Alon R (2014) Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* **41**, 694–707.
- 96 Wessel F, Winderlich M, Holm M, Frye M, Rivera-Galdos R, Vockel M, Linnepe R, Ipe U, Stadtmann A, Zarbock A *et al.* (2014) Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol* **15**, 223–230.
- 97 Alon R and Van Buul JD (2017) Leukocyte breaching of endothelial barriers: the actin link. *Trends Immunol* **38**, 606–615.
- 98 Bai Z, Cai L, Umemoto E, Takeda A, Tohya K, Komai Y, Veeraveedu PT, Hata E, Sugiura Y, Kubo A *et al.* (2013) Constitutive lymphocyte transmigration across the basal lamina of high endothelial venules is regulated by the autotaxin/lysophosphatidic acid axis. *J Immunol* **190**, 2036–2048.
- 99 Boscacci RT, Pfeiffer F, Gollmer K, Sevilla AIC, Martin AM, Soriano SF, Natale D, Henrickson S, von Andrian UH, Fukui Y *et al.* (2010) Comprehensive analysis of lymph node stroma-expressed Ig superfamily members reveals redundant and nonredundant roles for ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in lymphocyte homing. *Blood* **116**, 915–925.
- 100 Miyasaka M and Tanaka T (2004) Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol* **4**, 360–370.
- 101 Tabe Y, Jin L, Tsutsumi-Ishii Y, Xu Y, McQueen T, Priebe W, Mills GB, Ohsaka A, Nagaoka I, Andreeff M *et al.* (2007) Activation of integrin-linked kinase is a critical prosurvival pathway induced in leukemic cells by Bone marrow–derived stromal cells. *Cancer Res* **67**, 684–694.
- 102 Hall B (2004) Stromal cells expressing elevated VCAM-1 enhance survival of B lineage tumor cells. *Cancer Lett* **207**, 229–239.
- 103 Härzschel A, Zucchetto A, Gattei V and Hartmann TN (2020) VLA-4 expression and activation in B cell malignancies: functional and clinical aspects. *Int J Mol Sci* **21**, 2206.
- 104 Pickup MW, Mouw JK and Weaver VM (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* **15**, 1243–1253.
- 105 Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, Fearon D, Greten FR, Hingorani SR, Hunter T *et al.* (2020) A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer* **20**, 174–186.
- 106 Lutzny G, Kocher T, Schmidt-Supprian M, Rudelius M, Klein-Hitpass L, Finch AJ, Dürig J, Wagner M, Haferlach C, Köhlmann A *et al.* (2013) Protein kinase C- $\beta$ -dependent activation of NF- $\kappa$ B in stromal cells is indispensable for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells in vivo. *Cancer Cell* **23**, 77–92.
- 107 Vom Stein AF, Rebollo-Ríos R, Lukas A, Koch M, von Lom A, Reinartz S, Bachurski D, Rose F, Bozek K, Abdallah AT *et al.* (2023) LYN kinase programs stromal fibroblasts to facilitate leukemic survival via regulation of c-JUN and THBS1. *Nat Commun* **14**, 1330.
- 108 Nguyen P-H, Fedorchenko O, Rosen N, Koch M, Barthel R, Winarski T, Florin A, Wunderlich FT, Reinart N and Hallek M (2016) LYN kinase in the tumor microenvironment is essential for the progression of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* **30**, 610–622.
- 109 Laurenti L and Efremov DG (2020) Therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* **12**, 3259.
- 110 Stevenson FK, Forconi F and Packham G (2014) The meaning and relevance of B-cell receptor structure and function in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* **51**, 158–167.
- 111 Del Giudice I, Chiaretti S, Santangelo S, Tavolaro S, Peragine N, Marinelli M, Ilari C, Raponi S, Messina M, Nanni M *et al.* (2014) Stereotyped subset #1 chronic lymphocytic leukemia: a direct link between B-cell receptor structure, function, and patients' prognosis. *Am J Hematol* **89**, 74–82.
- 112 Agathangelidis A, Vardi A, Baliakas P and Stamatopoulos K (2014) Stereotyped B-cell receptors in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* **55**, 2252–2261.
- 113 Hwang K-K, Trama AM, Kozink DM, Chen X, Wiehe K, Cooper AJ, Xia SM, Wang M, Marshall DJ, Whitesides J *et al.* (2014) IGHV1-69 B cell chronic lymphocytic leukemia antibodies cross-react with HIV-1 and hepatitis C virus antigens as well as intestinal commensal bacteria. *PLoS One* **9**, e90725.

- 114 Schmid VK and Hobeika E (2024) B cell receptor signaling and associated pathways in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Front Oncol* **14**, 1339620.
- 115 Kurosaki T (2011) Regulation of BCR signaling. *Mol Immunol* **48**, 1287–1291.
- 116 Yang J and Reth M (2010) The dissociation activation model of B cell antigen receptor triggering. *FEBS Lett* **584**, 4872–4877.
- 117 Depoil D, Fleire S, Treanor BL, Weber M, Harwood NE, Marchbank KL, Tybulewicz VLJ and Batista FD (2008) CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor–antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nat Immunol* **9**, 63–72.
- 118 Harwood NE and Batista FD (2011) The cytoskeleton coordinates the early events of B-cell activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a002360.
- 119 Maity PC, Yang J, Klaesener K and Reth M (2015) The nanoscale organization of the B lymphocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 830–840.
- 120 Kläsener K, Maity PC, Hobeika E, Yang J and Reth M (2014) B cell activation involves nanoscale receptor reorganizations and inside-out signaling by Syk. *Elife* **3**, e02069.
- 121 Carrasco YR and Batista FD (2006) B-cell activation by membrane-bound antigens is facilitated by the interaction of VLA-4 with VCAM-1. *EMBO J* **25**, 889–899.
- 122 Mansueto MS, Reens A, Rakhilina L, Chi A, Pan BS and Miller JR (2019) A reevaluation of the spleen tyrosine kinase (SYK) activation mechanism. *J Biol Chem* **294**, 7658–7668.
- 123 Arias-Palomo E, Recuero-Checa MA, Bustelo XR and Llorca O (2009) Conformational rearrangements upon Syk auto-phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1794**, 1211–1217.
- 124 Cottat M, Yasukuni R, Homma Y, Lidgi-Guigui N, Varin-Blank N, Lamy de la Chapelle M and Le Roy C (2017) Phosphorylation impact on spleen tyrosine kinase conformation by surface enhanced Raman spectroscopy. *Sci Rep* **7**, 39766.
- 125 Woodside DG, Obergfell A, Leng L, Wilsbacher JL, Miranti CK, Brugge JS, Shattil SJ and Ginsberg MH (2001) Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin  $\beta$  cytoplasmic domains. *Curr Biol* **11**, 1799–1804.
- 126 Bakthavatsalam D, Craft JW Jr, Kazansky A, Nguyen N, Bae G, Caivano AR, Gundlach CW 4th, Aslam A, Ali S, Gupta S et al. (2021) Identification of inhibitors of integrin cytoplasmic domain interactions with Syk. *Front Immunol* **11**, 575085.
- 127 Antenucci L, Hytönen VP and Yläanne J (2018) Phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motifs and integrin cytoplasmic domains activate spleen tyrosine kinase via distinct mechanisms. *J Biol Chem* **293**, 4591–4602.
- 128 Mócsai A, Ruland J and Tybulewicz VLJ (2010) The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* **10**, 387–402.
- 129 Razanadrakoto L, Cormier F, Laurienté V, Dondi E, Gardano L, Katzav S, Guittat L and Varin-Blank N (2015) Mutation of Vav1 adaptor region reveals a new oncogenic activation. *Oncotarget* **6**, 2524–2538.
- 130 Katzav S (2009) Vav1: a hematopoietic signal transduction molecule involved in human malignancies. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1245–1248.
- 131 Valls G, Codina M, Miller RK, Valle-Pérez BD, Vinyoles M, Caelles C, McCrea PD, de Herreros AG and Duñach M (2012) Rac1 activation upon Wnt stimulation requires Rac1 and Vav2 binding to p120-catenin. *J Cell Sci* **125**, 5288–5301.
- 132 Boudria R, Laurienté V, Oudar A, Harouna-Rachidi S, Dondi E, Le Roy C, Gardano L, Varin-Blank N and Guittat L (2021) Regulatory interplay between Vav1, Syk and  $\beta$ -catenin occurs in lung cancer cells. *Cell Signal* **86**, 110079.
- 133 Lazarian G, Friedrich C, Quinquenel A, Tran J, Ouriemmi S, Dondi E, Martin A, Mihoub I, Chiron D, Bellanger C et al. (2020) Stabilization of  $\beta$ -catenin upon B-cell receptor signaling promotes NF- $\kappa$ B target genes transcription in mantle cell lymphoma. *Oncogene* **39**, 2934–2947.
- 134 Clements WK, Kim AD, Ong KG, Moore JC, Lawson ND and Traver D (2011) A somitic Wnt16/Notch pathway specifies haematopoietic stem cells. *Nature* **474**, 220–224.
- 135 Artavanis-Tsakonas S, Delidakis C, Fehon R, Hartley D, Herndon V, Johansen K, Markopoulou K, Preiss A, Rebay I, Scottgale N et al. (1990) Notch and the molecular genetics of neuroblast segregation in *Drosophila*. *Mol Reprod Dev* **27**, 23–27.
- 136 Fehon RG, Kooh PJ, Rebay I, Regan CL, Xu T, Muskavitch MAT and Artavanis-Tsakonas S (1990) Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* **61**, 523–534.
- 137 Arruga F, Vaisitti T and Deaglio S (2018) The NOTCH pathway and its mutations in mature B cell malignancies. *Front Oncol* **8**, 550.
- 138 Bray SJ (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 678–689.
- 139 Murata A and Hayashi S-I (2016) Notch-mediated cell adhesion. *Biology* **5**, 5.
- 140 Murata A, Okuyama K, Sakano S, Kajiki M, Hirata T, Yagita H, Zúñiga-Pflücker JC, Miyake K, Akashi-Takamura S, Moriwaki S et al. (2010) A Notch ligand, delta-like 1 functions as an adhesion molecule for mast cells. *J Immunol* **185**, 3905–3912.

- 141 Hodkinson PS, Elliott PA, Lad Y, McHugh BJ, MacKinnon AC, Haslett C and Sethi T (2007) Mammalian NOTCH-1 activates  $\beta 1$  integrins via the small GTPase R-Ras. *J Biol Chem* **282**, 28991–29001.
- 142 Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, Grunn A, Fangazio M, Capello D, Monti S *et al.* (2011) Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of *NOTCH1* mutational activation. *J Exp Med* **208**, 1389–1401.
- 143 Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, di Ianni M, Fettucciari K, Bartoli A, Coaccioli S, Serepanti I and Marconi P (2009) Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* **113**, 856–865.
- 144 Arruga F, Gizdic B, Bologna C, Cignetto S, Buonincontri R, Serra S, Vaisitti T, Gizzi K, Vitale N, Garaffo G *et al.* (2017) Mutations in *NOTCH1* PEST domain orchestrate CCL19-driven homing of chronic lymphocytic leukemia cells by modulating the tumor suppressor gene *DUSP22*. *Leukemia* **31**, 1882–1893.
- 145 Mangolini M, Maiques-Diaz A, Charalampopoulou S, Gerhard-Hartmann E, Bloehdorn J, Moore A, Giachetti G, Lu J, Roamio Franklin VN, Chilamakuri CSR *et al.* (2022) Viral transduction of primary human lymphoma B cells reveals mechanisms of NOTCH-mediated immune escape. *Nat Commun* **13**, 6220.
- 146 Paulus A, Malavasi F and Chanan-Khan A (2022) CD38 as a multifaceted immunotherapeutic target in CLL. *Leuk Lymphoma* **63**, 2265–2275.
- 147 Arruga F, Bracciamà V, Vitale N, Vaisitti T, Gizzi K, Yeomans A, Coscia M, D'Arena G, Gaidano G, Allan JN *et al.* (2020) Bidirectional linkage between the B-cell receptor and *NOTCH1* in chronic lymphocytic leukemia and in Richter's syndrome: therapeutic implications. *Leukemia* **34**, 462–477.
- 148 Jitschin R, Braun M, Qorraj M, Saul D, Le Blanc K, Zenz T and Mougiakakos D (2015) Stromal cell-mediated glycolytic switch in CLL cells involves Notch-c-Myc signaling. *Blood* **125**, 3432–3436.
- 149 Mangolini M, Götte F, Moore A, Ammon T, Oelsner M, Lutzny-Geier G, Klein-Hitpass L, Williamson JC, Lehner PJ, Dürig J *et al.* (2018) Notch2 controls non-autonomous Wnt-signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun* **9**, 3839.
- 150 Lin W-H, Cooper LM and Anastasiadis PZ (2023) Cadherins and catenins in cancer: connecting cancer pathways and tumor microenvironment. *Front Cell Dev Biol* **11**, 1137013.
- 151 Niessen CM and Gottardi CJ (2008) Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 562–571.
- 152 Huber AH, Stewart DB, Laurents DV, Nelson WJ and Weis WI (2001) The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of  $\beta$ -catenin: a possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem* **276**, 12301–12309.
- 153 Nusse R and Clevers H (2017) Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell* **169**, 985–999.
- 154 Wang L, Shalek AK, Lawrence M, Ding R, Gaublotte JT, Pochet N, Stojanov P, Sougnez C, Shukla SA, Stevenson KE *et al.* (2014) Somatic mutation as a mechanism of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation in CLL. *Blood* **124**, 1089–1098.
- 155 Avizienyte E and Frame MC (2005) Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 542–547.
- 156 Avizienyte E, Wyke AW, Jones RJ, McLean GW, Westhoff MA, Brunton VG and Frame MC (2002) Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat Cell Biol* **4**, 632–638.
- 157 Bement WM, Goryachev AB, Miller AL and Von Dassow G (2024) Patterning of the cell cortex by rho GTPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **25**, 290–308.
- 158 Wheelock MJ and Johnson KR (2003) Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 509–514.
- 159 Ehrlich JS, Hansen MDH and Nelson WJ (2002) Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and Lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell* **3**, 259–270.
- 160 Kovacs EM, Ali RG, McCormack AJ and Yap AS (2002) E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. *J Biol Chem* **277**, 6708–6718.
- 161 Bustelo XR (2000) Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* **20**, 1461–1477.
- 162 Turner M and Billadeau DD (2002) VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* **2**, 476–486.
- 163 Tybulewicz VLJ, Ardouin L, Prisco A and Reynolds LF (2003) Vav1: a key signal transducer downstream of the TCR. *Immunol Rev* **192**, 42–52.
- 164 Kasiah J and McNeill H (2023) Fat and Dachsous cadherins in mammalian development. *Curr Top Dev Biol* **154**, 223–244.
- 165 Saburi S and McNeill H (2005) Organising cells into tissues: new roles for cell adhesion molecules in planar cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 482–488.
- 166 Devenport D (2014) The cell biology of planar cell polarity. *J Cell Biol* **207**, 171–179.
- 167 Kaucka M, Plevová K, Pavlová S, Janovská P, Mishra A, Verner J, Procházková J, Krejčí P, Kotásková J, Ovesná P *et al.* (2013) The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic

- leukemia by the regulation of B-lymphocyte migration. *Cancer Res* **73**, 1491–1501.
- 168 Yu J, Chen L, Cui B, Widhopf GF II, Shen Z, Wu R, Zhang L, Zhang S, Briggs SP and Kipps TJ (2015) Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *J Clin Invest* **126**, 585–598.
- 169 Hasan MK, Rassenti L, Widhopf GF, Yu J and Kipps TJ (2019) Wnt5a causes ROR1 to complex and activate cortactin to enhance migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **33**, 653–661.
- 170 Yu J, Chen L, Cui B, Wu C, Choi MY, Chen Y, Zhang L, Rassenti LZ, Widhopf GF II and Kipps TJ (2017) Cirmtuzumab inhibits Wnt5a-induced Rac1 activation in chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib. *Leukemia* **31**, 1333–1339.
- 171 Hasan MK, Yu J, Chen L, Cui B, Widhopf GF II, Rassenti L, Shen Z, Briggs SP and Kipps TJ (2017) Wnt5a induces ROR1 to complex with HS1 to enhance migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **31**, 2615–2622.
- 172 Ghia EM, Rassenti LZ, Choi MY, Quijada-Álamo M, Chu E, Widhopf GF II and Kipps TJ (2022) High expression level of ROR1 and ROR1-signaling associates with venetoclax resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **36**, 1609–1618.
- 173 Blombery P (2020) Mechanisms of intrinsic and acquired resistance to venetoclax in B-cell lymphoproliferative disease. *Leuk Lymphoma* **61**, 257–262.
- 174 Timofeeva N and Gandhi V (2021) Ibrutinib combinations in CLL therapy: scientific rationale and clinical results. *Blood Cancer J* **11**, 79.
- 175 Chang BY, Francesco M, de Rooij MFM, Magadala P, Steggerda SM, Huang MM, Kuil A, Herman SEM, Chang S, Pals ST et al. (2013) Egress of CD19+CD5+ cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients. *Blood* **122**, 2412–2424.
- 176 Koehrer S and Burger JA (2024) Chronic lymphocytic leukemia: disease biology. *Acta Haematol* **147**, 8–21.
- 177 Burger JA (2019) Bruton tyrosine kinase inhibitors: present and future. *Cancer J* **25**, 386–393.
- 178 Duchartre Y, Bachi S, Kim HN, Gang EJ, Lee S, Liu HC, Shung K, Xu R, Kruse A, Tachas G et al. (2017) Effects of CD49d-targeted antisense-oligonucleotide on  $\alpha 4$  integrin expression and function of acute lymphoblastic leukemia cells: results of in vitro and in vivo studies. *PLoS One* **12**, e0187684.
- 179 Yu J, Chen Y, Chen L, Zhang L, Rassenti LZ, Widhopf GF II and Kipps TJ (2018) Cirmtuzumab inhibits ibrutinib-resistant, Wnt5a-induced Rac1 activation and proliferation in mantle cell lymphoma. *Oncotarget* **9**, 24731–24736.
- 180 Ioannou N, Jain K and Ramsay AG (2021) Immunomodulatory drugs for the treatment of B cell malignancies. *Int J Mol Sci* **22**, 8572.
- 181 Wobus M, Benath G, Ferrer RA, Wehner R, Schmitz M, Hofbauer LC, Rauner M, Ehninger G, Bornhäuser M and Platzbecker U (2012) Impact of lenalidomide on the functional properties of human mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol* **40**, 867–876.