



HAL
open science

Évaluation préclinique de l'effet de l'Angiopoïétine-2, un facteur angiogénique immunomodulateur, sur la progression du glioblastome et sa réponse à la radiochimiothérapie

Charly Helaine

► **To cite this version:**

Charly Helaine. Évaluation préclinique de l'effet de l'Angiopoïétine-2, un facteur angiogénique immunomodulateur, sur la progression du glioblastome et sa réponse à la radiochimiothérapie. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMC420 . tel-03103765

HAL Id: tel-03103765

<https://theses.hal.science/tel-03103765>

Submitted on 8 Jan 2021

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

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



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Evaluation préclinique de l'effet de l'Angiopoïétine-2, un facteur angiogénique immunomodulateur, sur la progression du glioblastome et sa réponse à la radiochimiothérapie

**Présentée et soutenue par
Charly HELAINE**

**Thèse soutenue publiquement le 24/11/2020
devant le jury composé de**

Mme JULIE GAVARD	Directeur de recherche, INSERM	Rapporteur du jury
M. FRANÇOIS PARIS	Directeur de recherche, INSERM	Rapporteur du jury
Mme ELODIE PERES	Ingénieur de recherche, Université Caen Normandie	Membre du jury
Mme AURELIE TCHOHANDJIAN-AUPHAN	Chargé de recherche au CNRS, Aix-Marseille Université	Membre du jury
M. SAMUEL VALABLE	Directeur de recherche, Université Caen Normandie	Président du jury
Mme EDWIGE PETIT	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par EDWIGE PETIT, Imagerie et Stratégie Thérapeutiques de Pathologies Cérébrales et Tumorales



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



IMAGERIE & STRATÉGIES
THÉRAPEUTIQUES DES PATHOLOGIES
CÉRÉBRALES & TUMORALES

Table des matières

Table des matières

TABLE DES MATIERES I

LISTE DES FIGURES X

LISTE DES TABLEAUX XIV

LISTE DES ABREVIATIONS XV

AVANT PROPOS1

INTRODUCTION.....3

PARTIE 1 : LES GLIOBLASTOMES3

I. LES GLIOMES3

I.1 ÉPIDÉMIOLOGIE.....3

I.2 CLASSIFICATION DES GLIOMES4

I.2.1 CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE4

I.2.2 CLASSIFICATION DE L'HOPITAL SAINT-ANNE.....5

II. LES GLIOBLASTOMES6

II.1 ÉPIDEMIOLOGIE.....6

II.2 CARACTERISTIQUES HISTOLOGIQUES DES GLIOBLASTOMES.....7

II.3 CARACTERISTIQUES GENOMIQUES ET MOLECULAIRES DES GLIOBLASTOMES.....8

II.3.1 LES MUTATIONS IDH.....8

II.3.2 AUTRES MUTATIONS RETROUVEES DANS LES GLIOBLASTOMES.....10

II.3.3 L'HYPERMETHYLATION DU PROMOTEUR MGMT11

II.4 CLASSIFICATIONS ET CARACTERISTIQUES TRANSCRIPTOMIQUES DES GLIOBLASTOMES12

II.5 ORIGINE ET HETEROGENEITE DES CELLULES DE GLIOBLASTOME : LE ROLE DES CSC ?.....14

III. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES GLIOBLASTOMES16

III.1 LA CHIRURGIE.....16

III.2	LA RADIOTHERAPIE DES GLIOBLASTOMES	17
III.2.1	PRINCIPE DE LA RADIOTHERAPIE	17
III.2.2	EFFETS BIOLOGIQUES DE LA RADIOTHERAPIE	18
III.2.3	EFFET OXYGENE DE LA RADIOTHERAPIE	19
III.2.4	REPONSES CELLULAIRES AUX DOMMAGES RADIO-INDUITS	20
III.2.4.1	SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DES DOMMAGES A L'ADN	20
III.2.4.2	CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE.....	22
III.2.4.3	SYSTEMES DE REPARATION DES DOMMAGES A L'ADN	23
III.2.4.4	PROCESSUS DE MORTS CELLULAIRES APRES RADIOTHERAPIE.....	23
III.3	LA CHIMIOTHERAPIE	30
III.3.1	PRINCIPE D'ACTION DU TEMOZOLOMIDE	30
III.3.2	REPARATION DES DOMMAGES INDUITS PAR LE TEMOZOLOMIDE	31
III.3.3	PROCESSUS DE MORTS CELLULAIRES APRES TRAITEMENT AU TEMOZOLOMIDE	31
III.4	LE PROTOCOLE STUPP	32
<u>PARTIE 2 : L'HYPOXIE.....</u>		35
I.	<u>DEFINITION.....</u>	35
II.	<u>L'HYPOXIE : UN FACTEUR PREPONDERANT DANS LES GLIOBLASTOMES</u>	37
II.1	MISE EN EVIDENCE DE L'HYPOXIE DANS LES GLIOBLASTOMES	37
II.2	L'HYPOXIE, UN MARQUEUR DIAGNOSTIC DES GLIOBLASTOMES	38
II.3	ADAPTATION DES CELLULES TUMORALES A L'HYPOXIE.....	38
II.3.1	LES REPONSES A L'HYPOXIE A L'ECHELLE MOLECULAIRE.....	38
II.3.1.1	LES FACTEURS HIFs.....	38
II.3.1.2	REGULATION DES HIFs.....	40
II.3.1.3	LES GENES CIBLES DES HIFs.....	41
II.3.2	LES REPONSES A L'HYPOXIE A L'ECHELLE CELLULAIRE	42
II.3.2.1	EFFETS DE L'HYPOXIE SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES TUMORALES	42
II.3.2.2	EFFETS DE L'HYPOXIE SUR LE METABOLISME DES CELLULES TUMORALES.....	42
II.3.2.3	EFFETS DE L'HYPOXIE SUR L'INVASION DES CELLULES TUMORALES	44
II.3.3	L'HYPOXIE ET CELLULES SOUCHES	46
II.3.3.1	NOTION DE NICHE TUMORALE	46
<u>PARTIE 3 : LE COMPARTIMENT VASCULAIRE</u>		49

I. L'ANGIOGENESE PHYSIOLOGIQUE	49
I.1 FONCTION ET STRUCTURE DU COMPARTIMENT VASCULAIRE.....	49
I.2 FORMATION DES VAISSEAUX	51
I.2.1 LA VASCULOGENESE	51
I.2.2 L'ANGIOGENESE	52
I.2.2.1 L'ANGIOGENESE INTUSSUSCEPTIVE	53
I.2.2.2 L'ANGIOGENESE BOURGEONNANTE.....	53
I.2.2.3 MATURATION DU RESEAU VASCULAIRE	57
I.2.3 REMODELAGE VASCULAIRE	59
I.2.4 LE CONCEPT DE SWITCH ANGIOGENIQUE	60
I.3 LA FAMILLE DU VEGF ET SES RECEPTEURS	61
I.3.1 LE VEGF	61
I.3.2 REGULATION D'EXPRESSION DU VEGF	62
I.3.3 LES RECEPTEURS AU VEGF	62
I.3.4 LA SIGNALISATION VEGF/VEGF-R.....	64
I.4 EFFETS BIOLOGIQUES DU VEGF ET VOIES DE SIGNALISATION.....	64
I.5 LES ANGIOPOÏETINES ET LEURS RECEPTEURS	67
I.5.1 LES ANGIOPOÏETINES.....	67
I.5.2 EXPRESSION CELLULAIRE DES ANGIOPOÏETINES	68
I.5.3 REGULATION D'EXPRESSION DES ANGIOPOÏETINES	69
I.6 LES RECEPTEURS AUX ANGIOPOÏETINES	70
I.6.1 LE RECEPTEUR TIE-2.....	70
I.6.2 LA SIGNALISATION DU SYSTEME ANG/TIE.....	71
I.6.3 ANG-1 ET ANG-2 : DEUX LIGANDS POUR UN MEME RECEPTEUR	72
I.6.4 EFFETS BIOLOGIQUES DE L'ANG-1	72
I.6.5 EFFETS BIOLOGIQUES DE L'ANG-2	74
I.6.6 TIE-1, UN PARTENAIRE DE TIE-2 ?	76
I.6.7 LES INTEGRINES : RECEPTEURS ALTERNATIFS AUX ANGIOPOÏETINES	77
I.7 LES SYSTEMES ANGIOPOÏETINES/TIE ET VEGF/VEGF-R : UNE ACTION COORDONNEE DE L'ANGIOGENESE	78
II. L'ANGIOGENESE TUMORALE	80
II.1 CROISSANCE TUMORALE ET DEPENDANCE ANGIOGENIQUE.....	80
II.2 SWITCH ANGIOGENIQUE ET TUMEUR.....	80

II.3	LES VAISSEAUX TUMORAUX.....	82
II.3.1	PROCESSUS MIS EN JEU POUR ASSURER LA VASCULARISATION TUMORALE.....	82
II.3.2	CARACTERISTIQUES DU RESEAU VASCULAIRE TUMORAL	84
II.4	L'ANGIOGENESE DANS LES GLIOBLASTOMES.....	84
II.4.1	GENERALITES.....	84
II.4.2	STRUCTURE DES VAISSEAUX TUMORAUX DANS LES GLIOBLASTOMES	86
II.5	LE SWITCH ANGIOGENIQUE : L'HYPOXIE ET LES FACTEURS PRO-ANGIOGENIQUES, UN DUO INDISSOCIABLE	87
II.5.1	EXPRESSION DU VEGF ET DE SES RECEPTEURS DANS LES GLIOBLASTOMES.....	88
II.5.2	EXPRESSION DES ANGIOPOÏETINES ET DU RECEPTEUR TIE-2 DANS LES GLIOBLASTOMES.....	89
II.5.2.1	EXPRESSION DE L'ANG-2 DANS LES GLIOBLASTOMES.....	90
II.5.2.2	EXPRESSION DE TIE-2 DANS LES GLIOBLASTOMES	91
II.5.3	LES ANGIOPOÏETINES : QUELLES IMPLICATIONS DANS LES GLIOBLASTOMES ?	91
III.	<u>LE COMPARTIMENT VASCULAIRE DES GLIOBLASTOMES : EFFET DE LA RADIOCHIMIOTHERAPIE</u>	94
III.1	EFFET DE LA RADIOTHERAPIE SUR LE COMPARTIMENT VASCULAIRE	94
III.1.1	REPONSE A L'IRRADIATION, DOSE UNIQUE.....	94
III.1.1.1	REPONSES CELLULAIRES.....	94
III.1.1.2	ALTERATIONS STRUCTURELLES ET HEMODYNAMIQUES DES VAISSEAUX	95
III.1.2	REPONSE A L'IRRADIATION, DOSE FRACTIONNEE	96
III.1.2.1	REPONSES CELLULAIRES.....	96
III.1.2.2	ATTEINTES STRUCTURELLES ET HEMODYNAMIQUES DES VAISSEAUX	97
III.2	EFFET DE LA CHIMIOTHERAPIE (TMZ) SUR LE COMPARTIMENT VASCULAIRE	98
IV.	<u>LA VASCULARISATION TUMORALE : UNE NOUVELLE CIBLE DE TRAITEMENT</u>	99
IV.1	LES THERAPIES ANTI-ANGIOGENIQUES.....	99
IV.1.1	STRATEGIES ANTI-ANGIOGENIQUES CIBLANT LA SIGNALISATION VEGF/VEGF-R	100
IV.1.1.1	LES ANTI-VEGF : LE BEVACIZUMAB.....	100
IV.1.1.2	LES ANTI-VEGF-R : L'AFLIBERCEPT	101
IV.1.1.3	LES INHIBITEURS D'ACTIVITE TYROSINE KINASE : LE SUNITIB ET LE CEDIRANIB	102
IV.1.2	CONCEPT DE NORMALISATION VASCULAIRE	102
IV.1.3	LA RESISTANCE AUX TAA.....	105
IV.2	STRATEGIES ANTI-ANGIOGENIQUES CIBLANT LA SIGNALISATION ANGIOPOÏETINES/TIE	107

<u>PARTIE 4 : LE COMPARTIMENT INFLAMMATOIRE</u>	<u>109</u>
<u>I. INFLAMMATION ET TUMEUR</u>	<u>109</u>
I.1 GENERALITES SUR L'INFLAMMATION.....	109
I.2 INFLAMMATION ET TUMEUR : L'ECHAPPEMENT TUMORAL.....	109
<u>II. INFLAMMATION ET GLIOBLASTOME</u>	<u>111</u>
II.1 LE RECRUTEMENT DES CELLULES INFLAMMATOIRES.	112
II.1.1 VIA LES CELLULES TUMORALES	112
II.1.2 VIA LA VASCULARISATION	113
II.1.3 VIA L'HYPOXIE.....	114
<u>III. LES CELLULES IMMUNITAIRES AU SEIN DES GLIOBLASTOMES.....</u>	<u>115</u>
III.1 LA MICROGLIE/LES MACROPHAGES.....	115
III.1.1 LA MICROGLIE.....	115
III.1.2 LES MACROPHAGES.....	117
III.2 LES LYMPHOCYTES.....	119
III.2.1 GENERALITES SUR LES LYMPHOCYTES T	119
III.2.2 LYMPHOCYTES T DANS LES GLIOBLASTOMES.....	121
III.2.2.1 LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS.....	122
<u>IV. LE GLIOBLASTOME, UN ENVIRONNEMENT IMMUNOSUPPRESSEUR</u>	<u>122</u>
IV.1 INFLUENCE DES CELLULES MYELOÏDES SUPPRESSIVES	122
IV.2 INFLUENCE DES CELLULES DENDRITIQUES	123
IV.3 INFLUENCE DES <i>NATURAL KILLER</i>	124
IV.4 INFLUENCE DE L'HYPOXIE.....	124
IV.5 AUTRES MECANISMES IMMUNOTOLERANTS	124
<u>V. LES TAMS DANS LES GLIOBLASTOMES</u>	<u>125</u>
V.1 POLARISATION DES TAMS : LES GLIOBLASTOMES, UN ENVIRONNEMENT FAVORABLE AU PHENOTYPE M2....	126
V.2 CONTRIBUTION DES TAMS DANS LA CROISSANCE DES GLIOBLASTOMES	127
<u>VI. LE COMPARTIMENT INFLAMMATOIRE DES GLIOBLASTOMES : EFFET DE LA RADIOCHIMIOThERAPIE.....</u>	<u>133</u>

VI.1	EFFET DE LA RADIOTHERAPIE SUR LE COMPARTIMENT INFLAMMATOIRE	133
VI.1.1	MACROPHAGES ET RADIOTHERAPIE	133
VI.1.2	LYMPHOCYTES ET RADIOTHERAPIE	135
VI.2	EFFET DE LA CHIMIOOTHERAPIE SUR LE COMPARTIMENT INFLAMMATOIRE.....	135
VI.2.1	MACROPHAGES ET TEMOZOLOMIDE	135
VI.2.2	LYMPHOCYTES ET TEMOZOLOMIDE	135
VII.	<u>L'INFLAMMATION Tumorale : une nouvelle cible de traitement</u>	136
VII.1	L'IMMUNOTHERAPIE PASSIVE.....	136
VII.2	L'IMMUNOTHERAPIE ACTIVE	137
VII.2.1	IMMUNOTHERAPIES CIBLANT LES MACROPHAGES.....	139
	<u>OBJECTIFS</u>	141
	<u>MATERIELS ET METHODES.....</u>	143
I.	<u>METHODOLOGIE <i>IN VITRO</i></u>	143
I.1	CULTURE CELLULAIRE	143
I.1.1	CULTURE DE LA LIGNEE CELLULAIRE DE GLIOBLASTOME MURIN GL261	143
I.1.2	TRANSFECTION STABLE DES CELLULES Tumorales GL261 EXPRIMANT L'ANG-2.....	143
I.1.3	CULTURE DE LA LIGNEE CELLULAIRE ENDOTHELIALE BEND.3.....	144
I.1.4	CULTURE DE LA LIGNEE CELLULAIRE DE MACROPHAGES RAW 264.7	144
I.2	TRAITEMENTS DES CELLULES.....	144
I.2.1	IRRADIATION PAR RAYONS X.....	144
I.2.2	TRAITEMENT DE CHIMIOOTHERAPIE AU TEMOZOLOMIDE	144
I.2.3	PROTOCOLE DE RADIOCHIMIOOTHERAPIE	145
I.3	ÉTUDE DE LA REponse AUX TRAITEMENTS.....	145
I.3.1	TEST DE CLONOGENICITE	145
I.3.2	ANALYSE DE LA COURBE DE SURVIE	146
I.3.3	ÉTUDE DE LA VIABILITE CELLULAIRE	147
I.3.3.1	COMPTAGE CELLULAIRE.....	147
I.3.3.2	MESURE DE CONFLUENCE	147
I.3.4	ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE PAR CYTOMETRIE DE FLUX.....	148
I.3.5	TEST DE LA SENESCENCE SA-β-GALACTOSIDASE	149

I.3.6	ÉTUDE DE LA MIGRATION DES MACROPHAGES.....	149
II.	<u>METHODOLOGIE <i>IN VIVO</i></u>	149
II.1	BIEN ETRE ANIMAL.....	149
II.2	MODELE ORTHOTOPIQUE DE GLIOBLASTOME MURIN.....	150
II.3	ÉTUDE LONGITUDINALE DE LA CROISSANCE TUMORALE PAR IRM.....	151
II.4	MESURE DU VOLUME SANGUIN CEREBRAL.....	151
II.5	TRAITEMENTS DES ANIMAUX.....	152
II.5.1	ADMINISTRATION DE TEMOZOLOMIDE.....	152
II.5.2	IRRADIATION CEREbraLE DES ANIMAUX PAR RAYONS-X.....	152
II.5.3	PROTOCOLE DE RADIOCHIMIOThERAPIE.....	153
II.6	PRELEVEMENT DES CERVEAUX.....	153
III.	<u>EXPERIMENTATION <i>EX VIVO</i></u>	153
III.1	COUPES HISTOLOGIQUES.....	153
III.2	ISOLATION DES LEUCOCYTES POUR UNE ANALYSE AU CYTOMETRE DE FLUX.....	154
III.2.1	ISOLATION DES CELLULES A PARTIR DU SANG PERIPHERIQUE.....	154
III.2.2	ISOLATION DES CELLULES DE LA RATE.....	154
III.2.3	IMMUNOMARQUAGE ET ACQUISITION.....	154
IV.	<u>METHODOLOGIE GENERALE</u>	155
IV.1	ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE PAR QRT-PCR.....	155
IV.1.1	EXTRACTION D'ARN CELLULAIRE.....	155
IV.1.2	TRANSCRIPTION INVERSE.....	155
IV.1.3	PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL.....	156
IV.2	ANALYSE PROTEIQUE.....	156
IV.2.1	TEST ELISA.....	156
IV.3	IMMUNOCYTOFLUORESCENCE.....	157
IV.4	IMMUNOHISTOFLUORESCENCE.....	157
V.	<u>TRAITEMENT DE DONNEES</u>	158
V.1	ACQUISITION ET ANALYSES D'IMAGES.....	158
V.2	ANALYSES STATISTIQUES.....	159

RESULTATS.....	160
<u>I. ÉTUDE DE L'EFFET D'UNE SUREXPRESSION D'ANG-2 SUR LE MODELE SYNGENIQUE DE GLIOBLASTOME MURIN, GL261.....</u>	<u>160</u>
I.1 CARACTERISATION DU MODELE SYNGENIQUE DE GLIOBLASTOME MURIN, GL261.....	160
I.2 VALIDATION ET CARACTERISATION DE LA SUREXPRESSION DE L'ANG-2 DANS LES CELLULES GL261	162
I.3 ÉTUDE DE LA SUREXPRESSION DE L'ANG-2 SUR LA CROISSANCE TUMORALE.....	163
I.3.1 ÉTUDE <i>IN VIVO</i>	163
I.3.2 ÉTUDE <i>IN VITRO</i>	165
I.4 ÉTUDE DE LA SUREXPRESSION DE L'ANG-2 SUR LE COMPARTIMENT VASCULAIRE	167
I.4.1 ANALYSE DE VASCULARISATION TUMORALE PAR IMMUNOHISTOLOGIQUE	167
I.4.1.1 ÉTUDE DESCRIPTIVE DE LA VASCULARISATION TUMORALE.....	167
I.4.1.2 ÉTUDE QUANTITATIVE DE LA VASCULARISATION TUMORALE.....	167
I.4.2 ANALYSE DE LA VASCULARISATION TUMORALE PAR IRM.....	169
I.5 ÉTUDE DE LA SUREXPRESSION DE L'ANG-2 SUR LE COMPARTIMENT INFLAMMATOIRE.....	172
I.6 CONCLUSION/DISCUSSION	176
<u>II. EFFET DE LA RADIOCHIMIOThERAPIE SUR LE MODELE DE GLIOBLASTOME GL261.....</u>	<u>181</u>
II.1 ÉVALUATION <i>IN VITRO</i> DE LA CYTOTOXICITE DE LA RADIOCHIMIOThERAPIE SUR LE MODELE DE GLIOBLASTOME GL261	181
II.2 ÉVALUATION <i>IN VIVO</i> DES EFFETS DE LA RADIOCHIMIOThERAPIE SUR LE MODELE DE GLIOBLASTOME GL261	185
II.2.1 VALIDATION DU PROTOCOLE DE RADIOCHIMIOThERAPIE.....	185
II.2.2 ÉTUDE DES EFFETS DE LA RADIOCHIMIOThERAPIE SUR LA PROGRESSION TUMORALE	186
II.2.3 EFFETS DE LA RADIOCHIMIOThERAPIE SUR LE COMPARTIMENT VASCULAIRE.....	189
II.3 CONCLUSION/DISCUSSION	192
<u>III. ÉTUDE DE L'EFFET D'UNE SUREXPRESSION D'ANG-2 SUR LE MODELE SYNGENIQUE DE GLIOBLASTOME MURIN, GL261 EXPOSE A UN PROTOCOLE DE RADIOCHIMIOThERAPIE</u>	<u>197</u>
III.1 AVANT-PROPOS DE L'ARTICLE SOUMIS A CANCERS.....	197
III.2 EFFET DE LA RADIOCHIMIOThERAPIE SUR L'EXPRESSION DE L'ANG-2 DANS LES CELLULES GL261.....	198
III.3 ARTICLE	200
III.4 RESULTATS COMPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE	241
III.4.1 ÉVOLUTION DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL DURANT LA RADIOCHIMIOThERAPIE	241

Tables des matières

III.4.1.1	ÉVOLUTION DE LA REPOSE INFLAMMATOIRE.....	241
III.4.1.2	ÉVOLUTION DE LA VASCULARISATION.....	241
III.4.2	ÉTUDE <i>IN VITRO</i> DE L'EFFET DE L'ANG-2 COMBINÉE A LA RADIOCHIMIOThERAPIE SUR LES CELLULES ENDOTHELIALES BÉND.3	242
III.4.2.1	ÉTUDE DU CYCLE CELLULAIRE EN REPOSE AU TRAITEMENT COMBINANT L'ANG-2 A LA RADIOCHIMIOThERAPIE	243
III.4.2.2	ÉTUDE DE LA SENESCENCE EN REPOSE AU TRAITEMENT COMBINANT L'ANG-2 A LA RADIOCHIMIOThERAPIE	244
III.5	CONCLUSION/DISCUSSION	246
	<u>DISCUSSION GENERALE.....</u>	252
	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	256
	<u>ANNEXE 1 : LEBLOND ET AL., 2017.....</u>	XVIII
	<u>ANNEXE 2 : GOLDYN ET AL., 2019</u>	XXXV
	<u>ANNEXE 3 : ANFRAY ET AL., 2020</u>	XLII
	<u>ANNEXE IV : CURRICULUM VITAE</u>	LIV

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1 : Répartitions des tumeurs primitives du système nerveux central.....	3
Figure 2 : Classification des gliomes de l'hôpital Saint-Anne	5
Figure 3 : Données épidémiologiques des glioblastomes en France.....	6
Figure 4 : Représentation de l'hétérogénéité morphologique des cellules de glioblastome	7
Figure 5 : Caractéristiques histologiques des glioblastomes	7
Figure 6 : Implications des mutations IDH dans les glioblastomes.....	9
Figure 7 : Principales altérations géniques retrouvées dans les glioblastomes	10
Figure 8 : Classification transcriptomique des glioblastomes	13
Figure 9 : Représentation du modèle hiérarchique d'hétérogénéité tumorale.....	15
Figure 10 : Exérèse tumorale guidée par fluorescence	16
Figure 11 : Modalités de traitement par radiothérapie.....	17
Figure 12 : Réponses biologiques de la cellules aux rayonnements ionisants.....	19
Figure 13 : Représentation des voies de transduction des dommages à l'ADN.....	21
Figure 14 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de la sénescence SASP	25
Figure 15 : Représentation des principales voies apoptotiques induites par les rayonnements ionisants	27
Figure 16 : Bcl-2, un médiateur entre l'autophagie et l'apoptose	29
Figure 17 : Processus de méthylation de l'ADN par le témozolomide	30
Figure 18 : Protocole Stupp.....	33
Figure 19 : Mise en place du gradient d'oxygène au cours du développement tumoral	35
Figure 20 : La vascularisation tumorale, un frein à l'oxygénation.....	36
Figure 21 : Mise en évidence de l'hypoxie par tomographie par émission de positons.....	38
Figure 22 : Structure des isoformes HIF- α et HIF- β	39
Figure 23 : Régulation des protéines HIFs.....	40
Figure 24 : Représentation de quelques processus biologiques régulés par HIF-1 et HIF-2.....	41
Figure 25 : Métabolisme des cellules tumorales.....	43
Figure 26 : Effets de l'hypoxie sur le pH.....	44
Figure 27 : Représentation des différentes voies de migration des cellules tumorales.....	45
Figure 28 : Représentation des différentes niches des cellules souches cancéreuses.....	48
Figure 29 : Représentation de la structure des vaisseaux sanguins.....	49
Figure 30 : Représentation des différents types de capillaires	50
Figure 31 : Représentation de l'endothélium cérébral et ses particularités.....	51

Liste des figures

Figure 32 : Formation des vaisseaux sanguins par vasculogénèse.....	52
Figure 33 : Processus d'angiogénèse intussusceptive	53
Figure 34 : Processus d'angiogénèse bourgeonnante	53
Figure 35 : Sélection de la cellule endothéliale tip.....	55
Figure 36 : Migration et élongation du bourgeon vasculaire.....	57
Figure 37 : Stabilisation du néo-vaisseau.....	59
Figure 38 : Le switch angiogénique	60
Figure 39 : Expression cellulaire des récepteurs au VEGF et leurs ligands	63
Figure 40 : Signalisation intracellulaire du VEGF-R2.....	66
Figure 41 : Structure des Angiopoïétines.....	68
Figure 42 : Représentation de la structure des récepteurs Tie.....	70
Figure 43 : Signalisation intracellulaire des récepteurs Tie	74
Figure 44 : Implication de la protéine VEPTP dans la signalisation du récepteur Tie-2.....	76
Figure 45 : Action synergique des Angiopoïétines et du VEGF dans l'angiogénèse	79
Figure 46 : Représentation de l'angiogénèse tumorale.....	81
Figure 47 : Représentation des différents modes de formation des vaisseaux tumoraux	83
Figure 48 : La vascularisation dans les glioblastomes.....	85
Figure 49 : Caractéristiques des vaisseaux dans les glioblastomes	87
Figure 50 : Expression du système VEGF/VEGF-R dans les glioblastomes.....	88
Figure 51 : Expression de l'Ang-2 dans les glioblastomes.....	90
Figure 52 : Représentation schématique des effets de l'irradiation à dose unique.....	96
Figure 53 : Représentation schématique des effets de l'irradiation fractionnée	98
Figure 54 : Représentation des différents inhibiteurs du système VEGF/VEGF-R	100
Figure 55 : Concept de normalisation vasculaire	103
Figure 56 : Imagerie d'un patient porteur de glioblastome et répondant au traitement anti-angiogénique.....	104
Figure 57 : Représentation de mode de résistance aux thérapies anti-angiogéniques	106
Figure 58 : Concept d'immunoediting	111
Figure 59 : Représentation schématique de la proportion des cellules inflammatoires retrouvées dans les glioblastomes	112
Figure 60 : Représentation de l'infiltration leucocytaire à travers l'endothélium	114
Figure 61 : Aspect morphologique de la microglie.....	116
Figure 62 : Représentation du continuum de polarisation des macrophages	118
Figure 63 : Représentation de l'activation lymphocytaire et des « immune checkpoints »	120

Liste des figures

Figure 64 : Distribution des lymphocytes CD4 et CD8 selon le sous-type de glioblastome.....	121
Figure 65 : Macrophages et glioblastomes	126
Figure 66 : Influence de l'hypoxie sur le phénotype des macrophages.....	127
Figure 67 : Contribution des macrophages M2 dans la progression tumorale.....	129
Figure 68 : Le VEGF et l'Ang-2, des modulateurs clés dans la croissance tumorale	132
Figure 69 : Protocoles de radiochimiothérapie in vitro	145
Figure 70 : Courbe de survie attendue après irradiation aux rayons X suivant l'équation linéaire quadratique	147
Figure 71 : Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux	148
Figure 72 : Coordonnées d'injection des cellules tumorales chez la souris C57BL/6	150
Figure 73 : Détermination de la zone d'irradiation ciblant la tumeur cérébrale suite à un scanner chez la souris.	153
Figure 74 : Traitement des immunohistologies de l'anticorps anti-CD31.	159
Figure 75 : Caractérisation du modèle syngénique et orthotopique de GB murin GL261	160
Figure 76 : Caractérisation des tumeurs par IRM.....	161
Figure 77 : Caractérisation de la surexpression d'Ang-2 par les cellules GL261	163
Figure 78 : Étude de l'effet d'une surexpression de l'Ang-2 sur la croissance tumorale.....	164
Figure 79 : Étude de l'effet autocrine de l'Ang-2 sur les cellules tumorales.....	165
Figure 80 : Détection par immunohistofluorescence du récepteur Tie-2 dans les tumeurs GL261 ...	166
Figure 81 : Analyses immunohistologiques de l'effet d'une surexpression de l'Ang2 sur la vascularisation des tumeurs GL261	169
Figure 82 : Étude de la vascularisation tumorale par IRM	170
Figure 83 : Détection par immunohistologie des régions tumorales hypoxiques, 18 jours après l'implantation des cellules tumorales.....	172
Figure 84 : Analyses immunohistologiques de l'effet d'une surexpression de l'Ang2 sur l'inflammation macrophagique des tumeurs GL261	174
Figure 85 : Analyses immunohistologiques de l'effet d'une surexpression de l'Ang-2 sur la microglie dans les tumeurs GL261	175
Figure 86 : Schéma synthétique de l'effet d'une surexpression de l'Ang-2 dans les tumeurs GL261 au temps terminal	176
Figure 87 : Étude de la chimio- et radiosensibilité des cellules tumorales GL261-wt	182
Figure 88 : Analyse du cycle cellulaire des cellules GL261-wt exposée à la chimiothérapie, la radiothérapie et la radiochimiothérapie.....	184

Figure 89 : Étude préliminaire des effets de la radiochimiothérapie fractionnée sur le modèle GL261	186
Figure 90 : Étude de l'effet des différents traitements sur la croissance tumorale	188
Figure 91 : Analyses immunohistologiques de l'effet des différents traitements sur la vascularisation tumorale.....	190
Figure 92 : Étude de la chimio- et radiosensibilité des cellules endothéliales bEnd.3	191
Figure 93 : Étude de l'effet de la radiochimiothérapie sur l'expression de l'Ang-2	198
Figure 94 : Effets d'une surexpression d'Ang-2 sur l'environnement tumorale après radiochimiothérapie	242
Figure 95 : Effet de l'Ang-2 sur la réponse des cellules endothéliales à la radiochimiothérapie.....	245
Figure 96 : Schéma de conclusion des effets d'une surexpression d'Ang-2 associée à une radiochimiothérapie sur le modèle de GB GL261.....	251
Figure 97 : Making immune "Cold" tumors "Hot"	252

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des gliomes selon les critères anatomopathologiques de l’OMS.....4

Tableau 2 : Anticorps utilisés en cytométrie de flux155

Tableau 3 : Amorces utilisées en RT-qPCR.....156

Tableau 4 : Anticorps primaires utilisés en immunocytofluorescence.....157

Tableau 5 : Anticorps primaires utilisés en immunohistofluorescence in viv.....158

Liste des abréviations

Liste des abréviations

O

[¹⁸F]-FMISO : [¹⁸F]-Fluoromisonidazole
2-HG : 2-hydroxyglutarate
3-MA : 3-methyladenine
5-ALA : 5-acide amino-lévilinique

A

ABC : ATP binding cassette
ABTAA : Ang2-Binding and Tie2-Activating Antibody
ADM : Adrenomedullin
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AIC : Aminoimidazole-4-carboxamide
Ang : Angiopoïétine
Angptl : Angiopoïetin-like protein
Arg : Arginase
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ARNT : Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
aSMase : Acid sphingomyelinase
Atg : Autophagy-related protein
ATM : Ataxia telangiectasia mutated
ATP : Adenosine triphosphate
ATR : ATM-and Rad3-related

B

Bad : Bcl-2 associated agonist of cell death
Bax : Bcl-2 associated X protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma-2
bEnd.3 : Brain-derived endothelial cell.3
BER : Base excision repair
bFGF : Basic fibroblast growth factor
BHE : Barrière hémato-encéphalique
bHLH : Basic helix loop helix
BSA : Bovine serum albumine
BVZ : Bevacizumab

C

CAIX : Anhydrase carbonique-IX
CAF : Cancer-associated fibroblast
CAR-T cell : Chimeric antigen receptor T-cell
Cdc25 : Cell division cycle 25
CDK : Cyclin-dependant kinase
CDKI : Cyclin-dependant kinase inhibitor
CDKN2A : Cyclin dependant kinase inhibitor 2A
Chk : Checkpoint kinase
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CSC : Cellule souche cancéreuse
CSF : Colony stimulating factor
CSG : Cellule souche de gliome
CSM : Cellule souche mésenchymateuse
CSN : Cellule souche neurale
Ct : Cycle threshold
CT : Chimiothérapie
CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte antigen-4

D

D₃₇ ou D₀ : Dose létale moyenne
DAMP : Damage-associated molecular pattern
DLL-4 : Delta like-4
DMSO : dimethyl sulfoxide
DNA-PK : DNA-dependent protein kinase
dNTP : Désoxyribonucléotide
DO : densité optique

E

EGF : Epidermal growth factor
EGF-R : Epidermal growth factor receptor
eNOS : Endothelial nitric oxide synthase
EPO : Erythropoietin
ETS : Epithelium-specific ESE

F

FAK : Focal adhesion kinase
FDA : Food and drug administration
FLAIR : Fluid attenuated inversion recovery
FLASH : Fast low angle shot
Flt : Fms-related tyrosine kinase
Flk : Fetal liver kinase
FOXO : Forkhead box O

G

GABA-RA1 : Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1
GB : Glioblastome
Gd : Gadolinium
Gln : Glutamine
GLUT : Glucose transporter-1
GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Gy : Gray

Liste des abréviations

H

H⁺ : Proton
H° : Radical hydrogène
H2O2 : Peroxyde d'hydrogène
HDR : *Homology directed repair*
HIF : *Hypoxia inducible factor*
HLA : *Human leukocyte antigen*
HRE : *Hypoxia responsive element*
HuR : *Human antigen R*
HUVEC : *Human umbilical vein endothelial cell*

I-J-K

ICAM : *Intracellular adhesion molecule-1*
IDH : Isocitrate deshydrogenase
IFN : Interféron
IgG : *Immunoglobulin-like*
IGF : *Insulin-like growth factor*
IL : Interleukine
iNOS : *Inducible nitric oxide synthase*
IP : Iodure de propidium
IRM : Imagerie par résonance magnétique

JAM : Molécules d'adhésion jonctionnelles

Kdr : *Human kinase insert domain containing receptor*

L

LDHA : Lactate déshydrogénase A
LPS : Lipopolysaccharides

M

MCT : *Monocarboxylate transporter*
MCP : *Monocyte chemoattractant protein*
MDSC : *Myeloid-derived suppressor cells*
MEC : Matrice extra-cellulaire
MGMT : *O⁶-methylguanine DNA methyltransferase*
MIP : *Macrophage inflammatory protein*
MKP : *Mitogen-activated protein kinase phosphatase*
mmHg : millimètre de Mercure
MMP : *matrix metalloproteinases*
MMR : *Mismatch mediated repair*
MTIC : *Monomethyl triazenoimidazole carboxamide*

N

NEFL : *Neurofilament light polypeptide*
NER : *Nucleotide excision repair*

NF-1 : *Neurofibromin-1*
NFκB : *Nuclear factor-kappa B*
NHEJ : *Non-homologous end-joining*
NLS : *Nuclear localization signal*
NO : Monoxyde d'azote

O

O₂^{•-} : radical superoxyde
ODDD : *Oxygen-dependent degradation domain*
OH° : radical hydroxyle
OMS : Organisation mondiale de la santé
OOH° : radical hydroperoxyde

P

PARP : *Poly(ADP-ribose)polymerase*
PAS : PER-ARNT-SIM
PBMC : *Peripheral blood mononuclear cells*
PBS : *Phosphate buffer saline*
PCR : *Polymerase chain reaction*
PD-1 : *Programmed cell death protein-1*
PDGF-B : *Platelet-derived growth factor-B*
PDGF-RA : *Platelet-derived growth factor receptor alpha*
PD-L1 : *Programmed death-ligand 1*
PE : *Plating efficiency*
PECAM : *Platelet endothelial cell adhesion molecule*
PFA : Paraformaldéhyde
PHD : *Prolyl-hydroxylase*
PIGF : *Placental growth factor*
PLI : Pression du liquide interstitiel
pO₂ : Pression en oxygène
PRR : *Pattern recognition receptors*
P/S : Pénicilline/Streptomycine
PSGL-1 : *P-selectin glycoprotein ligand-1*
PTEN : *Phosphatase/tensin homolog*
ptO₂ : Pression tissulaire en oxygène
PUMA : *p53 upregulated modulator of apoptosis*

R

R-OOH : Peroxyde
rAng-2 : Ang-2 recombinant
RARE : *Rapid acquisition with relaxation enhancement*
RCT : Radiochimiothérapie
RI : Rayonnement ionisant
ROI : Région d'intérêt
ROS : *Radical oxygen species*
RT : Radiothérapie
RX : Rayon-X

S

S1P1 : *Sphingosine-1-receptor 1*
SAHF : *Senescence associated heterochromatin foci*
SASP : *Senescence-associated secretory phenotype*
SDF : *Stromal derived factor*
SF : Fraction de survie
SLC12A5 : *Potassium chloride transporter member 5*
SVF : Sérum de veau fœtale
SYT-1 : *Synaptotagmin*

T

T2w : Imagerie pondérée en T2
TAA : Thérapie anti-angiogénique
TAD : *Terminal transactivation domain*
TAM : *Tumor associated microglia/macrophages*
TCR : *T cell receptor*
TE : Temps d'écho
TEM : *Tie-2 expressing monocyte/macrophage*
TEP : Tomographie par émission de positons
TERT : *Telomerase reverse transcriptase*
TGF : *Transforming growth factor*
Tie ou Tek : *Tunica interna endothelial cell kinase*
TIL : *Tumor-infiltrating lymphocytes*
TKI : inhibiteurs des tyrosines kinases
TMZ : Témazolomide
TNF : *Tumor necrosis factor*
TP53 ou p53 : *Tumor protein 53*
TR : Temps de répétition
Treg : T régulateur
TSC : *Tuberous sclerosis*

U-V-W-Y-Z

uPA : *Urokinase plasminogen activator*
UTR : *Untranslated transcribed region*

VCAM : *Vascular cell adhesion molecule*
VE-Cadhérine : Cadhérine de l'endothélium vasculaire
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*
VEGF-R : VEGF receptor
VEPTP : *Vascular endothelial protein tyrosine phosphatase*
VHL : von Hippel-Lindau
VPF : *Vascular permeability factor*
VSC : Volume sanguin cérébral

wt : *Wild type*

YAP : *Yes-associated protein*

ZO : *Zonula occludens*

Avant-propos

Avant propos

Les glioblastomes (GB) sont des tumeurs hautement agressives. Leur pronostic reste sombre malgré les traitements standards actuels qui associent la chirurgie, la radiothérapie (RT) et la chimiothérapie (CT) à base de témozolomide (TMZ). L'échec de ces traitements s'explique par le caractère très infiltrant de ces tumeurs, excluant toute exérèse totale, et une relative résistance à la RT et aux CT actuelles. Depuis quelques années, de nouvelles approches thérapeutiques sont apparues, directement issues des recherches fondamentales menées sur ces tumeurs et d'une meilleure compréhension des mécanismes de l'oncogenèse et de la progression tumorale. C'est ainsi que désormais les GB sont considérés comme un modèle multi-compartimental comprenant les cellules tumorales et le microenvironnement incluant les composantes vasculaire, hypoxique et inflammatoire. La compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement de ces compartiments vasculaires et inflammatoires lors de la progression des GB a permis de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour ces tumeurs.

Il a été clairement établi que l'angiogenèse physiologique résulte d'un processus complexe qui fait appel à une balance et une orchestration précise de différents facteurs angiogéniques dont le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et la famille des Angiopoïétines (Ang). A l'inverse, en conditions pathologiques, ce processus ré-initié est dérégulé. Dans les GB, le VEGF et l'Ang-2 font partie des acteurs moléculaires majeurs de ce processus dont les effets conduiront à une vascularisation anarchique, perméable et peu fonctionnelle.

Les GB sont des tumeurs très inflammatoires en faveur d'un statut immunosuppresseur. L'inflammation étant en partie dépendante du compartiment vasculaire, il a été proposé qu'une même molécule puisse participer à la régulation de ces deux processus. Tel est le cas du VEGF mais aussi de l'Ang-2.

Concernant le VEGF, ses effets angiogéniques et inflammatoires sont bien documentés (Ferrara and Adamis, 2016; Olsson et al., 2006; Soubéran et al., 2019; Turkowski et al., 2018). En revanche, pour l'Ang-2, les données sont plus fragmentaires ou controversées, en raison de son effet contexte-dépendant (Kim et al., 2000a; Korhonen et al., 2016; Maisonpierre et al., 1997; Souma et al., 2018).

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse ont été d'évaluer, à l'échelle préclinique, les effets de l'Ang-2 sur la progression du GB et de sa réponse au traitement de radiochimiothérapie (RCT), afin de se replacer dans un contexte de traitements appliqués au patients. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux compartiments vasculaire et inflammatoire, qui au demeurant seront modulés par la RCT.

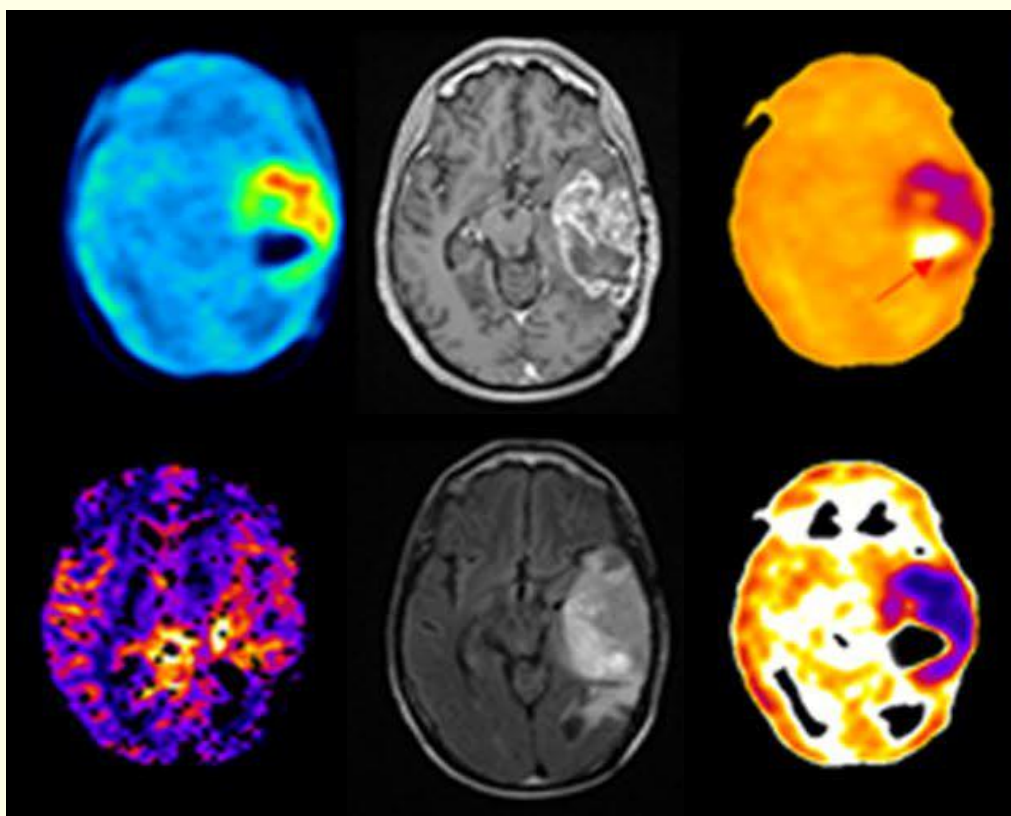
Afin d'étayer le choix de la démarche expérimentale entreprise dans ce travail, l'introduction bibliographique de ce manuscrit comprend quatre grandes parties :

- La première partie est consacrée à la classification des gliomes, aux traitements administrés aux patients et à la physiopathologie des GB
- La seconde partie se focalise sur la composante hypoxique des GB. Ce chapitre décrit les effets de l'hypoxie dans le développement tumoral
- La troisième partie est dédiée au compartiment vasculaire en condition physiologique et pathologique, en particulier dans les GB. Les effets de la RCT sur ce compartiment vasculaire sont également abordés dans cette partie de l'introduction ainsi que les stratégies anti-angiogéniques
- Le dernier chapitre de cette introduction se consacre à la composante inflammatoire des GB : du recrutement des cellules impliquées aux stratégies d'immunothérapie. L'effet de la RCT sur le compartiment inflammatoire est également décrit.

Introduction

PARTIE 1

LES GLIOBLASTOMES



Introduction

Partie 1 : Les glioblastomes

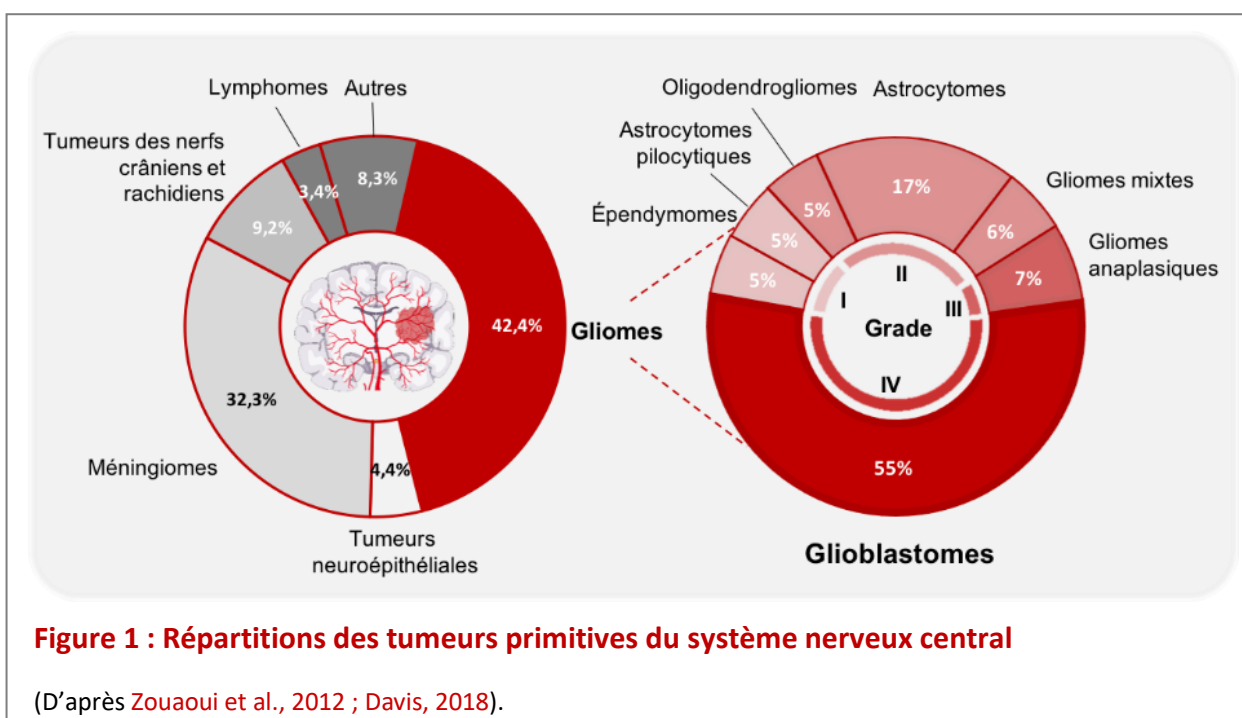
Les glioblastomes (GB) sont des tumeurs cérébrales appartenant aux gliomes.

I. Les gliomes

I.1 Épidémiologie

Les tumeurs primitives du système nerveux central (SNC) constituent un ensemble complexe et hétérogène de pathologies. En effet, plus de 140 sous-types histologiques sont répertoriés dans la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) (Louis et al., 2016). Parmi ces tumeurs, les gliomes sont les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes chez l'adulte et représentent 42,4 % des tumeurs primaires du SNC soit environ 80 % des tumeurs malignes du SNC (Figure 1) (Bauchet and Ostrom, 2019; Zouaoui et al., 2012).

Le terme « gliome » définit toutes les tumeurs qui ont pour origine des cellules cérébrales dites gliales. Par conséquent, les gliomes se subdivisent en sous-groupes de tumeurs parmi lesquels on retrouve, en fonction du grade, les tumeurs épendymaires, les astrocytomes pilocytiques, les oligodendrogliomes, les astrocytomes, les gliomes mixtes, les gliomes anaplasiques et enfin les glioblastomes qui représentent 55 % des gliomes (Davis, 2018) (Figure 1).



I.2 Classification des gliomes

Les gliomes représentent des tumeurs hétérogènes d'un point de vue histologique et moléculaire et à ce titre, différentes classifications ont été établies au cours de ces dernières années afin d'améliorer le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des patients. Ces différentes classifications sont détaillées brièvement ci-dessous.

I.2.1 Classification histologique de l'organisation mondiale de la santé

La classification de l'OMS créée en 1979, qui est la plus répandue, repose sur des critères anatomo-pathologiques qui permettent ainsi de différencier les sous-grades de gliomes. Dans un premier temps, l'analyse histologique des biopsies permet de différencier les gliomes en :

- Astrocytomes (origine astrocytaire)
- Oligodendrogliomes (origine oligodendrocytaire)
- Gliomes mixtes (origine astrocytaire et oligodendrocytaire)

Un grade leur est ensuite attribué en fonction de leur degré de malignité, allant du grade I pour les moins agressifs au grade IV. Les grades I et II sont dits de bas grade tandis que les grades III et IV sont dits de haut grade. Ces grades, résumés dans le **Tableau 1**, s'appuient sur des critères histologiques définis tels que la cellularité, l'activité mitotique (>10 %), la néovascularisation et la présence ou non de foyer nécrotique (Louis et al., 2016).

Tableau 1 : Classification des gliomes selon les critères anatomopathologiques de l'OMS

- absente, + modérée, ++ augmentée, +++ élevée. (D'après Louis et al., 2016).

Tumeur	Grade	Caractéristiques			
		Densité cellulaire	Activité mitotique	Prolifération microvasculaire	Nécrose
Astrocytome	II	-	-	-	-
Gliome anaplasique	III	++	+	-	-
Glioblastome	IV	+++	+++	+++	+++

Cependant, cette classification ne reposait que sur des critères morphologiques, subjectifs, et donnait ainsi lieu à des variabilités inter-observateurs et à une mauvaise évaluation du grade de la tumeur (van den Bent, 2010). C'est pourquoi en 1997, dans l'objectif d'améliorer le diagnostic et la prise en charge thérapeutique, les neuropathologistes de l'hôpital Saint-Anne (Paris) ont proposé une classification alternative (Daumas-Duport et al., 1997).

1.2.2 Classification de l'hôpital Saint-Anne

La classification de l'hôpital Saint-Anne propose, de prendre en compte des données issues de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) suite à l'injection d'un agent de contraste, le chélate de gadolinium (Gd). Cette classification permet de classer les gliomes suivant 2 grades : les grades A et B. Le grade A correspond aux tumeurs de bas grade avec une absence de prise de contraste en imagerie T1, reflet d'une barrière hémato-encéphalique (BHE) sans altération (Figure 2A). Au contraire, le grade B, correspond aux tumeurs de haut grade dans lesquelles on observe une prise de contraste du tissu tumoral, reflet d'une atteinte de la BHE, caractéristique des gliomes de haut grade (Figure 2B).

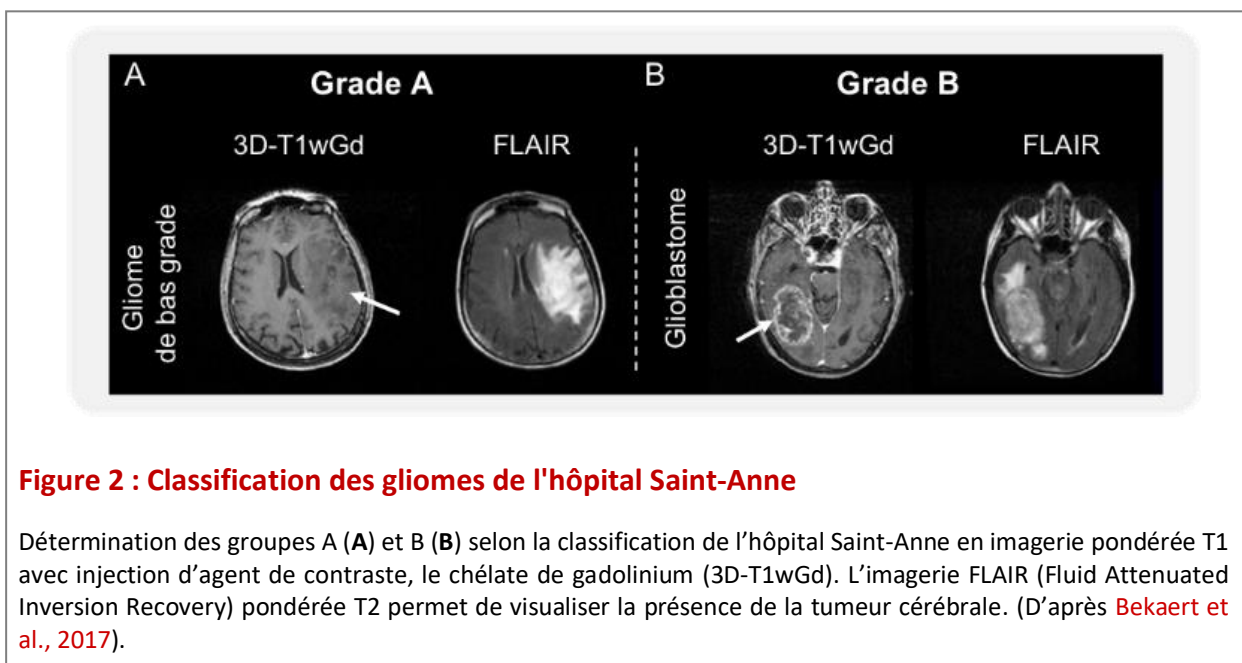


Figure 2 : Classification des gliomes de l'hôpital Saint-Anne

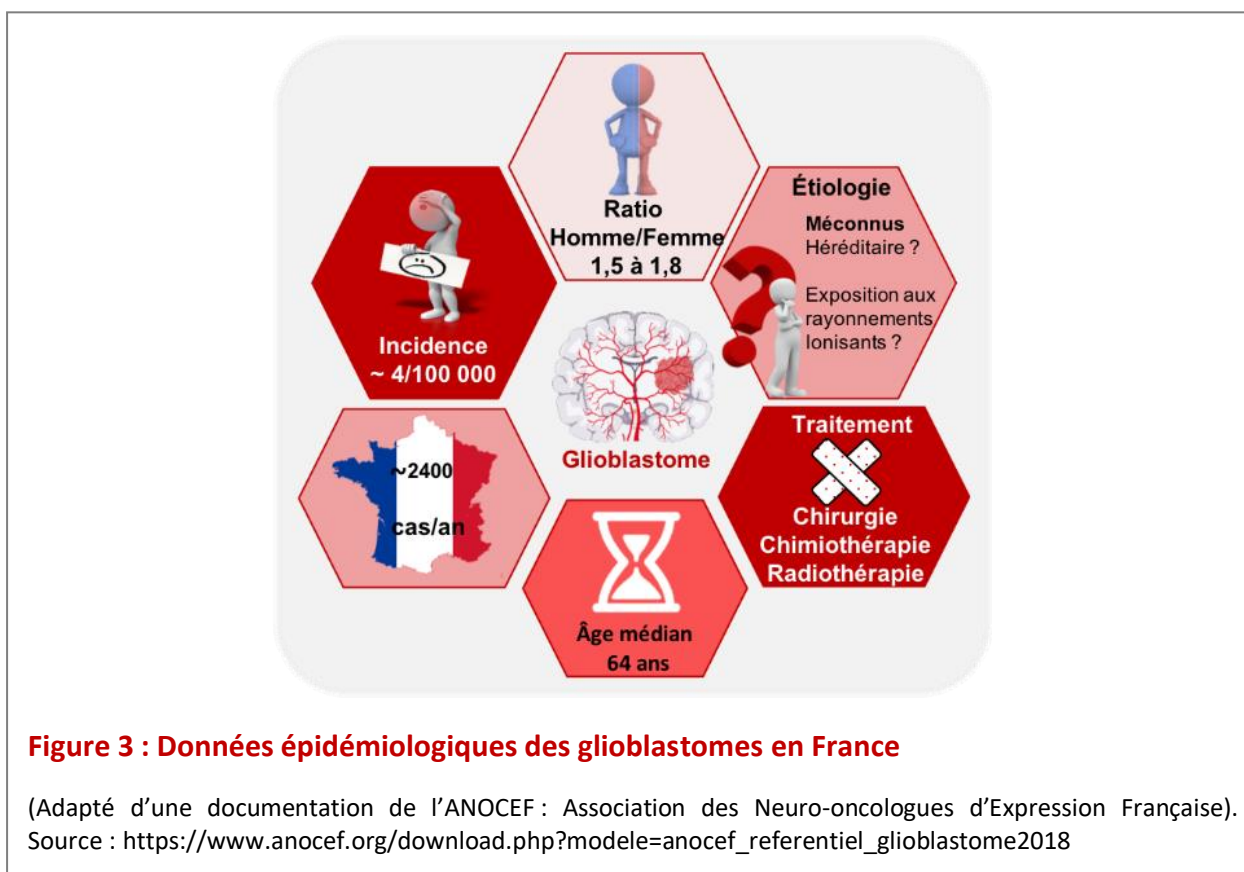
Détermination des groupes A (A) et B (B) selon la classification de l'hôpital Saint-Anne en imagerie pondérée T1 avec injection d'agent de contraste, le chélate de gadolinium (3D-T1wGd). L'imagerie FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery) pondérée T2 permet de visualiser la présence de la tumeur cérébrale. (D'après Bekaert et al., 2017).

Toutefois, à ce jour, cette classification tend à être abandonnée, avec les améliorations de la classification de l'OMS qui intègrent depuis 2016, des paramètres génomiques et moléculaires, toujours dans le but d'améliorer le diagnostic des gliomes et en particulier des GB (Louis et al., 2016).

II. Les glioblastomes

II.1 Épidémiologie

Les GB sont les tumeurs gliales retrouvées le plus fréquemment chez l'adulte. L'incidence annuelle des GB en France est estimée à environ 4 cas pour 100 000 habitants, soit 2400 nouveaux cas par an avec un âge médian de diagnostic de 64 ans et une prédominance masculine (Clavreul et al., 2019). L'étiologie du GB reste toutefois méconnue. Bien que responsable d'une faible proportion des GB, les prédispositions génétiques ont été retrouvées chez certains patients (Malmer et al., 2003). Cependant, le facteur de risque le plus probant et le plus étudié dans la survenue des GB est l'exposition aux rayonnements ionisants (RI) (Figure 3) (Baldi et al., 2010; Ostrom et al., 2014).



Le GB est considéré comme la tumeur la plus agressive du SNC. L'évolution de cette tumeur est extrêmement rapide et s'associe à un pronostic sombre. En effet, la médiane de survie est de 12,8 mois et la survie à 5 ans est inférieure à 7 %, et ce malgré l'évolution des traitements mis en jeu (Wen et al., 2020).

II.2 Caractéristiques histologiques des glioblastomes

À l'échelle microscopique, les GB apparaissent comme des tumeurs très hétérogènes au sein d'une même masse tumorale. La morphologie des cellules (**Figure 4**) ou leur densité peut varier selon la localisation intratumorale ([Habberstad et al., 2012](#)).

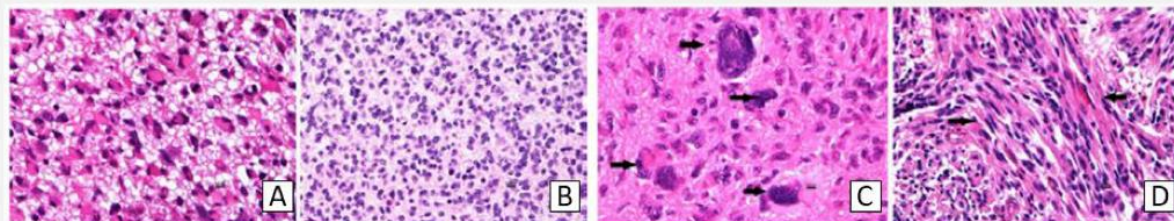


Figure 4 : Représentation de l'hétérogénéité morphologique des cellules de glioblastome

A : Cellules de phénotype gémistocytaire. **B** : Petites cellules. **C** : Cellules géantes. **D** : Cellules en fuseau. (D'après [Habberstad et al., 2012](#)).

En dépit de cette hétérogénéité intratumorale, la classification de l'OMS permet de référencer les GB comme appartenant aux gliomes astrocytaires de grade IV (**Tableau 1**). En effet, l'observation histologique des GB montre une augmentation de la densité cellulaire (**Figure 5A**), une activité mitotique supérieure à 10 %, une prolifération microvasculaire importante (**Figure 5B**) donnant lieu à une vascularisation anormale et pseudo glomérulée. Enfin, on retrouve des zones de nécrose (**Figure 5C**), caractéristiques des GB, entourées par des cellules organisées en pseudo-palissade ([Wiranowska and Vrionis, 2013](#)).

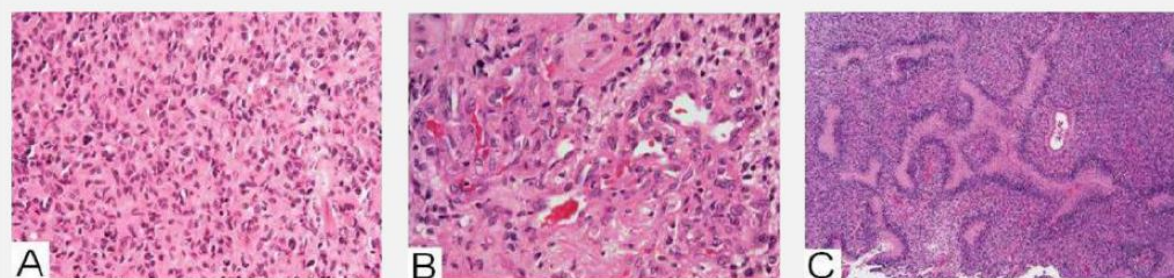


Figure 5 : Caractéristiques histologiques des glioblastomes

A : Haute densité cellulaire. **B** : Prolifération vasculaire. **C** : Présence de zone de nécrose. (D'après [Wiranowska and Vrionis, 2013](#)).

Toutefois, comme mentionné précédemment, depuis 2016, les avancées génétiques ont permis de compléter la classification de l'OMS en y intégrant les paramètres génomiques et moléculaires (Louis et al., 2016).

II.3 Caractéristiques génomiques et moléculaires des glioblastomes.

Cette optimisation de la classification de l'OMS permet ainsi de différencier deux sous-types de GB : les GB *de novo* ou primaires qui représentent 90 % des cas, et les GB secondaires qui évoluent à partir d'un gliome de grade inférieur et qui représentent 10 % des GB. Ces deux sous-types de GB se différencient par des altérations moléculaires distinctes (Figures 6, 7).

II.3.1 Les mutations IDH

Les mutations des gènes *IDH* (isocitrate déshydrogénase) ont constitué une avancée majeure dans la classification des GB. En effet, les mutations retrouvées sur les gènes *IDH-1/IDH-2* ont permis de différencier les GB : les GB *de novo*, se caractérisent par un gène *IDH-1 wild-type (wt)* contrairement aux GB secondaires qui eux, présentent une mutation dans le gène *IDH-1* (Louis et al., 2016). Les mutations du gène *IDH-2* sont retrouvées exclusivement dans les GB secondaires (Yan et al., 2009). Ainsi, le statut du gène *IDH*, désormais à considérer, est systématiquement recherché afin de distinguer les GB *de novo* des GB secondaires.

Les protéines IDH-1 et IDH-2 appartiennent à la famille des enzymes IDH qui interviennent dans le métabolisme énergétique de la cellule. Celui-ci sera donc altéré en cas de mutation des gènes *IDH* et conduira à une production accrue de 2-hydroxyglutarate (2-HG), molécule physiologiquement absente (Figure 6A). La présence de 2-HG stabilise le facteur HIF-1 α (*hypoxia inducible factor-1 α*) dans des conditions de normoxie, potentialisant ainsi la croissance tumorale mais également l'angiogenèse (Intlekofer et al., 2015). Le 2-HG est donc impliqué dans la gliomagenèse (Koivunen et al., 2012).

De façon surprenante, malgré le rôle oncogène du 2-HG, les mutations *IDH* sont considérées comme de bon pronostic. En effet, les patients diagnostiqués avec des mutations des gènes *IDH*, présentent une meilleure survie que les patients dépourvus de cette mutation, avec respectivement une médiane de survie de 31 et 15 mois (Figure 6B) (Yan et al., 2009).

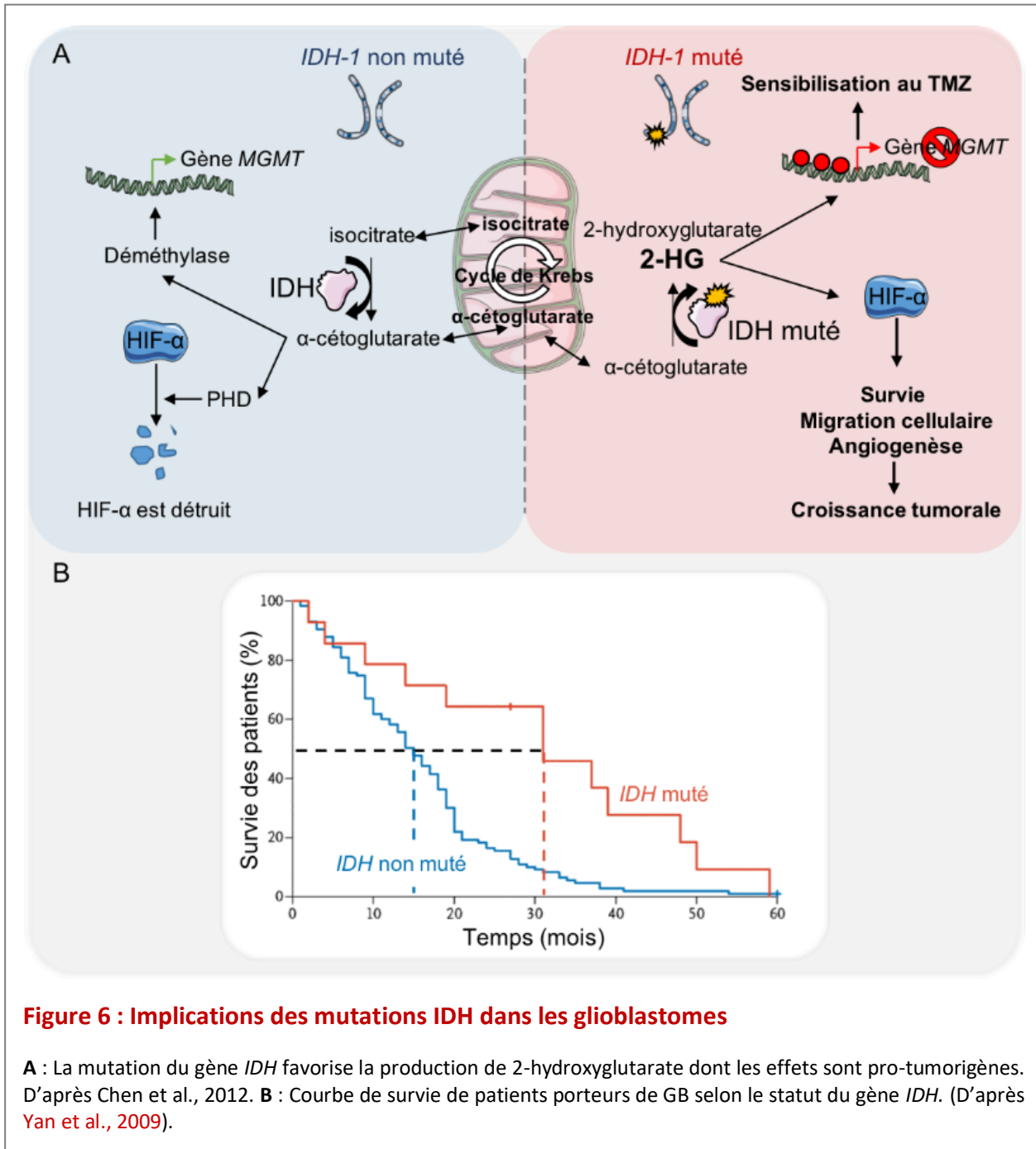


Figure 6 : Implications des mutations IDH dans les glioblastomes

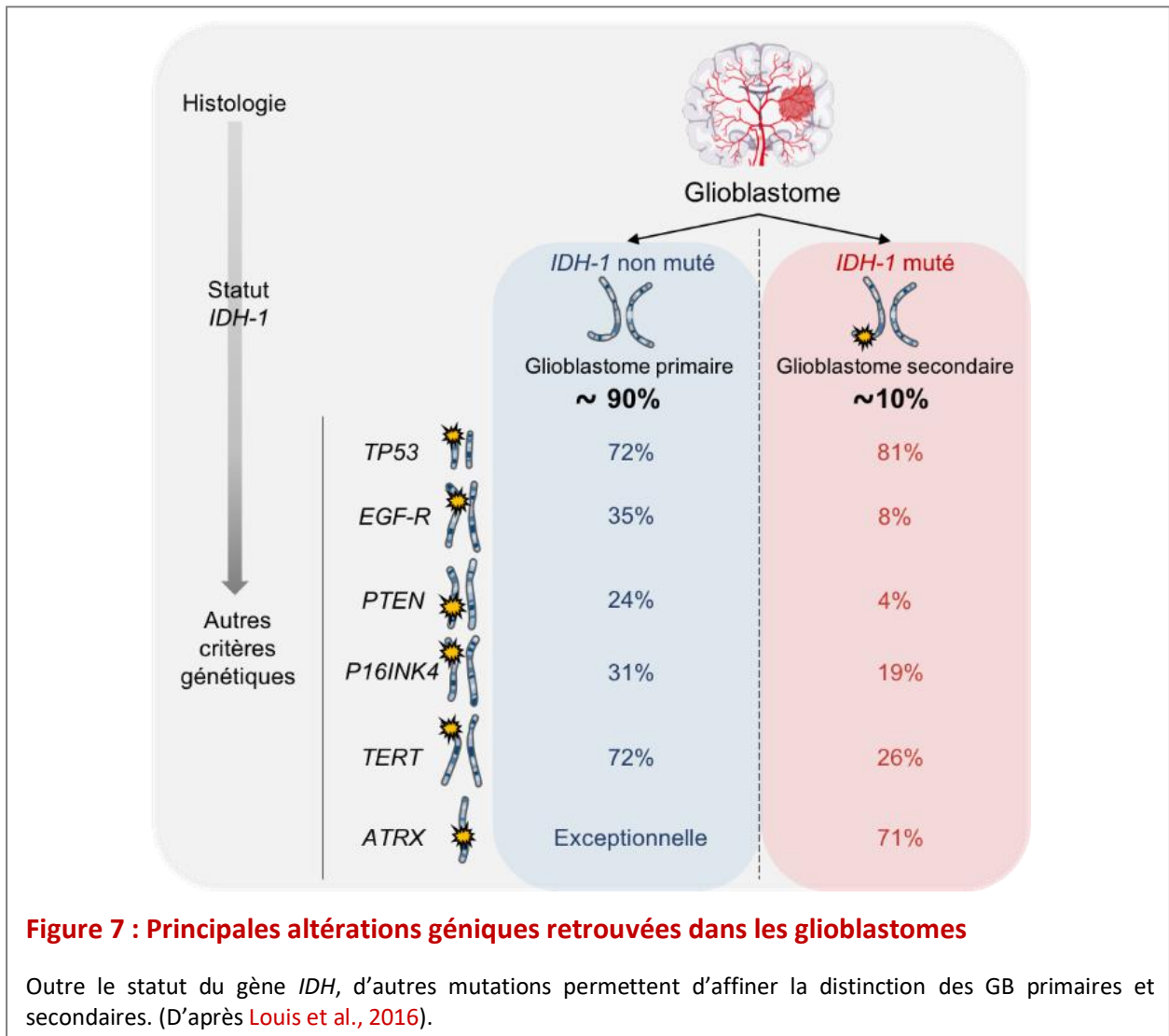
A : La mutation du gène *IDH* favorise la production de 2-hydroxyglutarate dont les effets sont pro-tumorigènes. D'après Chen et al., 2012. **B** : Courbe de survie de patients porteurs de GB selon le statut du gène *IDH*. (D'après Yan et al., 2009).

Les mutations *IDH* jouent également un rôle primordial dans la réponse aux traitements avec une sensibilisation au témozolomide (TMZ). En effet, la présence de 2-HG est associée à une hyperméthylation de l'ADN (acide désoxyribonucléique) au niveau des îlots CpG, du gène *O⁶-METHYLGUANINE DNA METHYLTRANSFERASE* (MGMT), enzyme impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN chimio-induit (**Figure 6A**) (Kernytzky et al., 2015). De plus, les mutations des gènes *IDH* améliore l'efficacité de la radiothérapie (RT) (Li et al.,

2016; Wang et al., 2014). Ces données soulignent l'importance de la recherche de mutations sur le gène *IDH* dans le diagnostic du GB, afin de prédire la réponse aux traitements.

II.3.2 Autres mutations retrouvées dans les glioblastomes

Différentes altérations génétiques sont également observées préférentiellement sur l'un des deux sous-types et permettent ainsi d'affiner la classification des GB (Figure 7) (Louis et al., 2016).



Les GB primaires, *IDH wild type*, les plus fréquents, se caractérisent génétiquement par des mutations du gène de *TP53* (*tumor protein 53* ; 72 %), une amplification de l'*EGF-R* (*epidermal growth factor-receptor* ; 35 %), des mutations du gène de *PTEN* (*phosphatase/tensin homolog* ; 24 %), une délétion de *P16INK4* (31 %), des mutations du

promoteur du gène *TERT* (*telomerase reverse transcriptase* ; 72 %) et plus rarement du gène d'*ATRX* (exceptionnelle).

Au contraire, les GB secondaires, *IDH* muté, issus de la transformation de tumeurs de grade inférieur, se caractérisent par des mutations plus fréquentes du gène *TP53* (81 %) et *ATRX* (71 %) alors que l'amplification de l'*EGF-R* (8 %), les mutations du promoteur du gène *TERT* (26 %), la délétion de *P16INK4* (19 %) et les mutations de *PTEN* (4 %) sont plus rares.

Toutes ces modifications d'expression de gènes, par des mutations « gain de fonction » des oncogènes et/ou des mutations « perte de fonction » des gènes suppresseurs de tumeurs, se traduisent par des dérégulations des voies de signalisations impliquées dans la prolifération, la survie et la migration cellulaire, qui sont des processus considérés comme des « *Hallmarks of cancers* » (Hanahan and Weinberg, 2000; Louis et al., 2016).

Certaines altérations géniques sont également observées sans toutefois permettre de différencier les sous-types de GB. Néanmoins, ces modifications, comme la méthylation du promoteur du gène *MGMT*, peuvent prédire la réponse aux traitements (Hegi et al., 2005).

II.3.3 L'hyperméthylation du promoteur MGMT

L'hyperméthylation du promoteur du gène *MGMT* est la modification épigénétique la plus couramment retrouvée dans les GB. Cette enzyme *MGMT* est impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN induits par le traitement de chimiothérapie (CT) au TMZ (Esteller et al., 2000). Cette modification épigénétique, retrouvée dans les GB de façon sporadique peut aussi être la résultante de mutations sur les gènes *IDH* mentionnées dans le chapitre II.3.1. L'hyperméthylation du promoteur du gène *MGMT* conduit à une répression transcriptionnelle du gène, empêchant ainsi la réparation des dommages à l'ADN chimio-induits par son transcrit. De ce fait, une hyperméthylation du promoteur du gène *MGMT* est corrélée à un meilleur pronostic et une meilleure réponse au TMZ (Hegi et al., 2005).

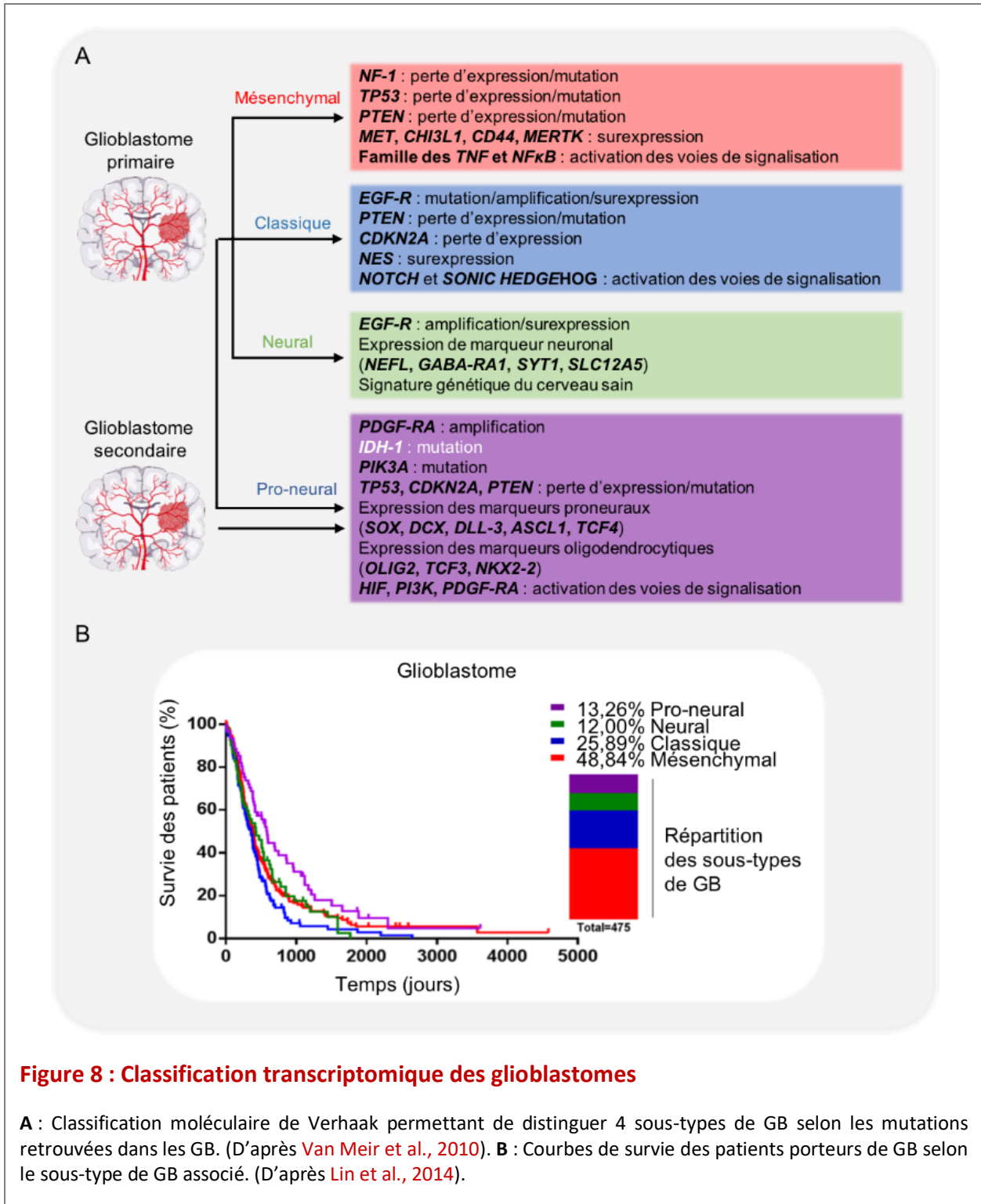
Enfin, d'autres modifications génomiques sont retrouvées dans les GB et permettent de compléter cette liste non-exhaustive. On retrouve, effectivement, des modifications au niveau des histones ou encore des modifications d'expression d'ARN (acide ribonucléique) non codants (microARN ou long ARN) (Ahir et al., 2017; Kim, 2014).

II.4 Classifications et caractéristiques transcriptomiques des glioblastomes

Dans un soucis constant de mieux appréhender l'hétérogénéité des GB, les avancées des recherches « omiques », génomiques et transcriptomiques, ont permis de mettre en exergue des signatures spécifiques des GB, permettant ainsi une classification en 4 sous-types moléculaires : mésenchymal (49 %), classique (26 %), neural (12 %) et pro-neural (13 %) (**Figure 8B**) (Verhaak et al., 2010).

Les GB primaires peuvent ainsi être divisés parmi ces 4 sous-groupes contrairement aux GB secondaires qui sont, quant à eux, considérés comme appartenant au sous-groupe pro-neural (**Figure 8A**).

- Le groupe classique présente dans 100 % des cas observés une amplification du gène codant pour l'EGF-R et des pertes de locus portant les gènes *PTEN* et *CDKN2A* (*cyclin dependant kinase inhibitor 2A*).
- Le groupe mésenchymal présente des inactivations des gènes *NF-1* (*neurofibromin-1*), *TP53* et *PTEN*.
- Le groupe neural se définit par l'expression de marqueurs neuronaux comme : *NEFL* (*neurofilament light polypeptide*), *GABA-RA1* (*gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1*), *SYT-1* (*synaptotagmin*) et *SLC12A5* (*potassium chloride transporter member 5*).
- Le groupe pro-neural présente, quant à lui, des amplifications des gènes *PDGF-RA* (*platelet-derived growth factor receptor alpha*) et *IDH-1* (Van Meir et al., 2010; Verhaak et al., 2010). Ce groupe se compose essentiellement de GB secondaires caractérisés par les mutations des gènes *IDH*. C'est pourquoi, les patients diagnostiqués pour un GB pro-neural présentent une meilleure survie que les autres sous-types de GB (**Figure 8B**) (Crespo et al., 2015).



Ces nouveaux profils moléculaires constituent une base de données particulièrement prometteuse puisqu'en l'associant à la classification de l'OMS, elle pourrait amener à proposer des thérapies personnalisées et plus ciblées en fonction de chaque patient. En effet, les réponses aux traitements seront différentes en fonction des mutations retrouvées. La

mutation du gène *IDH-1* du groupe pro-neural pourrait, par exemple, favoriser la réponse aux traitements de CT et de RT alors que l'inactivation de la protéine p53 retrouvée dans le groupe mésenchymal pourrait altérer la mise en place des processus de mort radio-induits, dépendants de p53. Par ailleurs, ce groupe pro-neural aurait une meilleure réponse aux immunothérapies (Behnan et al., 2019).

Cette catégorisation a marqué un tournant important dans la compréhension de l'hétérogénéité des GB (Brennan et al., 2013). Ces classifications moléculaires font apparaître différents sous-types qui pourraient être le reflet d'une diversité cellulaire à l'origine des GB.

II.5 Origine et hétérogénéité des cellules de glioblastome : le rôle des CSC ?

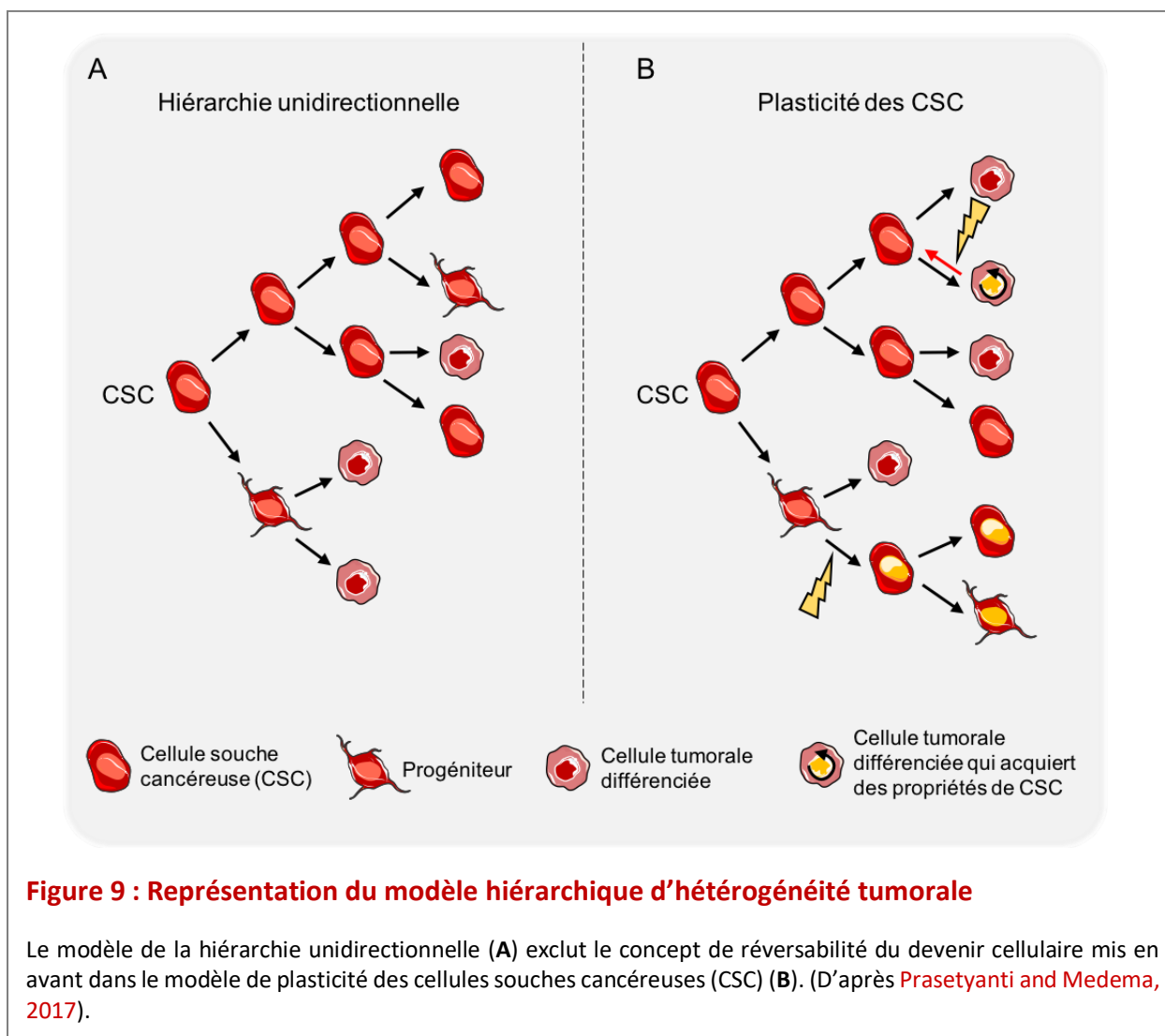
Les GB sont des tumeurs très hétérogènes d'un patient à l'autre (hétérogénéité intertumorale) mais également au sein d'une même masse tumorale (hétérogénéité intratumorale).

À ce jour, deux modèles principaux tentent d'expliquer cette hétérogénéité tumorale.

- Le premier modèle est dit stochastique ou d'évolution clonale. Celui-ci propose que toutes les cellules d'un tissu ont la capacité de tumorigenèse et peuvent se comporter comme une cellule initiatrice de tumeur. Les cellules acquièrent dans le temps une accumulation de mutations stochastiques, dites « *drivers* », et subissent des sélections issues non seulement du microenvironnement mais aussi des thérapies. Ainsi, les clones les plus adaptés au microenvironnement proliféreront au dépend des clones non compétitifs (Persano et al., 2013).
- Le second modèle, plus récent et le plus soutenu actuellement, est le modèle dit hiérarchique (Figure 9) (Prasetyanti and Medema, 2017). Dans ce modèle, la tumeur est issue d'une sous-population de cellules, présentant des propriétés communes aux cellules souches définies comme cellules souches cancéreuses (CSC). Des cellules CSC dénommées, cellules souches de gliome (CSG), ont été d'ailleurs identifiées sur des biopsies de GB renforçant ainsi ce modèle hiérarchique qui prône les CSG comme initiatrices de la gliomagenèse (Ignatova et al., 2002). Le modèle hiérarchique suppose que seules les CSC sont capables de générer la masse tumorale *via* une division symétrique (l'auto-renouvellement) ou une division asymétrique (génération de cellules différenciées) : c'est la hiérarchie unidirectionnelle

(Figure 9A). La seconde hypothèse repose sur la capacité de dédifférenciation des cellules depuis un état non CSC à un état CSC et inversement. Dans ce modèle, la plasticité est déterminée par divers signaux intrinsèques et extrinsèques. Ainsi, les cellules non-CSC peuvent servir de réservoir pour créer une population de CSC pendant l'oncogenèse (Figure 9B).

Quel que soit le modèle, l'origine de la tumeur est toujours discutée.



D'autre part, la présence de ces CSG dans les GB est associée à un mauvais pronostic pour le patient (Zeppernick et al., 2008). En effet, ces CSG sont connues pour être résistantes à de nombreuses thérapies, dont la RT et la CT, et ce par leur division lente, leur quiescence cellulaire mais aussi une forte expression de protéines exportatrices de drogue (Stiles and Rowitch, 2008). Les CSG seraient donc déterminantes dans l'échappement aux traitements et dans la récurrence tumorale (Jackson et al., 2015).

La recherche de ces CSG ainsi que l'identification des altérations génomiques et transcriptomiques pourraient permettre l'optimisation de la prise en charge des patients porteurs de GB, par l'introduction de thérapies personnalisées. Toutefois, à ce jour, la prise en charge des patients reste standardisée.

III. Prise en charge thérapeutique des glioblastomes

A l'heure actuelle, le traitement standard pour les GB repose sur un protocole associant la chirurgie à une radiochimiothérapie (RCT) concomitante.

III.1 La chirurgie

L'exérèse tumorale reste le traitement de première intention chez les patients porteurs de GB. Cependant, bien souvent la résection tumorale ne peut être complète, au regard de la localisation tumorale et du caractère infiltrant des cellules de GB. Malgré l'utilisation de nouveaux outils comme la chirurgie guidée par fluorescence, suite à une injection de 5-acide-aminolévulinique (5-ALA) (**Figure 10**), une récurrence tumorale est observée dans 95 % des cas aux abords de la zone de résection ([Giese et al., 2003](#); [Van Meir et al., 2010](#)). La résection chirurgicale n'étant pas suffisante celle-ci est nécessairement associée à la CT et la RT.

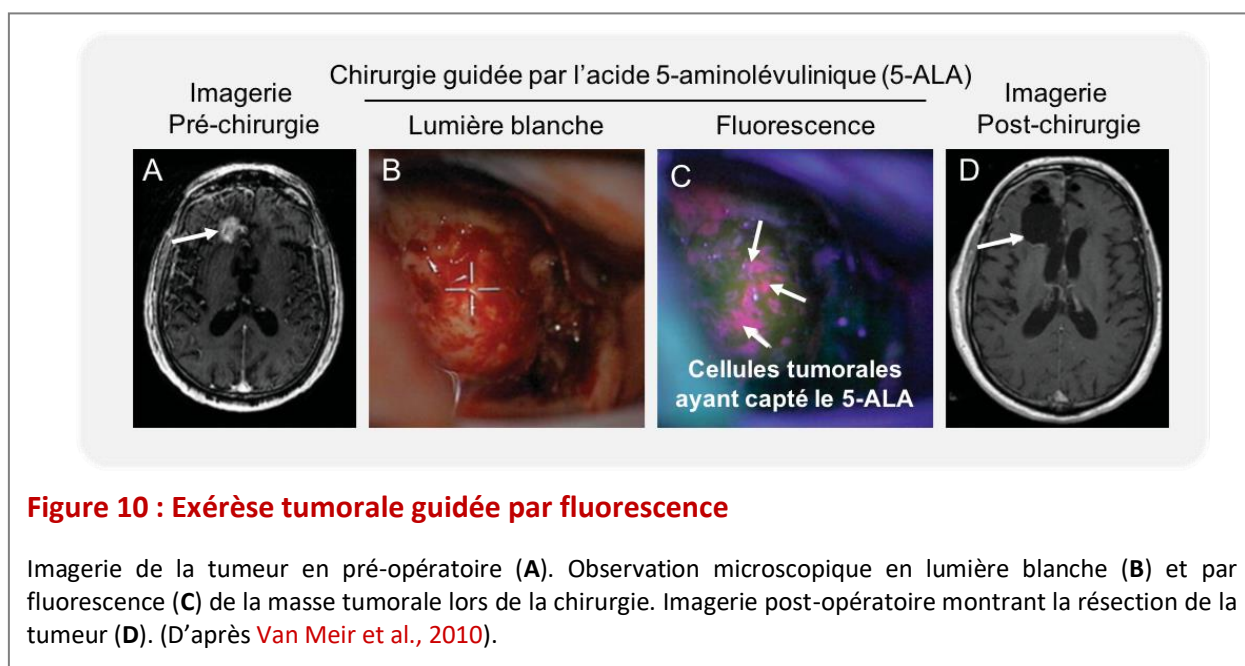


Figure 10 : Exérèse tumorale guidée par fluorescence

Imagerie de la tumeur en pré-opératoire (A). Observation microscopique en lumière blanche (B) et par fluorescence (C) de la masse tumorale lors de la chirurgie. Imagerie post-opératoire montrant la résection de la tumeur (D). (D'après [Van Meir et al., 2010](#)).

III.2 La radiothérapie des glioblastomes

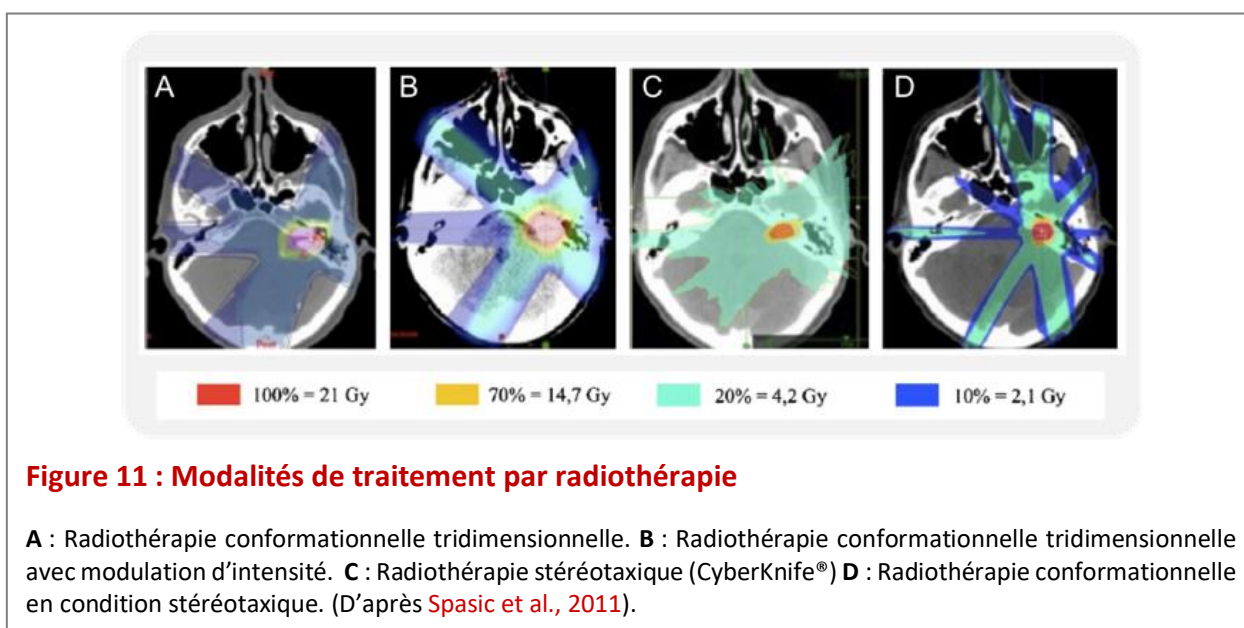
III.2.1 Principe de la radiothérapie

Historiquement, la RT pour les GB a été introduite dans les années 1940 avec l'utilisation des rayons X (RX). Malgré l'apparition de rayonnements ionisants (RI) α , β et γ , les RX restent à ce jour les plus utilisés et permettent d'augmenter la survie des patients de 9 mois (Weller et al., 2009). Toutefois, les photons émis lors de la RT traversent inexorablement le tissu sain cérébral et conduisent à des effets secondaires parfois importants pour le patients (Greene-Schloesser et al., 2012). Ainsi, de nouvelles modalités de traitement sont proposées afin de préserver au maximum le tissu sain cérébral (Spasic et al., 2011).

La RT conformationnelle, qui est la plus utilisée en clinique, repose sur l'utilisation de plusieurs faisceaux selon des angles différents pour déposer l'énergie nécessaire dans la tumeur tout en épargnant le tissu sain (Figure 11A).

Selon les modalités de traitement, on peut varier la dose de chaque faisceau en fonction du tissu traversé, c'est la RT conformationnelle avec modulation d'intensité (Figure 11B) : une faible dose est appliquée pour les faisceaux qui traversent majoritairement le tissu sain et de forte doses aux faisceaux lorsque peu de tissu sain se trouve sur le trajet.

La RT conformationnelle, en condition stéréotaxique, permet de moduler l'intensité du faisceau mais également la taille du faisceau de façon à être plus précis et épargner les structures cérébrales importantes sur le plan fonctionnel (Figures 11C, D).



III.2.2 Effets biologiques de la radiothérapie

D'un point de vue biologique, les RI vont générer deux types d'effets (Nambiar et al., 2011).

- Des effets directs : Les RI peuvent ioniser directement la molécule d'ADN, les protéines ou encore les lipides de la cellule et ainsi induire des lésions moléculaires (**Figure 12A**).
- Des effets indirects : Les RI peuvent également ioniser les molécules d'eau, provoquant la radiolyse de cette dernière et *in fine* la formation de radicaux libres oxygénés ou *radical oxygen species* (ROS). Ces derniers sont très cytotoxiques et sont responsables des effets indirects en générant des lésions moléculaires aux cellules touchées mais également aux cellules environnantes non irradiées, on parle alors d'effet *bystander* (**Figure 12B**).

Outre la production de ROS, les effets *bystander* s'appuient sur la communication entre les cellules, soit par contact direct soit par la production de facteurs de croissance, de cytokines ou encore d'exosomes dans le milieu extracellulaire (Najafi et al., 2014; Xu et al., 2015).

Des effets similaires sont également observés sur des tissus plus distants, on parle alors d'effet abscopal (**Figure 12B**). Cet effet est relayé par des facteurs circulants mais aussi par la réaction immunitaire associée (Tomita and Maeda, 2015).

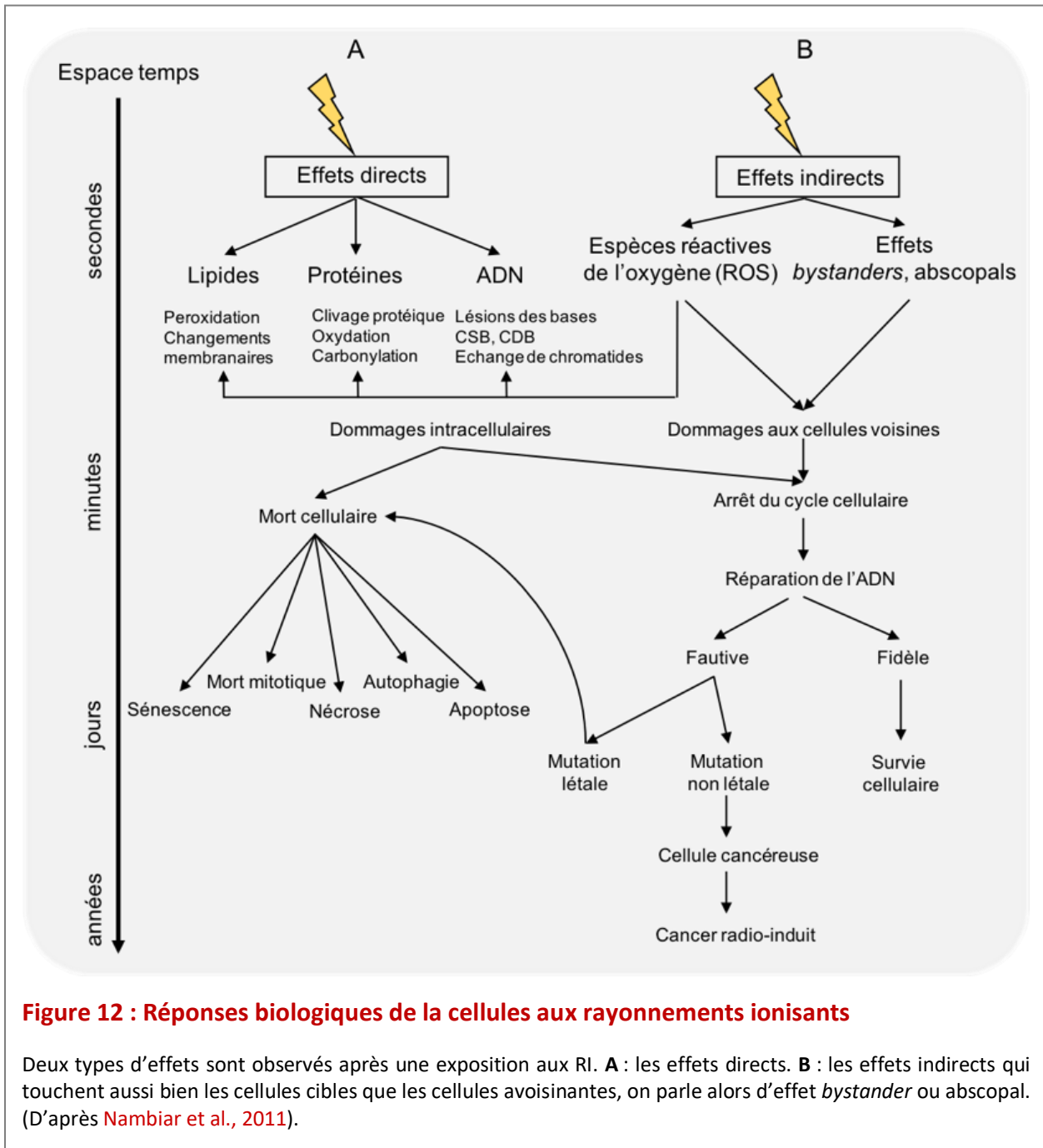


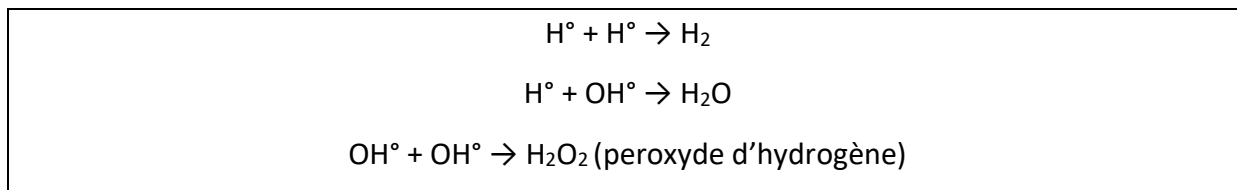
Figure 12 : Réponses biologiques de la cellules aux rayonnements ionisants

Deux types d'effets sont observés après une exposition aux RI. **A** : les effets directs. **B** : les effets indirects qui touchent aussi bien les cellules cibles que les cellules avoisinantes, on parle alors d'effet *bystander* ou *abscopal*. (D'après Nambiar et al., 2011).

III.2.3 Effet oxygène de la radiothérapie

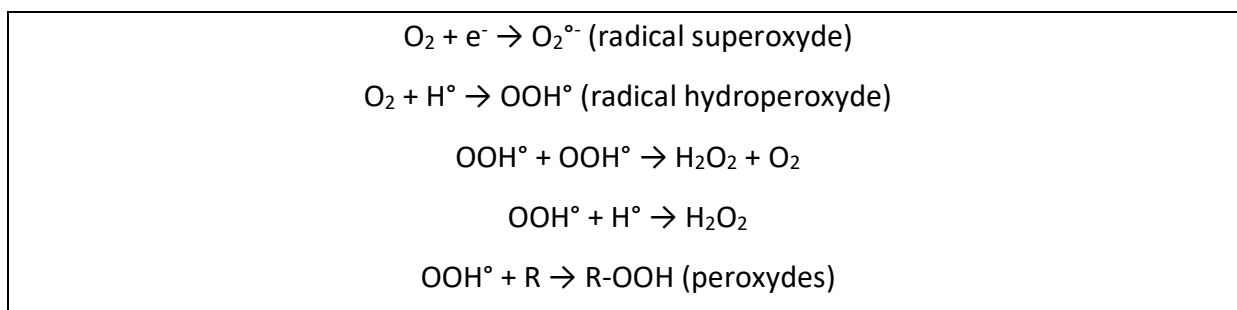
Comme évoqué précédemment, les effets des RI sur les cellules passent majoritairement par la radiolyse de l'eau qui crée des espèces radicalaires. Ces espèces radicalaires vont dans un second temps entraîner des dommages cellulaires. Dès lors que la molécule d'eau est ionisée, elle se dissocie en deux radicaux libres : OH^\bullet (radical hydroxyle) et H^\bullet (radical hydrogène). Ces radicaux libres, dont la demi-vie est extrêmement courte, vont chercher à s'apparier pour former une molécule plus stable.

Différents appariements entre espèces radicalaires pourront exister.



Ce dernier composé H_2O_2 ou peroxyde d'hydrogène entraîne un stress oxydatif de la cellule.

Cependant, en présence d'oxygène, les radicaux libres forment davantage d'espèces radicalaires et autres peroxydes (R-OOH).



Cette augmentation de la production de radicaux libres en présence d'oxygène est connue sous le nom « **effet oxygène** ». Ce sont ces produits secondaires de la radiolyse de l'eau qui attaqueront la cellule et particulièrement, la molécule d'ADN et les macromolécules telles que les protéines et les lipides. L'absence ou le manque d'oxygène diminue fortement cet effet oxygène et donc les dommages radio-induits. C'est ainsi que l'hypoxie, retrouvée dans les GB, est considérée comme un facteur de radiorésistance.

Nous nous attacherons dans les paragraphes suivants à mentionner les principales réponses mise en jeu par les cellules après RT.

III.2.4 Réponses cellulaires aux dommages radio-induits

III.2.4.1 Signalisation intracellulaire des dommages à l'ADN

La cellule doit dans un premier temps détecter les dommages à l'ADN radio-induits afin d'activer dans un second temps les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN (Zhou and Elledge, 2000). Ainsi, plusieurs points de contrôle successifs sont mis en place pour la détection des dommages à l'ADN. Ces dommages à l'ADN peuvent être soit simple brin soit double brin. Toutefois, ces derniers sont plus difficilement réparables.

Nous décrivons les principaux acteurs moléculaires de cette cascade.

- L'initiation de la cascade moléculaire (**Figure 13**) débute avec les protéines dites « senseurs » telles que les PARP (*poly(ADP-ribose)polymerase*) et la DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*).
- Le signal est ensuite relayé par les protéines de transduction comme ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) et ATR (*ATM-and Rad3-related*).
- Enfin, les effecteurs terminaux comme les Chk-1 et Chk-2 (*checkpoint kinase 1/2*) guident la cellule vers un arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN ou la mort cellulaire (Nyberg et al., 2002).

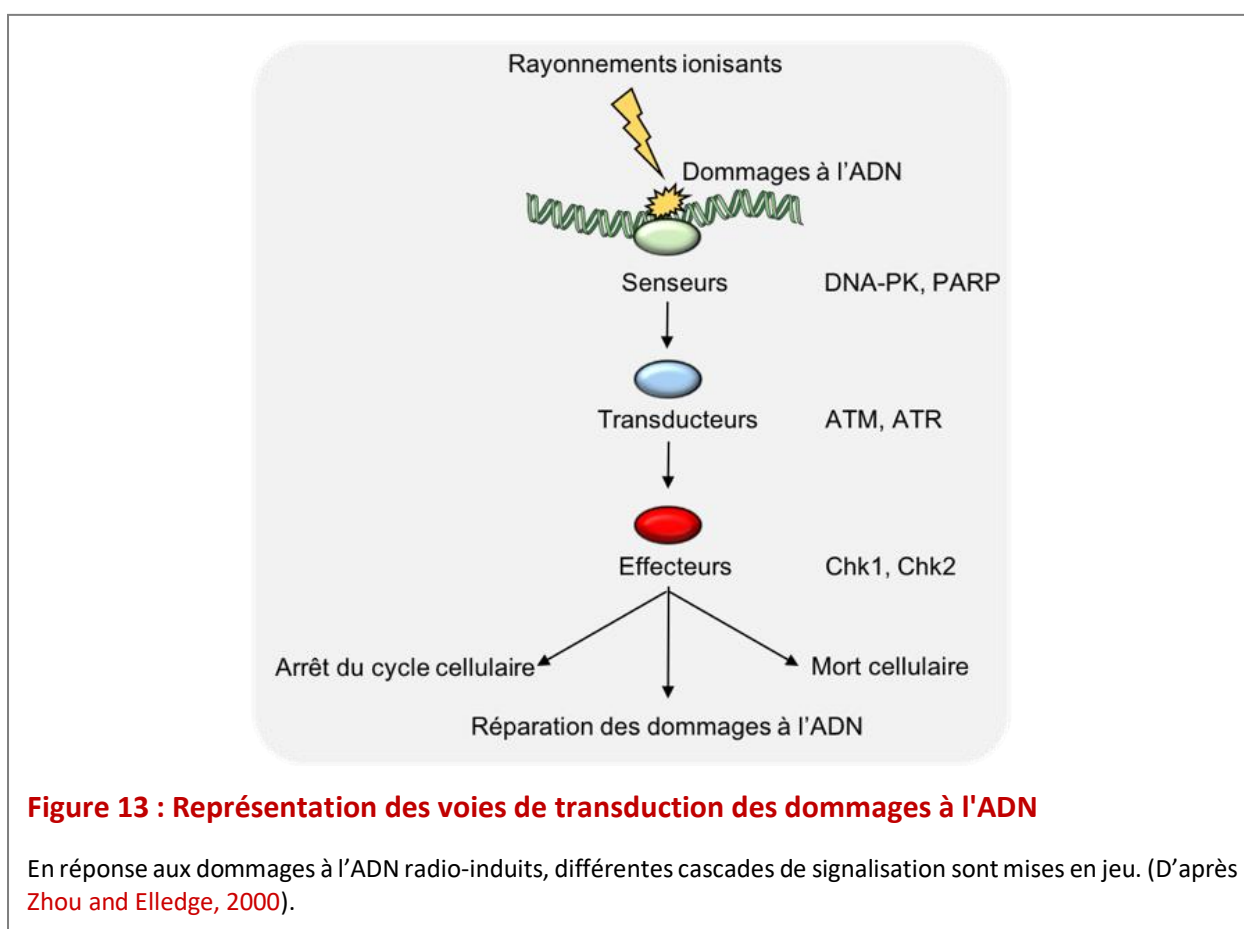


Figure 13 : Représentation des voies de transduction des dommages à l'ADN

En réponse aux dommages à l'ADN radio-induits, différentes cascades de signalisation sont mises en jeu. (D'après Zhou and Elledge, 2000).

La protéine gardienne du génome, p53, joue un rôle important dans la transduction des dommages à l'ADN. Ce facteur de transcription p53 sera activé par ATM et Chk-2 en réponse aux cassures double brin, afin de transcrire ses gènes cibles impliqués dans le devenir des cellules. En effet, p53 joue un rôle primordial en favorisant la réparation des dommages à l'ADN mais aussi en favorisant la mort des cellules par apoptose, autophagie ou sénescence.

Cependant, cette protéine p53 est fréquemment mutée dans les GB (essentiellement les GB mésenchymateux) et pourrait expliquer pour partie la radio-résistance de ces tumeurs (Louis et al., 2016).

III.2.4.2 Contrôle du cycle cellulaire

L'arrêt du cycle cellulaire est une étape importante pour le devenir de la cellule. Le cycle cellulaire se définit comme une succession de phases (G1, S, G2 et M) qui permet à la cellule de doubler son matériel génétique avant une division en deux cellules filles. Il s'agit d'un processus hautement régulé afin de préserver l'intégrité du génome lors de la division. En effet, le passage d'une phase à l'autre est sous la dépendance des cyclines et des CDK (*cyclin-dependant kinase*). Chaque transition fait intervenir un duo de Cycline/CDK différent qui lui-même est régulé, entre autres, par la famille des phosphatases activatrices Cdc25 (*cell division cycle 25*). Par exemple, le duo Cycline-D1/CDK-4 et le duo Cycline-B/CDK-1 sont respectivement responsables des transitions G1/S et G2/M. Cependant, en cas d'anomalie, comme les dommages à l'ADN, le cycle cellulaire sera inhibé par les CDKI (*cyclin-dependant kinase inhibitor*). Parmi ces régulateurs CDKI, on retrouve notamment les protéines p16 et p21 avec des activités inhibitrices spécifiques. La protéine p16 inhibe spécifiquement le complexe Cycline-D1/CDK-4 impliqué dans la progression de la phase G1 alors que p21 peut, quant à lui, inhiber tous les complexes Cycline/CDK. Les arrêts en phase G1 et G2/M sont particulièrement observés suite à la RT

- **L'arrêt en G1** est principalement induit par p53 et p21. Cet arrêt permet de réparer les dommages avant la duplication du matériel génétique. D'un point de vue mécanistique, l'activation de p53 permet secondairement une augmentation d'expression de p21, impliquée dans l'inhibition du complexe Cycline-D1/CDK-4. Cet arrêt radio-induit dans la phase G1 du cycle cellulaire est toutefois absent dans les cellules présentant des mutations de p53, comme cela peut être le cas pour les cellules de GB (Kuerbitz et al., 1992).
- **L'arrêt en G2/M** permet de corriger les éventuelles aberrations chromosomiques avant la mitose. Cet arrêt est consécutif à l'inactivation de la Cdc25c. Ainsi, cette dernière ne peut activer, le complexe Cycline-B/CDK-1 responsable du maintien des cellules en G2/M (Gogineni et al., 2011; Liu et al., 2018a).

C'est lors de ces arrêts du cycle cellulaire que les systèmes de réparation à l'ADN sont mis en œuvre.

Il faut noter que la répartition des cellules dans le cycle cellulaire a une importance particulière dans l'efficacité de la RT. En effet, des cellules présentes en G2/M lors du traitement par RT seront plus sensibles aux RI, contrairement aux cellules en G1/S qui seront plus radiorésistantes (Dillon et al., 2014).

III.2.4.3 Systèmes de réparation des dommages à l'ADN

Afin de maintenir l'intégrité du génome, il est primordial que les lésions à l'ADN soient réparées. De manière générale, les différents systèmes de réparation de l'ADN sont activés dès la reconnaissance des lésions par les senseurs PARP et DNA-PK.

Il existe 5 mécanismes de réparations qui ont pour but de réparer les cassures à l'ADN (Biau et al., 2019). En effet, 3 systèmes sont activés en réponse aux cassures simple brin, les systèmes BER (*base excision repair*), MMR (*mismatch mediated repair*) et NER (*nucleotide excision repair*). Quant aux cassures double brin, celles-ci sont réparées par les systèmes HDR (*homology directed repair*) et NHEJ (*non-homologous end-joining*). Cependant, une réparation fautive des dommages à l'ADN provoquera la mort de la cellule.

III.2.4.4 Processus de morts cellulaires après radiothérapie

La RT, comme la plupart des traitements anti-cancéreux, exerce son effet thérapeutique en induisant la mort cellulaire. De nombreux processus de mort radio-induite interviennent en fonction de la signalisation impliquée. Parmi ces processus on distingue la sénescence, l'apoptose, la mort mitotique ainsi que la nécrose et l'autophagie.

- **La sénescence radio-induite ou prématurée**, qui n'est pas un processus de mort en soit, se définit comme un arrêt permanent du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN. Suite à l'irradiation, les médiateurs des dommages à l'ADN et notamment ATM activent les voies de signalisation p53/p21 essentielles à l'initiation de la sénescence puis secondairement p16/pRb nécessaires au maintien de la sénescence (te Poele et al., 2002). L'activation de ces voies de signalisation conduit à un arrêt du cycle cellulaire irréversible à l'origine de la sénescence (Figure 14) (Nguyen et al., 2018). Contrairement à la sénescence répliquative, où les cellules sont arrêtées en phase G1, la sénescence radio-induite entraîne les

cellules aussi bien dans la phase G1 que dans la phase G2 du cycle cellulaire (Li et al., 2018). Toutefois, les cellules bloquées en G2 contournent le *checkpoint* de la phase G2/M et se retrouvent secondairement bloquées en G1 (Ye et al., 2013).

Ainsi, les cellules sénescentes se caractérisent par une augmentation d'expression des gènes p53, p21 ou encore p16 responsables de l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, les cellules sénescentes présenteront des modifications de leur phénotype. En effet, ces cellules se caractérisent par une accumulation lysosomale de l'enzyme β -galactosidase (Dimri et al., 1995). Cette enzyme endogène, est actuellement le biomarqueur le plus utilisé pour identifier les cellules sénescentes. Toutefois, l'utilisation seule de ce marqueur est actuellement controversée. Il est donc nécessaire d'y associer d'autres caractéristiques. Au niveau morphologique, les cellules sénescentes, plus plates et hypertrophiées, possèdent plusieurs noyaux ou des noyaux de volume plus important. L'organisation nucléaire est également modifiée, avec la détection, dans les cellules sénescentes de foci d'hétérochromatine dénommés SAHF (*senescence associated heterochromatin foci*) qui s'organisent autour des histones (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Enfin, les cellules sénescentes présentent une persistance des dommages à l'ADN (Collin et al., 2018; Rodier et al., 2009).

Bien que leur état sénescent ne leur permette pas de se répliquer, les cellules restent cependant métaboliquement actives. Elles peuvent notamment sécréter certaines cytokines qui leur confèrent un phénotype particulier dénommé SASP (*senescence-associated secretory phenotype*) (Rodier et al., 2009; Shelton et al., 1999).

Ce phénotype SASP est principalement régulé par le facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) qui est activé aussi bien par ATM suite aux dommages à l'ADN (Figure 14), que par la génération de ROS (Salminen et al., 2012). Ainsi, en retour, l'activité transcriptionnelle du facteur NF- κ B permet l'expression et la sécrétion de ROS et de cytokines pro-inflammatoires, à l'origine du terme SASP, telles que les interleukines (IL) IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 ou encore le TGF- β (*transforming growth factor*), le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) et les MMPs (*matrix metalloproteinases*) (Nguyen et al., 2018; Ungvari et al., 2013). La signalisation autocrine et paracrine de l'IL-1 α et des ROS permet à la cellule de maintenir et de renforcer cet état sénescent par l'activation de NF- κ B, mais permet aussi d'induire la sénescence de cellules voisines en activant cette même voie de signalisation (Nelson et al., 2018).

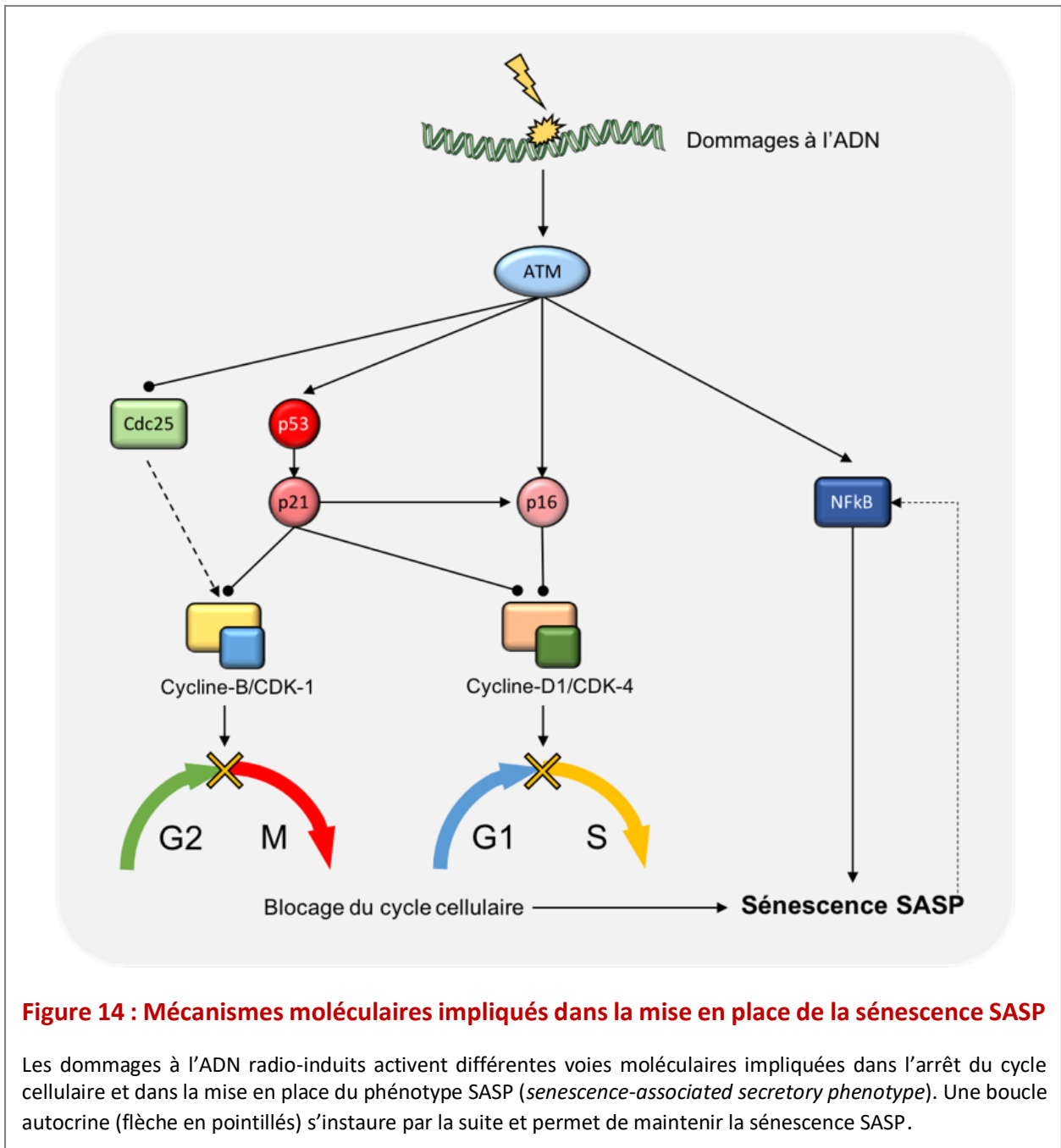


Figure 14 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de la sénescence SASP

Les dommages à l'ADN radio-induits activent différentes voies moléculaires impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans la mise en place du phénotype SASP (*senescence-associated secretory phenotype*). Une boucle autocrine (flèche en pointillés) s'instaure par la suite et permet de maintenir la sénescence SASP.

Les conséquences de la sénescence SASP sont toutefois discutés.

- La sénescence SASP radio-induite aurait un effet bénéfique en oncologie puisqu'elle aurait un rôle non seulement dans la suppression des tumeurs mais aussi dans la sensibilisation de la réponse des tumeurs à la RT mais aussi à la CT (Collado and Serrano, 2010; Meng et al., 2012). Les cellules SASP sont capables de stimuler le système immunitaire et ainsi faciliter la clairance tumorale (Vicente et al., 2016; Xue et al., 2007). L'étude de Meng et al., a en effet mis en évidence dans un modèle de mélanome que l'injection de cellules sénescentes, suite à une irradiation, réduit considérablement la formation de tumeur. Cette injection de

cellules sénescentes s'accompagne d'un recrutement de lymphocytes cytotoxiques (Meng et al., 2012).

○ Toutefois, d'autres études ont montré que le phénotype SASP induit par l'irradiation favorisait la prolifération et l'invasion des cellules aussi bien *in vivo* que *in vitro* dans les carcinomes mammaires et les GB (Jeon et al., 2016; Liao et al., 2014). Le phénotype SASP stimulerait également l'angiogenèse tumorale (Coppé et al., 2006; Liu and Hornsby, 2007).

Au regard de ces données, le rôle de la sénescence SASP reste très controversé puisque le sécrétome des cellules sénescentes induit aussi bien des réponses pro- qu'anti-tumorales (Rao and Jackson, 2016).

• **L'apoptose** est une mort cellulaire dite « programmée » qui se caractérise par l'arrondissement de la cellule, la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire et la formation de corps apoptotique (Kerr et al., 1972). L'apoptose ne s'accompagne pas ou peu de phénomènes inflammatoires puisque la membrane plasmique reste intègre et les cellules apoptotiques sont phagocytées par les macrophages.

On peut distinguer trois voies moléculaires impliquées dans la mise en place de l'apoptose.

○ La voie intrinsèque dite canonique (**Figure 15-1**), dépendante de la mitochondrie, se caractérise par le relargage du cytochrome C de la mitochondrie. La libération du cytochrome C aide à la formation de l'apoptosome, complexe protéique, qui permet l'activation de la caspase-9, qui elle-même active les caspases terminales -3 et -7 qui induisent la mort par apoptose. Cette voie intrinsèque est régie par les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*), régulées principalement par p53. Ainsi, en réponse à l'irradiation, p53 active la transcription de gènes pro-apoptotiques tels que BAX (*Bcl-2 associated X protein*) et PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), et en revanche inhibe la transcription des gènes anti-apoptotiques comme BCL-2 (Findley et al., 1997).

○ La voie extrinsèque (**Figure 15-2**) fait, quant à elle, intervenir le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) ou la protéine Fas-Ligand qui en interagissant avec leur récepteur de mort Fas-R provoque une cascade de signalisation et l'activation des caspases -3 et -7. Cette voie extrinsèque est également dépendante de p53 puisqu'en réponse à l'irradiation, p53 active

l'expression du récepteur Fas-R (Embree-Ku et al., 2002; Reap et al., 1997).

○ Une troisième voie moléculaire a été décrite dans les cellules endothéliales, mais également retrouvée dans les cellules de GB, comme dépendante de l'acid sphingomyelinase (aSMase) et des céramides (Figure 15-3) (Hara et al., 2004; Kolesnick and Fuks, 2003; Paris et al., 2001). L'irradiation induit la translocation membranaire et l'activation de l'aSMase permettant ainsi la transformation de la sphingomyéline en céramide (Peña et al., 2000). Le regroupement des céramides permet la transduction d'un signal et l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax, le relargage du cytochrome C ou encore l'activation de la voie p38/MAPK qui contribuent à l'apoptose (Niaudet et al., 2017). De façon intéressante, cette voie des céramides est indépendante des dommages à l'ADN.

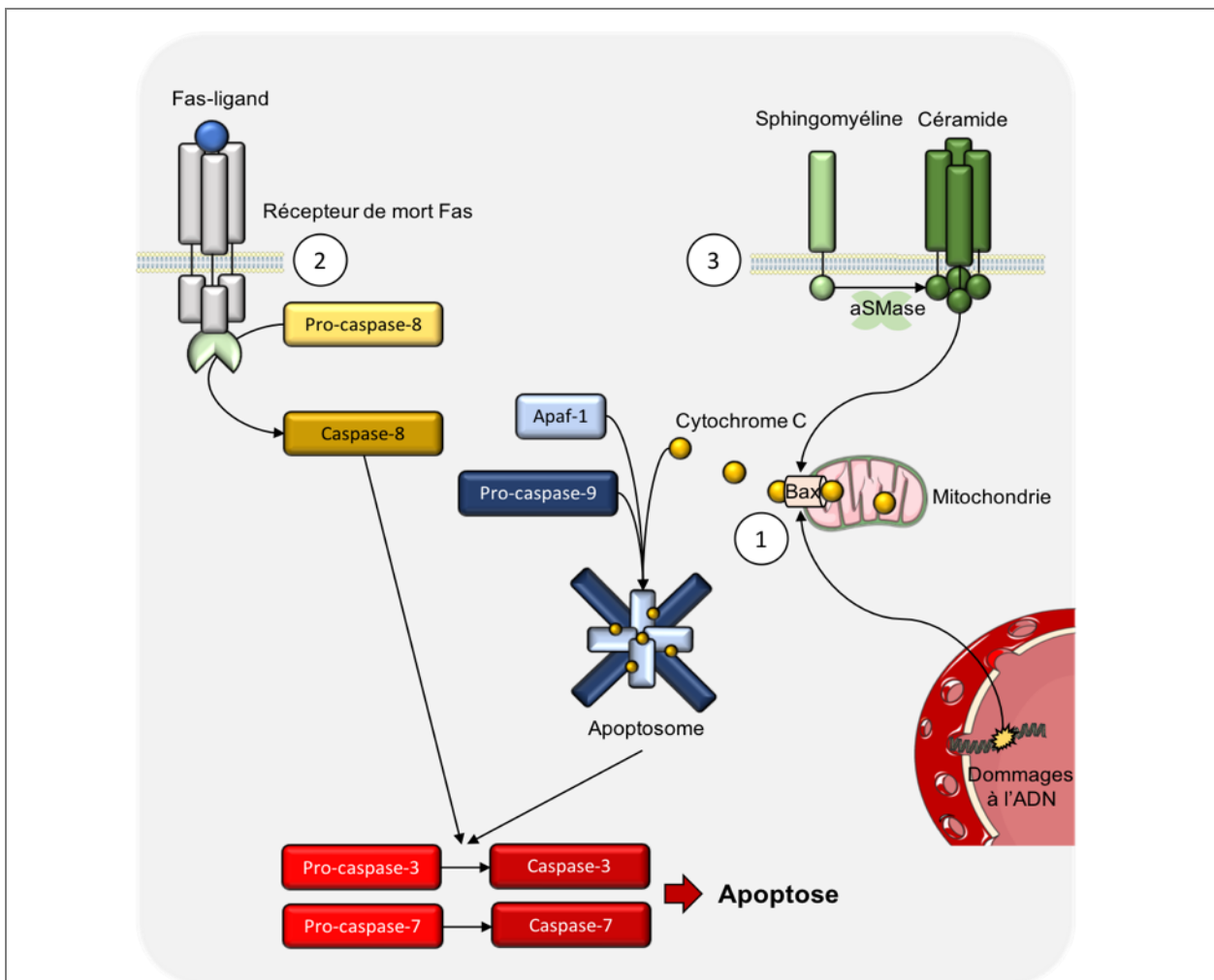


Figure 15 : Représentation des principales voies apoptotiques induites par les rayonnements ionisants

Différentes voies moléculaires sont impliquées dans la mise en place d'une mort par apoptose après une irradiation des cellules. **1** : La voie intrinsèque. **2** : La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort. **3** : La voie des céramides.

Comme nous l'avons indiqué, la sénescence et l'apoptose partagent un médiateur moléculaire commun qui est activé par les dommages de l'ADN, à savoir p53. Bien qu'une différence de modifications post-traductionnelles de p53 soit observée entre cellules sénescents et cellules apoptotiques, les processus dirigeant la cellule vers l'une ou l'autre « mort » cellulaire demeurent incertains.

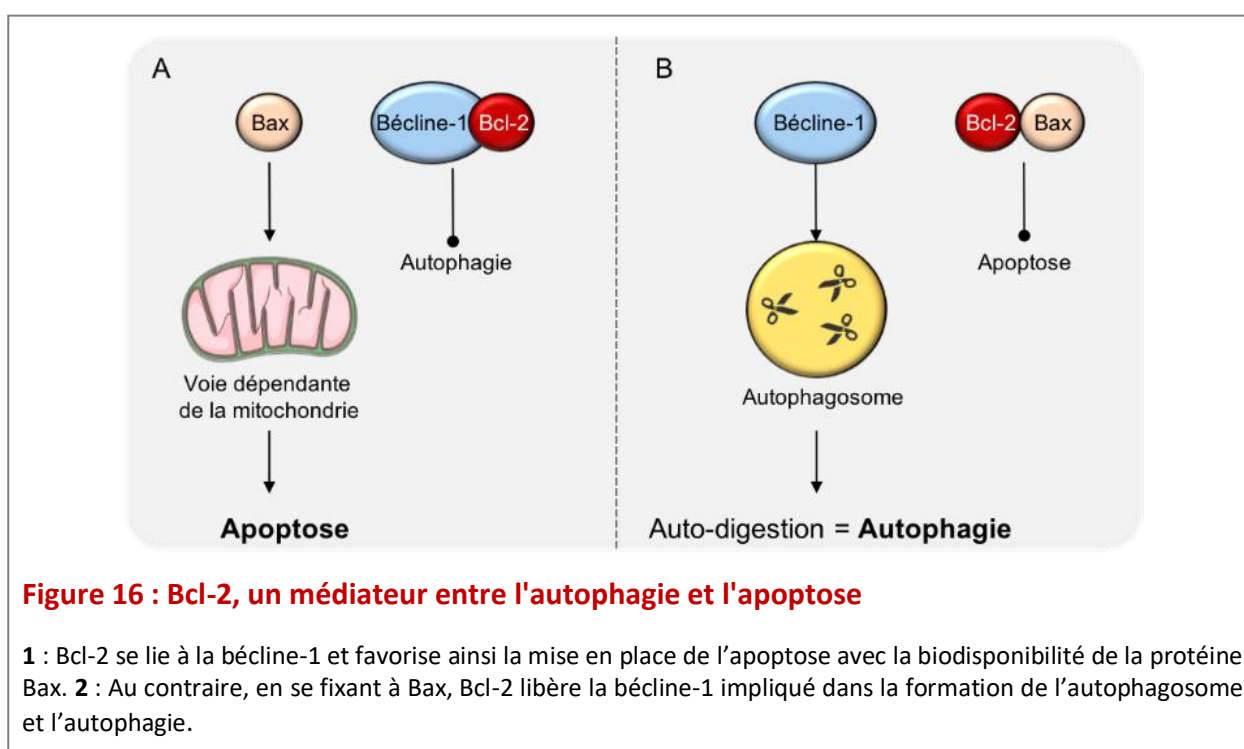
- **La catastrophe mitotique** a été décrite comme un processus intermédiaire qui précède la mort cellulaire apoptotique ou nécrotique (Galluzzi et al., 2018; Surova and Zhivotovsky, 2013). Ce processus se distingue par la formation de cellules géantes qui présentent plusieurs noyaux et/ou micronoyaux (Castedo et al., 2004; Rello-Varona et al., 2012). La catastrophe mitotique, également dénommée mort mitotique, est le résultat d'une mitose aberrante suite à des points de contrôle du cycle cellulaire non fonctionnels (Luber et al., 2012). La perte d'expression des protéines impliquées dans la transduction du signal des dommages à l'ADN comme ATR, ATM, Chk-1 ou Chk-2 favorise la catastrophe mitotique (Vogel et al., 2007). L'hyper-amplification du centrosome, observée après RT, peut également favoriser l'apparition d'une ségrégation chromosomique anormale et une mort par catastrophe mitotique (Dodson et al., 2007). En effet, le centrosome est un acteur majeur de la mitose puisque sa duplication et sa migration aux deux pôles de la cellule régissent le bon déroulement de la mitose.

Toutefois, il est difficile de distinguer la catastrophe mitotique de la sénescence. En effet, les cellules sénescents et les cellules en mort mitotique présentent une augmentation du volume cellulaire et nucléaire ainsi qu'une surexpression de la β -galactosidase (Galluzzi et al., 2018).

- **L'autophagie** est un processus d'auto-digestion des organelles par des vésicules nommées autophagosomes. La formation de ces autophagosomes est hautement régulée et sous la dépendance des protéines Atg (*autophagy-related protein*). L'activation de p53 *via* ATM est également impliquée dans la mise en place de l'autophagie *via* la transcription des sestrines qui activent la voie AMPK/TSC/mTOR (Budanov and Karin, 2008; Ryan, 2011). Cette activation de TSC (*tuberous sclerosis*) peut toutefois être également indépendante de p53.

Une autre voie également impliquée dans la mise en place de l'autophagie fait intervenir la bécline-1 qui permet la formation de l'autophagosome (Marquez and Xu, 2012).

Tout comme l'apoptose, l'autophagie est régulée par p53, cependant la distinction entre ces 2 types de mort est contrôlée par Bcl-2. En effet, si Bcl-2 se lie à la bécline-1, l'autophagosome ne peut être formé (**Figure 16-1**), en revanche si Bcl-2 est lié à Bax c'est alors l'apoptose qui est inhibée et la bécline-1 ainsi libérée peut permettre la formation de l'autophagosome (**Figure 16-2**). Cette balance entre Bcl-2/bécline-1 et Bcl-2/Bax serait sous la dépendance du stress du réticulum endoplasmique (**Chaurasia et al., 2016**). L'autophagie jouerait un double rôle puisqu'elle peut induire d'une part, la mort cellulaire mais d'autre part, une radiorésistance par élimination des dommages induits par les ROS et ainsi permettre l'adaptation des cellules en réponse aux RX (**Maier et al., 2016**).



- **La nécrose** se caractérise par un dysfonctionnement mitochondrial, une fragmentation de l'ADN et enfin une rupture de la membrane cellulaire qui permet la libération du contenu cellulaire dans l'espace environnant. Cette dernière caractéristique permet de distinguer l'apoptose de la nécrose. En effet, la nécrose contrairement à l'apoptose favorise une réaction inflammatoire (**Festjens et al., 2006**). La nécrose a été initialement décrite comme une mort non-contrôlée, cependant ce point semble être maintenant contesté. La nécrose serait activée en cas de non fonctionnalité de l'apoptose ou de l'autophagie. L'inhibition de ces deux morts cellulaires respectivement par des inhibiteurs de caspases et d'Atg-1 favoriserait le *switch* vers une mort nécrotique (**Golstein and Kroemer, 2007**).

De façon à optimiser la RT dans les GB, ce traitement est toujours associé à une CT.

III.3 La chimiothérapie

Historiquement, le traitement de CT de première ligne reposait sur l'administration de molécules nitroso-urées comme la lomustine ou la carmustine. Toutefois, depuis les années 2000, le traitement de CT pour les GB repose sur l'administration par voie orale de témozolomide (TMZ). Cet agent alkylant de seconde génération présente l'intérêt de franchir la BHE, même si celle-ci est altérée dans les GB, et possède une forte affinité pour le tissu tumoral (Alifieris and Trafalis, 2015).

III.3.1 Principe d'action du témozolomide

Le TMZ est administré sous forme de prodrogue et est directement converti à pH physiologique en MTIC (*monomethyl triazenoimidazole carboxamide*). Celui-ci est relativement instable et sera converti à son tour en deux composés inactifs, le AIC (*5-aminoimidazole-4-carboxamide*) et en *methyl-diazonium*. Ces cations de *methyl-diazonium* provoquent alors des réactions d'alkylation au niveau de l'ADN avec l'ajout de groupement méthyle sur la guanine en position N⁷, O⁶ et sur l'adénosine en position O³ (Figure 17). La méthylation de l'ADN a pour but de provoquer des mésappariements lors de la réplication de l'ADN, entraînant ainsi un arrêt du cycle dans le phase G2/M du cycle cellulaire puis la mort cellulaire (Mrugala and Chamberlain, 2008).

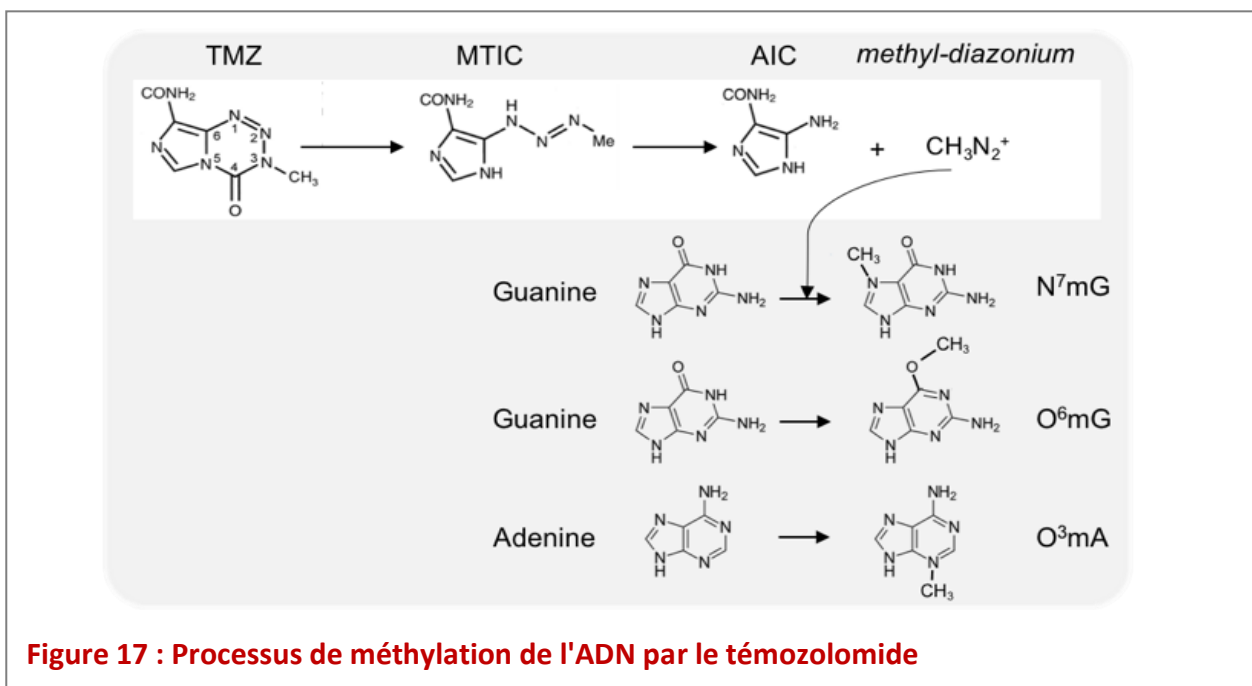


Figure 17 : Processus de méthylation de l'ADN par le témozolomide

III.3.2 Réparation des dommages induits par le témozolomide

La réparation des dommages chimio-induits est prise en charge par l'enzyme MGMT ou le système de réparation MMR en cas de mésappariement de l'ADN (Daniel et al., 2019). Cependant, comme mentionné en début d'introduction, l'hyperméthylation du gène *MGMT* retrouvée fréquemment dans les GB (sporadique ou suite à la mutation des gènes *IDH*) conduit à une répression transcriptionnelle du gène, empêchant ainsi la réparation des dommages à l'ADN. Cette modification épigénétique se traduit alors par une meilleure réponse à cette CT. Dès lors que les dommages à l'ADN sont détectés, comme pour la RT, les cascades de signalisation ATM/Chk-2 et ATR/Chk-1 sont activées afin de faciliter un arrêt du cycle cellulaire (Oshige et al., 2010). Celui-ci est préférentiellement retrouvé dans la phase G2/M du cycle cellulaire et semble être dépendant de la voie ATR/Chk1 qui inactive la Cdc25c et donc l'expression du complexe Cycline-B/CDK-1, responsable de la transition G2/M (Aasland et al., 2018; Hirose et al., 2001). Si les dommages persistent, les mécanismes de mort cellulaire sont déclenchés.

III.3.3 Processus de morts cellulaires après traitement au témozolomide

Les mécanismes de mort induits par le TMZ sont complexes avec une relation étroite et séquentielle entre trois processus que sont l'autophagie, l'apoptose et la sénescence. Aucune de ces morts ne sera observée en présence de l'enzyme MGMT.

- **L'autophagie** : Knizhnik et al., ont montré sur des cellules de GB exposées au TMZ que l'activation de la voie ATM induit le processus d'autophagie (Knizhnik et al., 2013). Ce processus de mort, observé dans d'autres études, est associé à une augmentation de l'expression des protéines caractéristiques de l'autophagie comme la bécline-1, Atg-5 ou LC3-II (Cheng et al., 2012; Kanzawa et al., 2003).
- **La mort par apoptose** a également été mise en évidence après un traitement au TMZ. Néanmoins celle-ci est plus tardive et est inhibée par l'autophagie dont l'apparition est plus précoce (Knizhnik et al., 2013; Roos et al., 2007). En effet, l'inhibition d'ATM par du 3-méthyladénine (3-MA) provoque une augmentation de cellules apoptotiques (Knizhnik et al., 2013). Comme pour les morts radio-induites, la relation entre l'autophagie et l'apoptose, observée après traitement par TMZ, ferait intervenir le duo Bcl-2/bécline-1 (**Figure 16**).

- **La sénescence** : celle-ci implique ATR. Suite à une exposition des cellules au TMZ, ATR active p53 et secondairement p21 qui induit l'entrée en sénescence des cellules. Parallèlement, ATR favorise la sénescence de phénotype SASP, en activant le facteur de transcription NF- κ B et ses gènes cibles tels que les gènes *IL-6* et *IL-8* (Aasland et al., 2018). Par ailleurs, le facteur NF- κ B s'oppose à l'apoptose chimio-induite en favorisant l'expression de protéines anti-apoptotiques.

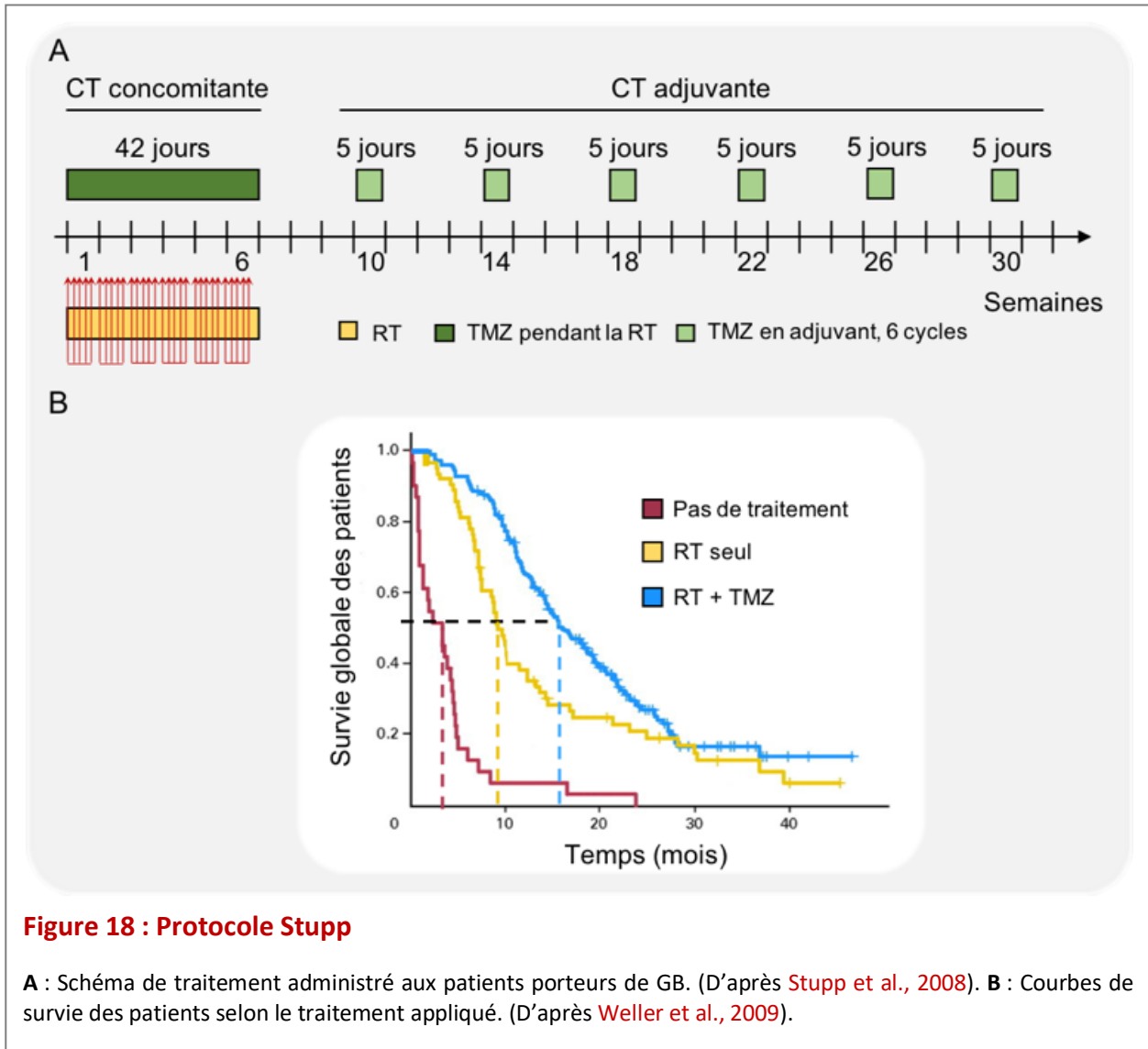
Outre ATR, la sénescence peut également être induite par la voie ATM. Cette dernière favorise, en effet, l'autophagie mais celle-ci ne serait qu'une « mort » intermédiaire avant la sénescence qui intervient plus tardivement. En effet, l'inhibition de l'autophagie diminue fortement la sénescence cellulaire et favorise la mise en place de l'apoptose (Knizhnik et al., 2013).

Bien que le TMZ puisse entraîner la mort cellulaire, l'intérêt de cette CT réside dans son effet radiosensibilisant. En effet, l'administration du TMZ permet de bloquer les cellules tumorales dans la phase G2/M du cycle cellulaire, phase durant laquelle les cellules seront plus sensibles à la RT (Dillon et al., 2014). Cette administration concomitante de CT et de RT, qui a démontré son efficacité sur des modèles pré-cliniques de GB, est utilisée en clinique et demeure le traitement de référence des GB sous la dénomination de protocole « Stupp » (Stupp et al., 2005).

III.4 Le protocole Stupp

Actuellement et depuis 2005, après la chirurgie, les patients reçoivent une administration de TMZ concomitante au traitement de RT. Ce protocole dit « Stupp » se décompose comme indiqué sur la **Figure 18A** (Stupp et al., 2005) :

- Une RT à la dose de 2 Gy (Gray) répétée 5 jours/semaine sur 6 semaines, soit une dose totale de 60 Gy en association au TMZ à la dose de 75 mg/m² de surface corporelle.
- Une CT adjuvante de 150 à 200 mg/m² de surface corporelle administrée pendant 6 cycles de 5 jours/semaine, chaque cycle étant espacé de 4 semaines.



Le protocole Stupp a permis d'améliorer la médiane de vie des patients à 14,6 mois par comparaison à la RT seule qui elle-même présente un avantage non négligeable par rapport aux patients n'ayant reçu aucun traitement (**Figure 18B**) ([Stupp et al., 2009](#); [Weller et al., 2009](#)).

Toutefois, une récurrence est inévitable. En effet, les caractéristiques intrinsèques des cellules de GB font de ces dernières des cellules résistantes aux traitements de RCT.

Parmi ces mécanismes de résistance intrinsèque, on peut citer les défenses anti-oxydantes particulièrement présentes dans les cellules de GB et qui s'opposent à la génération de ROS, l'augmentation d'expression des systèmes de détection et de réparation des dommages à l'ADN et enfin une résistance aux processus de mort cellulaire avec par

exemple les mutations de p53, voie particulièrement impliquée dans le devenir cellulaire (Engelmann and Pützer, 2010; Otomo et al., 2004; Smith-Pearson et al., 2008). De plus, les CSG sont également considérées comme extrêmement résistantes aux traitements de CT et de RT. Ces CSG permettent ainsi de maintenir un « pool » de cellules cancéreuses et favorisent la récurrence tumorale (Stiles and Rowitch, 2008).

Outre les propriétés propres aux cellules tumorales et aux CSG, de nombreuses études ont montré l'importance du microenvironnement dans le développement tumoral mais aussi dans la réponse aux traitements. En effet, ce microenvironnement qui se définit comme un ensemble cellulaire, moléculaire et physicochimique joue un rôle majeur dans le développement tumoral (Swartz et al., 2012). Ce système complexe et dynamique entretient des interactions constantes et bidirectionnelles entre le microenvironnement et les cellules tumorales. Ainsi, dans les GB, l'hypoxie, la vascularisation tumorale et la réponse inflammatoire sont autant d'acteurs susceptibles de moduler non seulement les capacités de développement de ces tumeurs mais aussi leur réponse au traitement.

Nous décrivons les propriétés de chacun de ces 3 compartiments dans la suite de ce manuscrit.

PARTIE 2

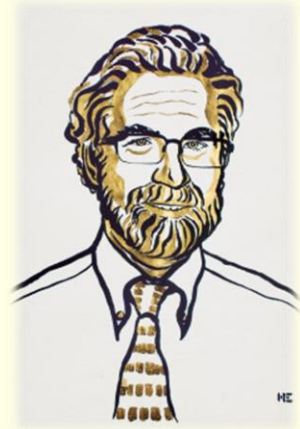
L'HYPOXIE



William G. Kaelin Jr



Sir Peter J. Ratcliffe



Gregg L. Semenza

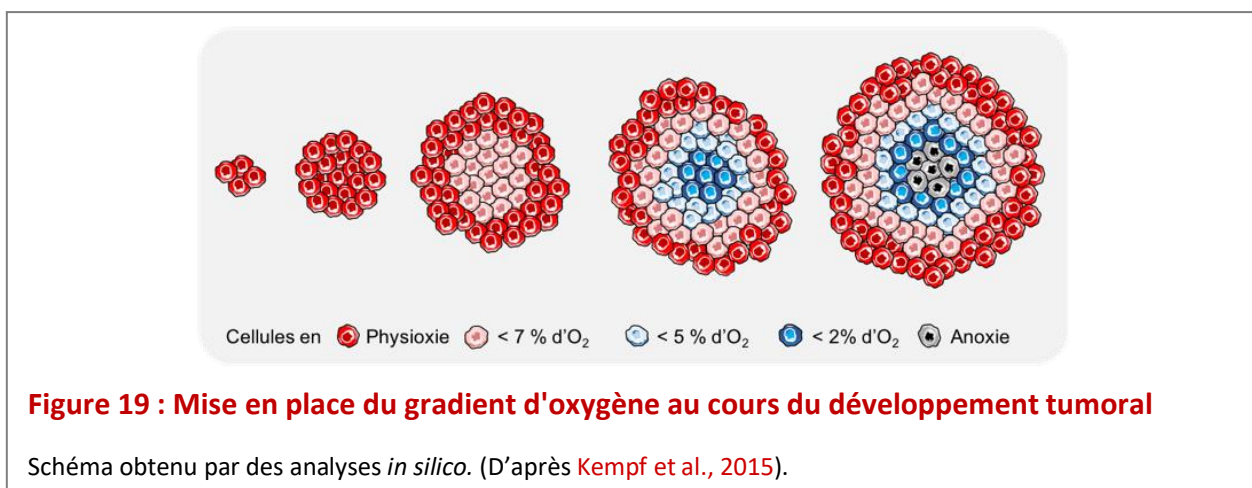
Partie 2 : L'hypoxie

I. Définition

L'hypoxie se définit, comme une inadéquation entre l'apport et la consommation d'oxygène. Différents niveaux d'hypoxie peuvent être retrouvés dans les tissus mais aussi les tumeurs (Koh and Powis, 2012) :

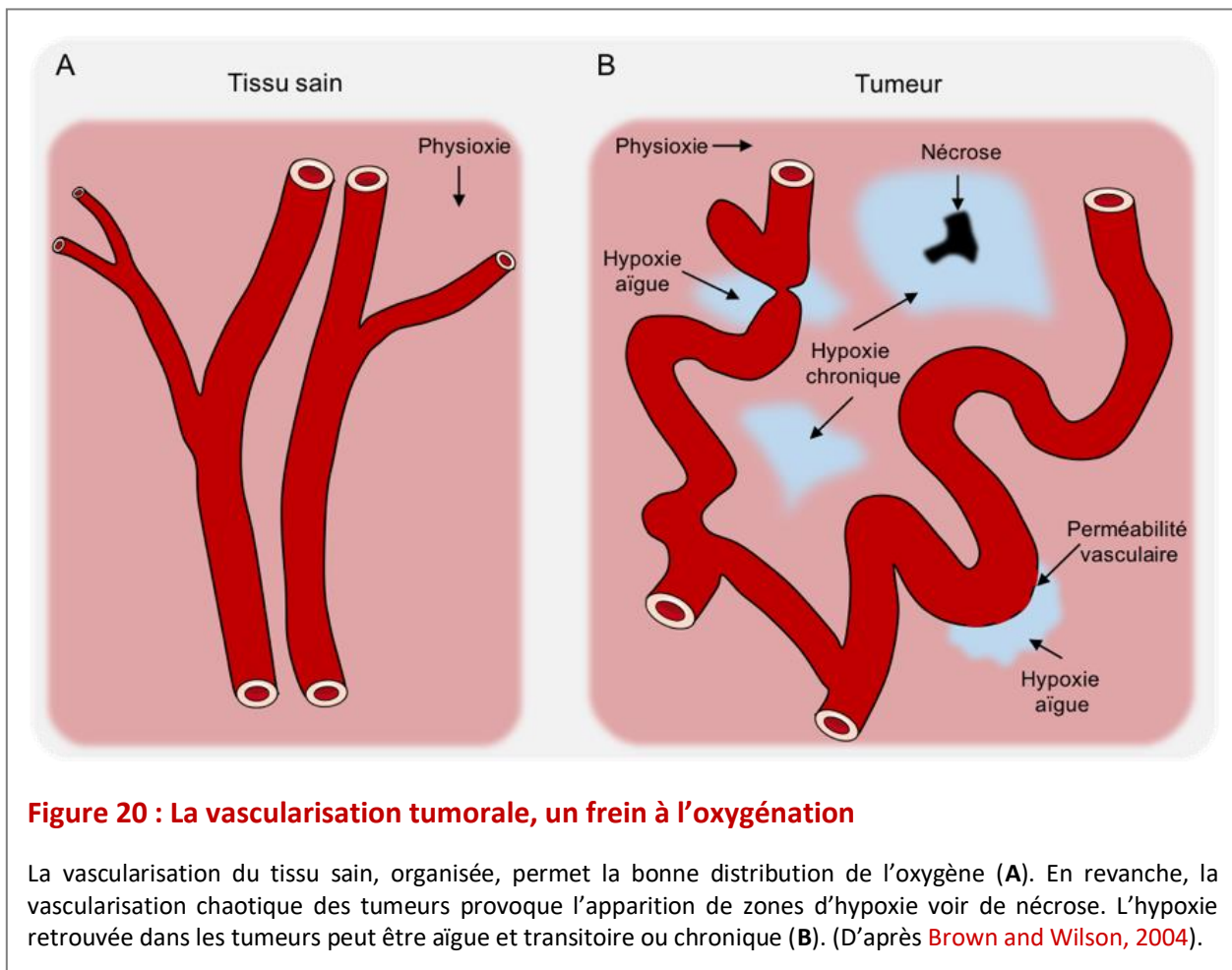
- La normoxie correspond à la pression en oxygène (pO_2) atmosphérique, soit 160 millimètres de mercure (mmHg) ou 21 % d'oxygène.
- La physioxie correspond à la pression en oxygène des tissus (ptO_2) en conditions physiologiques. Cette ptO_2 s'étend selon les tissus entre 15 et 68 mmHg soit entre 2 et 9 % d' O_2 . Lorsque la ptO_2 diminue en dessous des conditions physiologiques, on parle alors d'hypoxie.
- L'hypoxie peut être également subdivisée selon la sévérité de celle-ci. On peut retrouver une hypoxie modérée quand les tissus ont une pression en oxygène comprise entre 8 et 15 mmHg soit entre 1 et 5 % d' O_2 . En deçà de 1 % d' O_2 , l'hypoxie est considérée comme sévère. Enfin, on peut parler d'anoxie en absence ou quasi absence d' O_2 (<0,1 % d' O_2).

La présence de zones hypoxiques est une caractéristique de nombreuses tumeurs solides, dont le GB, dans lequel la ptO_2 moyenne avoisine 1 % d' O_2 avec des régions pouvant atteindre 0,2 % d' O_2 (Rampling et al., 1994; Vaupel and Mayer, 2007). L'hypoxie se met en place progressivement lors du développement tumoral avec notamment la prolifération des cellules qui limite ainsi la diffusion de l'oxygène de par la densité cellulaire (Figure 19), mais aussi par une vascularisation anormale (Figure 20), limitant la perfusion des vaisseaux en sang oxygéné (Kempf et al., 2015).



Selon leur origine et leur localisation, on distingue deux catégories d'hypoxie (**Figure 20**) (Brown and Wilson, 2004; Yeom et al., 2012) :

- L'hypoxie aigüe est la résultante d'une vascularisation chaotique dans la tumeur. En effet, les anomalies structurales des vaisseaux tumoraux induisent des fluctuations de la perfusion sanguine. Cela donne lieu à des zones d'hypoxie transitoires à proximité des vaisseaux (Dewhirst, 2007).
- L'hypoxie chronique est la résultante de l'éloignement des cellules aux vaisseaux. Les cellules se situant entre 50 et 100 μm d'un vaisseau sanguin vont avoir un apport en oxygène nécessaire seulement pour la survie cellulaire. La diffusion de l'oxygène est limitée entre 100 et 200 μm d'un vaisseau et provoque au-delà de cette distance des zones d'anoxie voir de nécrose, avec une mort inévitable des cellules (Dewhirst, 2007; Forster et al., 2017).



II. L'hypoxie : un facteur prépondérant dans les glioblastomes

II.1 Mise en évidence de l'hypoxie dans les glioblastomes

La mise en évidence de l'hypoxie est un élément essentiel dans le diagnostic et la réponse à la RT.

Plusieurs techniques existent afin d'évaluer l'oxygénation d'un tissu. La première consiste à évaluer l'oxygénation de la tumeur pendant l'acte chirurgical à l'aide d'une sonde polarographique sensible à l'O₂. Cette technique, bien qu'extrêmement invasive, a permis de mettre en évidence dans les GB, des ptO₂ proches de 0,2 % d'O₂ (soit 1,6 mmHg) (Rampling et al., 1994).

L'hypoxie peut également être mise en évidence de façon indirecte suite à l'analyse des pièces opératoires par l'utilisation de marqueurs endogènes, HIF-1α ou CAIX (anhydrase carbonique IX), ou exogène (injection de pimonidazole aux patients, 24 h avant opération) (Bekaert et al., 2017; Evans et al., 2010). Toutefois, ces techniques d'immunomarquages qui reposent sur l'analyse de pièces opératoires ont des seuils de sensibilité différents et ne rendent pas compte de l'hétérogénéité intratumorale.

Cependant, avec les avancées récentes dans le domaine de l'imagerie médicale, l'IRM et plus encore la tomographie par émission de positons (TEP) permettent de visualiser l'hypoxie tumorale de façon moins invasive mais également de façon plus globale. Dans cet objectif, l'examen par TEP repose sur l'injection d'un radiotracer sélectif pour l'hypoxie.

Le radiotracer le plus communément utilisé et le mieux caractérisé actuellement pour la détection de l'hypoxie est le [¹⁸F]-Fluoromisonidazole ([¹⁸F]-FMISO). En effet, le [¹⁸F]-FMISO est extrêmement sensible à l'oxygénation du tissu et permet de détecter des zones d'hypoxies sévères autour de 1 % d'O₂ (soit 8 mmHg). Ce radiotracer, au regard de sa sensibilité et de sa stabilité est utilisé pour différencier les différents grades de gliomes, notamment entre le gliome de grade III et le GB (Figure 21A) (Bekaert et al., 2017; Kawai et al., 2014). Toutefois, le [¹⁸F]-FMISO présente une demi-vie relativement courte (110 min) et un faible rapport signal/bruit (Padhani et al., 2007), c'est pourquoi, de nombreux radiotraceurs sont actuellement en cours de développement et de validation comme le [¹⁸F]-EF5, le [⁶⁴Cu]-ATSM ou encore le [¹⁸F]-FLUSONIM (Koch et al., 2010; Perrio, 2018; Tateishi et al., 2013).

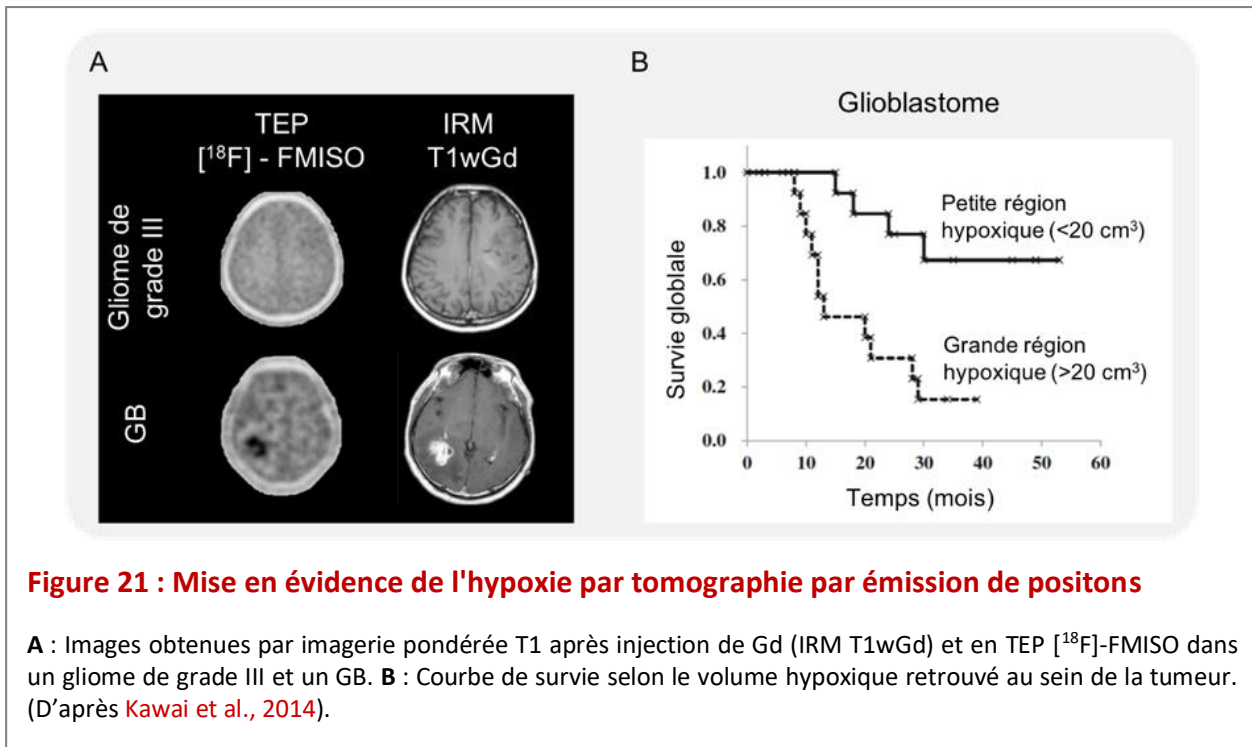


Figure 21 : Mise en évidence de l'hypoxie par tomographie par émission de positons

A : Images obtenues par imagerie pondérée T1 après injection de Gd (IRM T1wGd) et en TEP [¹⁸F]-FMISO dans un gliome de grade III et un GB. **B** : Courbe de survie selon le volume hypoxique retrouvé au sein de la tumeur. (D'après Kawai et al., 2014).

II.2 L'hypoxie, un marqueur diagnostique des glioblastomes

L'hypoxie est une caractéristique majeure des GB. Cependant, elle présente une hétérogénéité intrapatient mais aussi interpatient. Plusieurs études ont montré une corrélation entre l'hypoxie tumorale et la survie des patients. Ainsi, il a pu être mis en évidence que les patients présentant des régions hypoxiques sévères avaient une survie globale plus faible que les patients présentant de faibles régions hypoxiques (**Figure 21B**) (Bekaert et al., 2017; Kawai et al., 2014; Spence et al., 2008).

Ces données soulignent l'importance de l'hypoxie dans la physiopathologie des GB. En effet, en réponse à ces changements d'oxygénation, les cellules de GB, s'adapteront et développeront différents mécanismes moléculaires et cellulaires afin de favoriser leur survie et leur capacité à proliférer.

II.3 Adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie

II.3.1 Les réponses à l'hypoxie à l'échelle moléculaire

II.3.1.1 Les facteurs HIFs

Au niveau cellulaire, la réponse à l'hypoxie est principalement sous la dépendance des facteurs de transcription HIFs (*hypoxia inducible factor*). Les facteurs HIFs sont des hétérodimères composés d'une sous-unité α , dépendante de l'oxygène et d'une sous-unités

β , autrement appelée ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) et qui est exprimée de façon constitutive par la cellule. Les sous-unités α sont au nombre de trois (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) et les sous-unités β présentent, quant à elles, deux isoformes (HIF-1 β et HIF-2 β) (Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2009).

Structurellement (**Figure 22**), les sous-unités HIF- α possèdent une structure bHLH (*basic helix loop helix*) permettant la fixation à des séquences spécifiques de l'ADN appelées séquences HRE (*hypoxia responsive element*), un domaine PAS (PER-ARNT-SIM) impliqué dans la dimérisation des facteurs et des domaines TAD (*terminal transactivation domain*), permettant l'activité transcriptionnelle. Les sous-unités HIF- α ont la particularité de présenter des séquences ODDD (*oxygen-dependent degradation domain*). Or, ce sont ces séquences qui sont responsables de leur dégradation en présence d'oxygène (Masoud and Li, 2015).

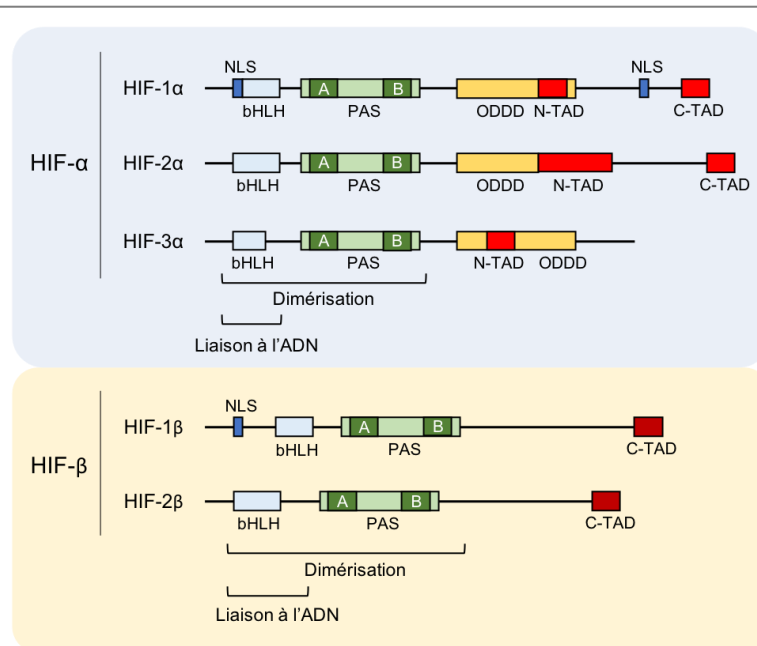


Figure 22 : Structure des isoformes HIF- α et HIF- β

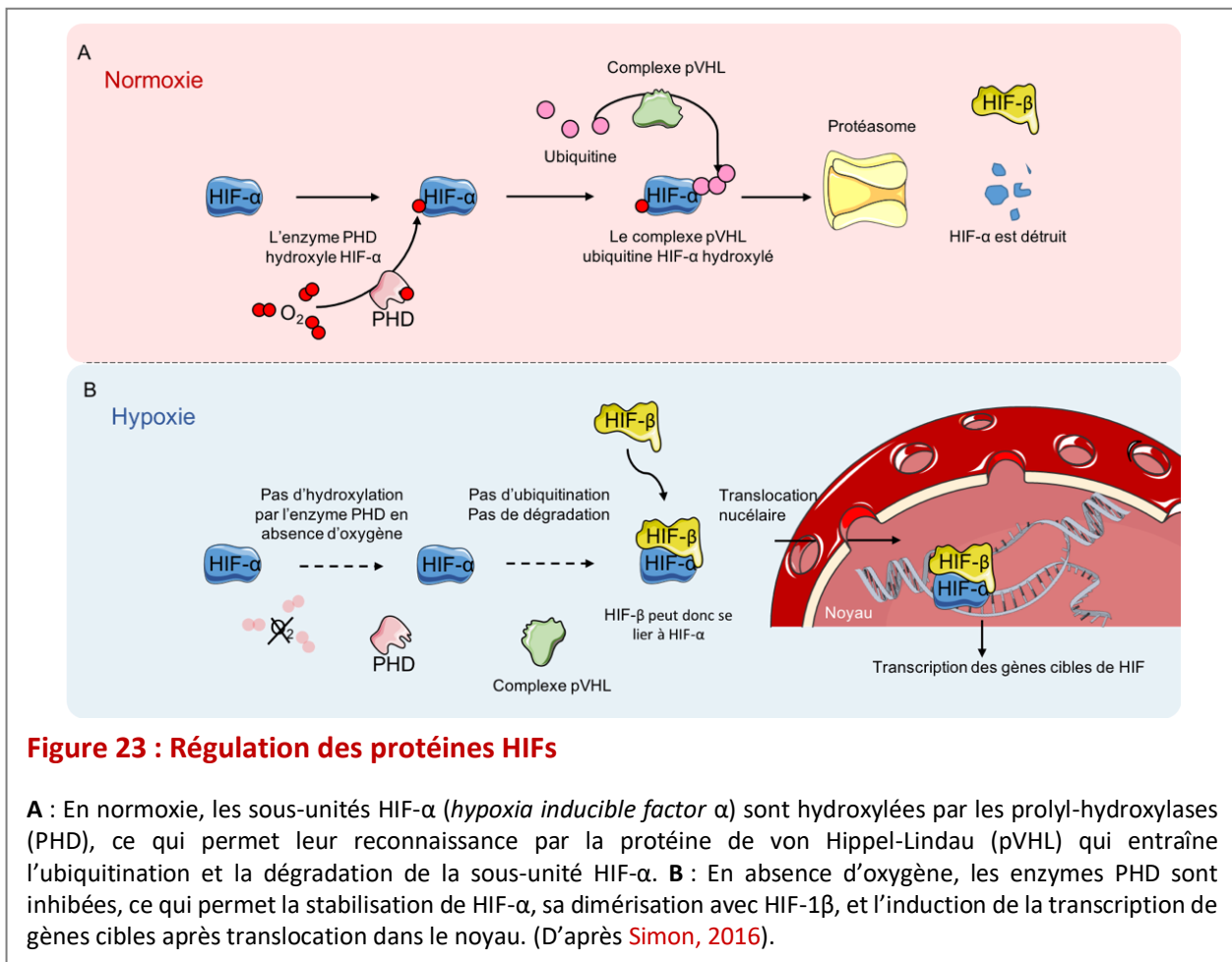
Les sous-unités HIF- α dépendantes de l'oxygène se distinguent des sous-unités HIF- β constitutives, par la présence d'un domaine ODDD (*oxygen-dependent degradation domain*) responsables de leur dégradation en présence d'oxygène. (D'après Brahimi-Horn and Pouyssegur, 2009).

Historiquement, le facteur HIF-1 α a été identifié pour la première fois en 1992 (Semenza and Wang, 1992). Ce n'est toutefois qu'en 2019 que William Kaelin Jr, Sir Peter Radcliffe et Greg Semenza se sont vu attribués le prix Nobel de médecine pour avoir mis en exergue le mécanisme d'adaptation des cellules en hypoxie par le facteur HIF-1 α .

II.3.1.2 Régulation des HIFs

La stabilité des HIFs dépend de l'oxygénation (Simon, 2016).

- En présence d'oxygène (**Figure 23A**), les prolyl-hydroxylases (PHD), dont l'activité enzymatique est dépendante de l'O₂ et du Fe²⁺, vont hydroxyler les sous-unités α sur leur domaine ODDD riche en résidus lysine et proline. L'hydroxylation des sous-unités HIF-α permet ainsi leur reconnaissance par la protéine von Hippel-Lindau (VHL) qui entraîne leur ubiquitination puis leur dégradation par le protéasome.
- En revanche, en absence d'oxygène (**Figure 23B**), suite à l'inactivation des PHD, les sous-unités HIF-α ne peuvent être hydroxylées, et ne peuvent donc pas être dégradées par le protéasome. Ainsi, les sous-unités HIF-α seront stabilisées dans le cytoplasme de la cellule, et pourront former des dimères avec les sous-unité HIF-1β. Ces dimères subiront alors une translocation dans le noyau, grâce aux séquences *nuclear localization signal* (NLS) et exerceront leurs activités transcriptionnelles après liaison aux séquences HRE situées en amont de certains gènes.

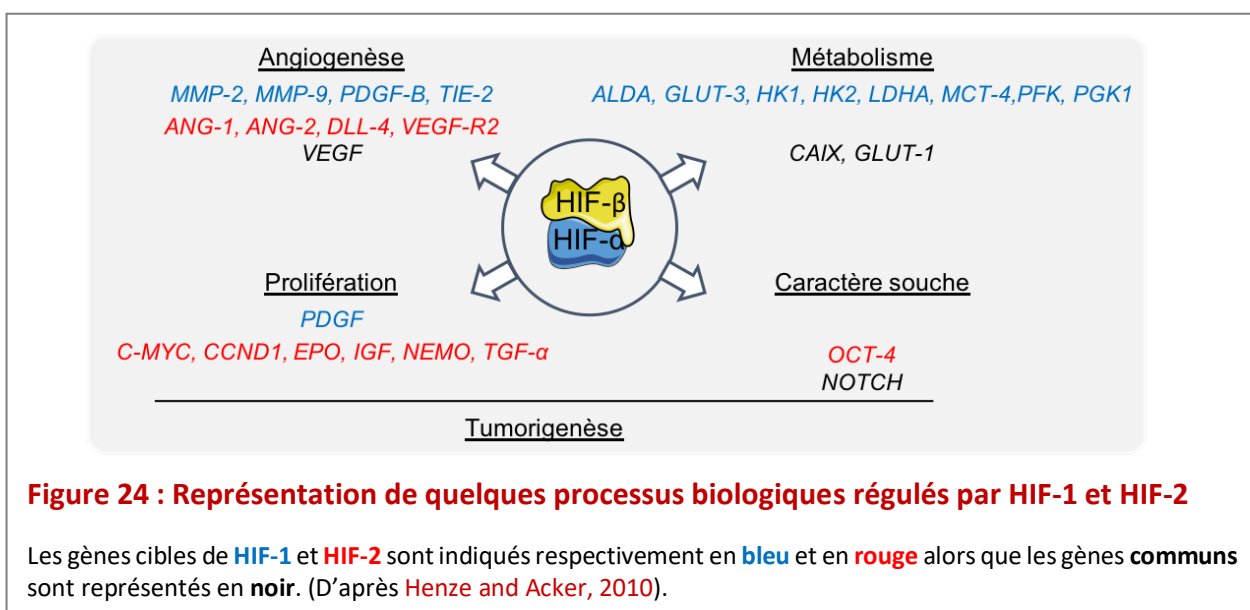


Bien que leur régulation soit identique et que leurs cibles soient les séquences HRE, il existe des différences entre les sous-unités HIF-1 α et HIF-2 α . HIF-1 α serait plutôt stabilisée lors d'hypoxie sévère (< à 1 % d'O₂) et aiguë (< à 24h), alors que HIF-2 α serait activé lors d'hypoxie modérée (< à 5 % d'O₂) et chronique (48-72h) (Bordji et al., 2014; Koh and Powis, 2012). Il faut par ailleurs noter que l'expression de HIF-1 et/ou HIF-2 peut dépendre du type cellulaire (Keith et al., 2012).

II.3.1.3 Les gènes cibles des HIFs

Comme mentionné ci-dessus les gènes cibles inductibles par les HIFs doivent présenter dans leur région régulatrice UTR (*untranslated transcribed region*), une séquence HRE consensus 5'-NCGTG-3' (où N correspond à une base purique A ou G).

De façon non exhaustive, HIF-1 α et HIF-2 α peuvent transactiver des gènes identiques impliqués principalement dans l'angiogenèse et le métabolisme tel est le cas du facteur VEGF (*vascular endothelial growth factor*), de l'enzyme CAIX ou encore du transporteur GLUT-1 (*glucose transporter-1*). Cependant, HIF-1 α et HIF-2 α peuvent réguler des gènes cibles spécifiques suivant les co-facteurs auxquels ils vont se lier (Pawlus and Hu, 2013). De façon simplifiée, les gènes cibles de HIF-1 α sont principalement impliqués dans la glycolyse alors que les gènes cibles de HIF-2 α sont d'avantage impliqués dans la tumorigenèse (Figure 24) (Henze and Acker, 2010; Keith et al., 2012; Pawlus and Hu, 2013). Toutefois, cette liste de gènes n'est pas exhaustive et le nombre de gènes cibles régulés par les HIFs ne cesse d'augmenter.



Au regard du nombre de gènes qu'ils régulent, les facteurs HIFs participent à un grand nombre de processus qui contribueront à la progression tumorale en agissant aussi bien sur les cellules tumorales, que sur le microenvironnement tumoral.

II.3.2 Les réponses à l'hypoxie à l'échelle cellulaire

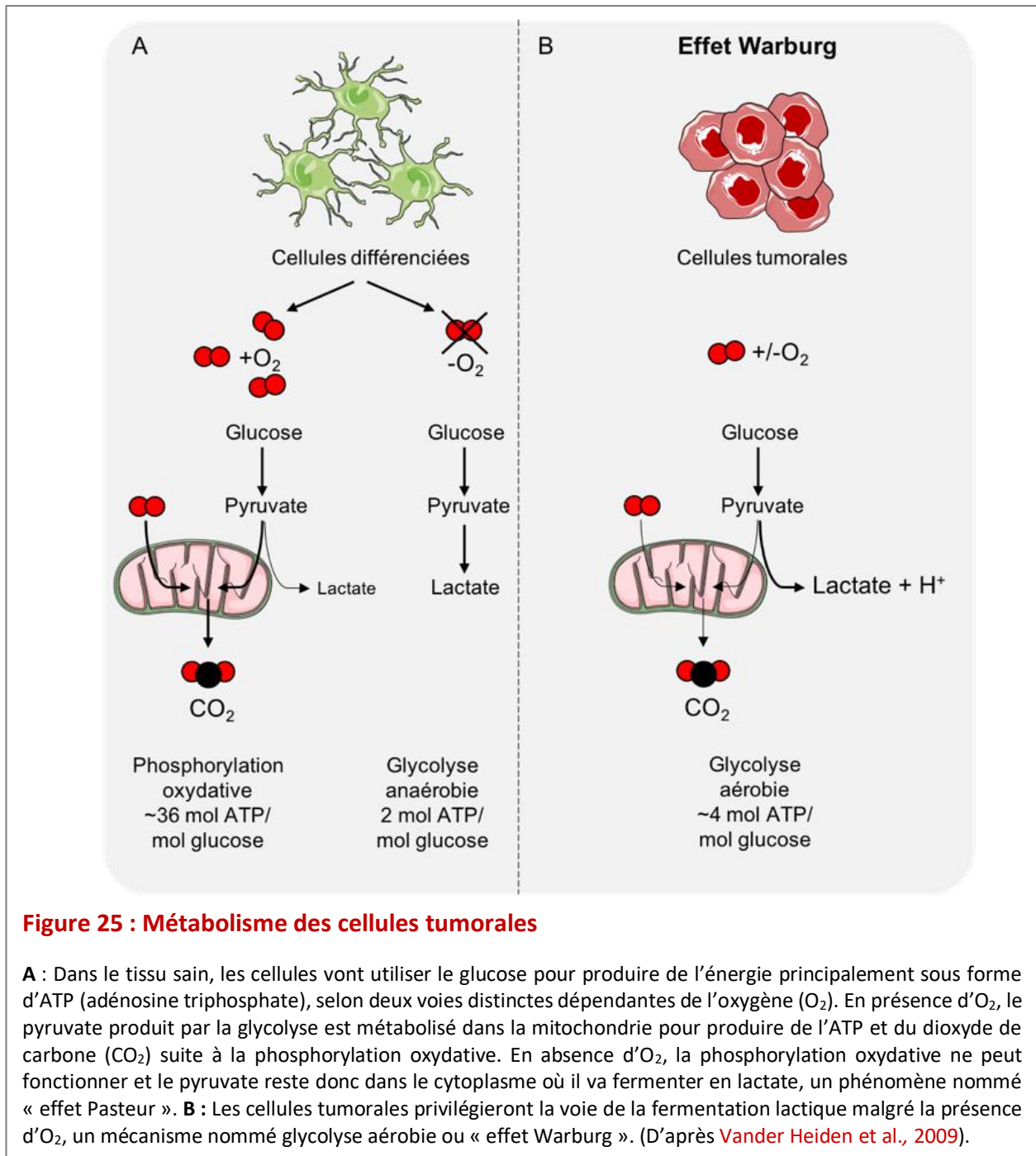
II.3.2.1 Effets de l'hypoxie sur la prolifération des cellules tumorales

Selon le degré de sévérité de l'hypoxie, les effets de l'hypoxie sur la prolifération cellulaire ne semblent pas identiques.

L'hypoxie modérée, qui est la plus souvent observée dans les GB, favorise la prolifération cellulaire. Parmi les gènes cibles de HIF, on retrouvera des gènes codant pour des facteurs de croissance comme le facteur de croissance *IGF* (*insulin-like growth factor*), le facteur *PDGF* (*platelet-derived growth factor*) ou l'*EPO* (érythropoïétine) qui sont des facteurs mitogènes pour les cellules de GB (Clara et al., 2014; Mori et al., 2016; Pérès et al., 2014). En revanche, une hypoxie sévère diminue la prolifération cellulaire. En effet, dans ces conditions HIF induit l'expression des protéines inhibitrices du cycle cellulaire comme p21 (Goda et al., 2003).

II.3.2.2 Effets de l'hypoxie sur le métabolisme des cellules tumorales

Les cellules tumorales de GB, comme toutes autres cellules tumorales, présentent un métabolisme énergétique particulier distinct de celui des cellules saines différenciées (**Figure 25A**). En effet, que ce soit en présence ou en absence d'oxygène, les cellules tumorales privilégient la glycolyse aérobie, qui génère une production accrue de protons (H⁺) et de lactate, on parle de l'effet Warburg (**Figure 25B**) (Vander Heiden et al., 2009). Dans les conditions d'hypoxie, cet effet Warburg est renforcé par la surexpression HIF-dépendante des transporteurs du glucose GLUTs, des enzymes de la voie de la glycolyse et de LDHA (lactate déshydrogénase A), enzyme impliquée dans la conversion du pyruvate en lactate (Colwell et al., 2017; Semenza, 2010).



Le lactate et les protons, ainsi produits, acidifient le milieu intracellulaire (**Figure 26**). En réponse à cette acidose, les cellules tumorales s'adapteront en surexprimant de nombreuses protéines exportatrices afin de transporter ces composés néfastes dans l'espace extracellulaire. En conditions d'hypoxie, on retrouve effectivement une surexpression des échangeurs Na⁺/H⁺, Cl⁻/HCO₃⁻, des récepteurs comme les transporteurs de monocarboxylates (MCTs) ou encore l'enzyme CAIX.

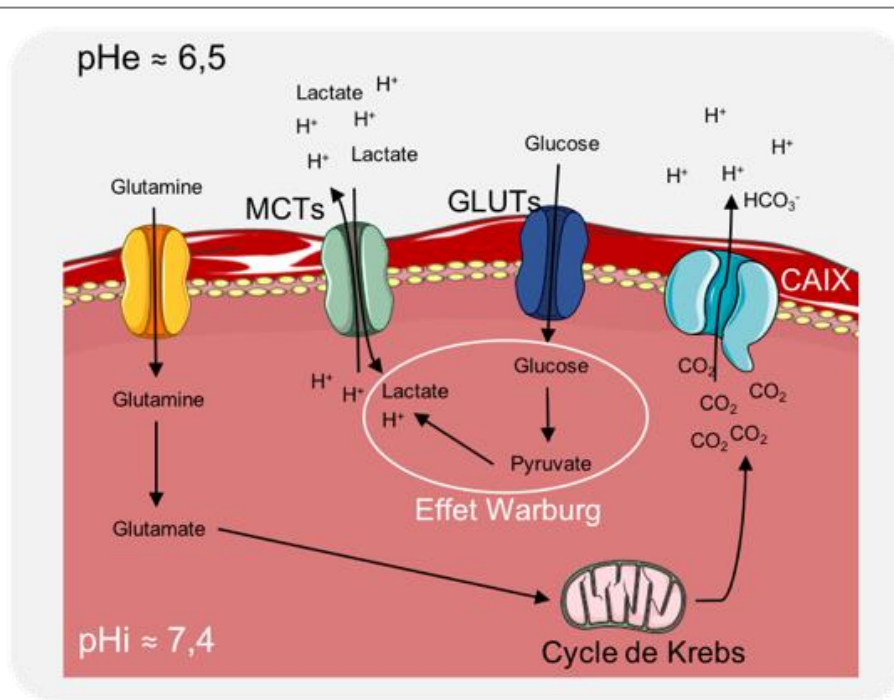


Figure 26 : Effets de l'hypoxie sur le pH

Le métabolisme des cellules tumorales induit une acidification du milieu extracellulaire qui est d'autant plus prononcée en condition d'hypoxie. En effet, l'hypoxie augmente l'expression des transporteurs MCTs, GLUTs et de l'enzyme CAIX, qui contribuent à l'acidification du milieu extracellulaire.

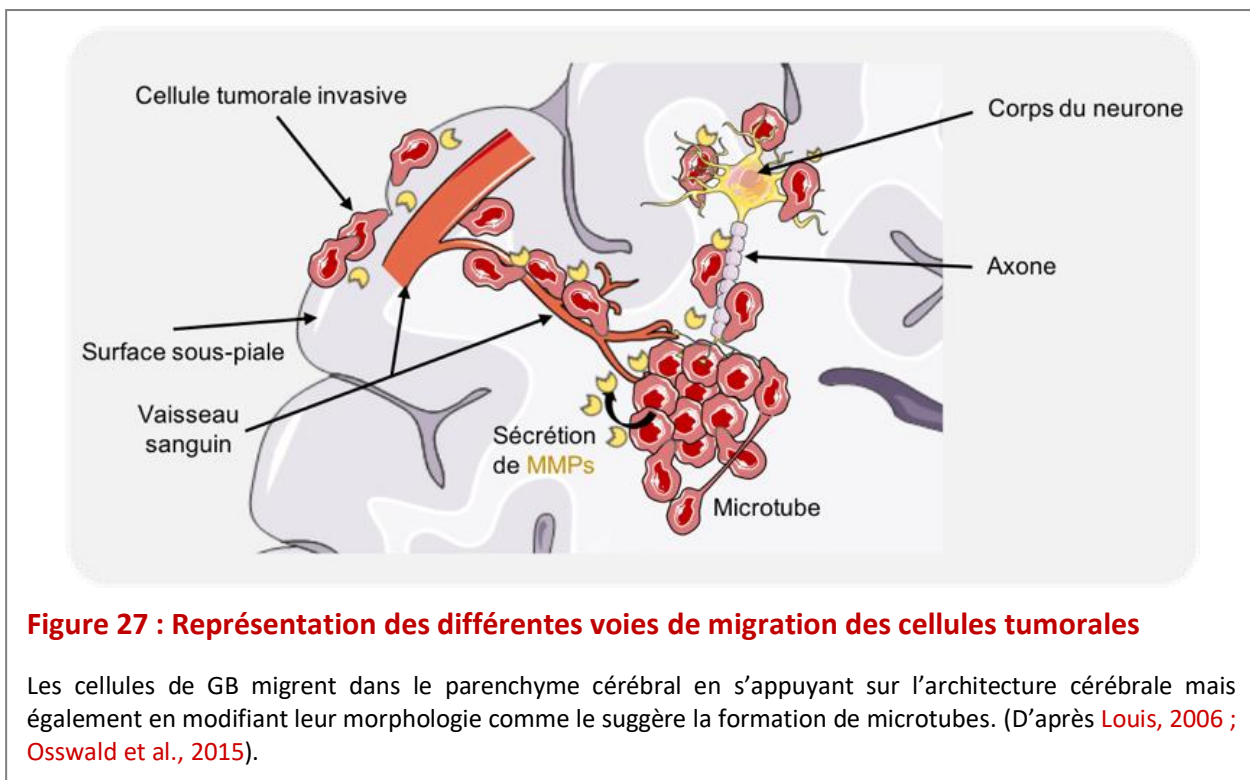
Une fois acheminés dans le milieu extracellulaire *via* les transporteurs cités ci-dessus, ces différents ions et métabolites sont normalement pris en charge par le réseau vasculaire. Or, dans ce contexte de GB, la vascularisation anormale, entraîne une stagnation de ces composés dans l'espace extracellulaire ce qui conduit ainsi à l'acidification du milieu, pouvant atteindre des valeurs de pH proches de 6,5 comme il a été montré expérimentalement dans un modèle de GB murin (Coman et al., 2016). Cette acidification du milieu extracellulaire favorisera la prolifération cellulaire, l'invasion, l'angiogenèse, l'immunosuppression mais aussi la résistance à la RT et à la CT (Reichert et al., 2002; Vaupel, 2010).

II.3.2.3 Effets de l'hypoxie sur l'invasion des cellules tumorales

Les GB sont des tumeurs extrêmement diffuses dans le parenchyme cérébral, de par la capacité d'invasion des cellules de GB. Bien que les métastases issues de GB ne soient que très rarement observées, l'équipe de Gao et al, a récemment montré l'existence de cellules tumorales circulantes dans le sang périphérique des patients suggérant l'initiation d'un phénomène métastatique (Gao et al., 2016).

L'infiltration des cellules tumorales est étroitement liée à leur capacité de sécrétion de nombreuses protéases (Ferrer et al., 2018). Ces protéases MMPs en dégradant la matrice extracellulaire (MEC) permettront aux cellules d'envahir le tissu environnant selon 5 voies préférentielles (Figure 27).

Ainsi, les cellules de GB pourront migrer de façon diffuse à travers la MEC, le long de la surface sous piaie, le long des fibres de substances blanches mais aussi le long des vaisseaux sanguins (Cuddapah et al., 2014; Louis, 2006; Seano and Jain, 2020). Plus récemment, la découverte des nanotubes et des microtubes tumoraux a permis de décrire un nouveau mécanisme d'invasion pour les cellules de GB en générant des protrusions cellulaires, pouvant aller jusqu'à 500 µm de distance (Osswald et al., 2015).



Le microenvironnement et notamment l'hypoxie est un acteur majeur dans l'invasion tumorale. En effet, HIF-1 est un puissant régulateur de l'invasion cellulaire puisqu'il favorise l'expression de molécules impliquées dans le détachement cellulaire, dans la dégradation de la MEC et encore dans l'invasion. Parmi ces molécules, on retrouve la MMP-2, la cathepsine D, l'uPA (*urokinase plasminogen activator*), la vimentine ou la fibronectine.

L'hypoxie n'impacte pas seulement les cellules tumorales « différenciées ». L'existence et le devenir des CSG présentes dans l'environnement tumoral peuvent également être influencés par cette diminution d'oxygène.

II.3.3 L'hypoxie et cellules souches

II.3.3.1 Notion de niche tumorale

Les CSG sont retrouvées dans un écosystème spécifique, appelé « niche », qui génère un environnement idéal au maintien du phénotype souche des CSG. Plusieurs niches ont été décrites pour les CSG (**Figure 28**).

- **Niche hypoxique**

Ces niches (**Figure 28A**) sont préférentiellement retrouvées aux abords des zones de nécrose. En effet, l'absence d'oxygène semble être un élément déterminant dans la survie et dans l'auto-renouvellement des CSG (**Soeda et al., 2009**). Les facteurs HIFs contrôlent effectivement plusieurs processus impliqués dans les CSG. Par exemple, ils participent au maintien de l'état souche des CSG, notamment en activant la voie Notch (**Lino et al., 2010**). D'autre part, la stabilisation et l'activation de HIF-2 α , dont l'expression est augmentée dans les CSG par rapport aux cellules tumorales différenciées, induit l'expression de gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence des cellules souches tels que *NANOG*, *OCT-4* ou encore *C-MYC* (**Filatova et al., 2013**). Ce facteur c-Myc contribue également à la prolifération et la survie des CSG (**Wang et al., 2008**).

Cet environnement hypoxique, *via* les facteurs HIFs, est également propice à l'expansion d'une autre niche dite vasculaire.

- **Niche vasculaire**

Les premières niches dites vasculaires (**Figure 28B**) ont été mises en évidence en 2007 par Calabrese et al., En effet, cette équipe américaine a observé la présence de ces CSG en périphérie de la vascularisation tumorale (**Calabrese et al., 2007**). Cette proximité entre les deux types cellulaires a permis de proposer qu'il existait un dialogue entre ces deux types cellulaires. Des études ultérieures ont pu identifier le VEGF comme médiateur moléculaire

principal au sein de ces niches. En effet, le VEGF sécrété par les CSG, induit l'expression de la DLL-4 (*delta like-4*), par les cellules endothéliales, qui en interagissant avec le récepteur Notch, présent sur les CSG, permet le maintien du caractère souche de ces CSG (Filatova et al., 2013). De plus, le VEGF sécrété par les CSG stimule la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse tumorale. En effet, *in vitro*, une étude de Bao et al., a mis en évidence une prolifération des cellules endothéliales augmentée en présence de milieu conditionné de CSG (Bao et al., 2006). Toutefois, d'autres molécules impliquées dans ce dialogue ont été identifiées telles que sonic Hedgehog, l'eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) ou les molécules d'adhérence comme les intégrines (Burgett et al., 2016; Filatova et al., 2013).

- **Niche invasive**

Un troisième type de niches a été plus récemment décrit suite à l'identification de CSG dans la bordure invasive des GB, et constituerait donc une niche dite invasive (Figure 28C) (Hambardzumyan and Bergers, 2015). Ces niches, bien qu'encore hypothétiques, sont retrouvées principalement dans les zones périvasculaires. En effet, les CSG vont envahir le tissu en s'appuyant sur le réseau vasculaire préexistant. Cette invasion des CSG implique les MMPs mais également les intégrines, telle que l'intégrine $\alpha 3$, surexprimée dans les CSG et corrélée avec la prolifération et l'invasion des CSG (Nakada et al., 2013).

Toutefois, ces niches hypoxiques, vasculaires et invasives ne pourraient en fait n'être qu'une seule et même entité. En faveur de cette hypothèse, l'induction de HIF au sein de ces niches hypoxiques augmente la production de la chimiokine SDF-1 (*stromal-derived factor-1*) qui, par l'intermédiaire de son récepteur CXCR4 présent à la surface des CSG et des cellules endothéliales, stimule le recrutement de ces cellules. De plus, en réponse à cette hypoxie, la production de VEGF permettra la formation de nouveaux vaisseaux, impliqué dans le maintien et l'invasion des CSG (Filatova et al., 2013; Nakada et al., 2013; Ping and Bian, 2011; Turpin et al., 2015).

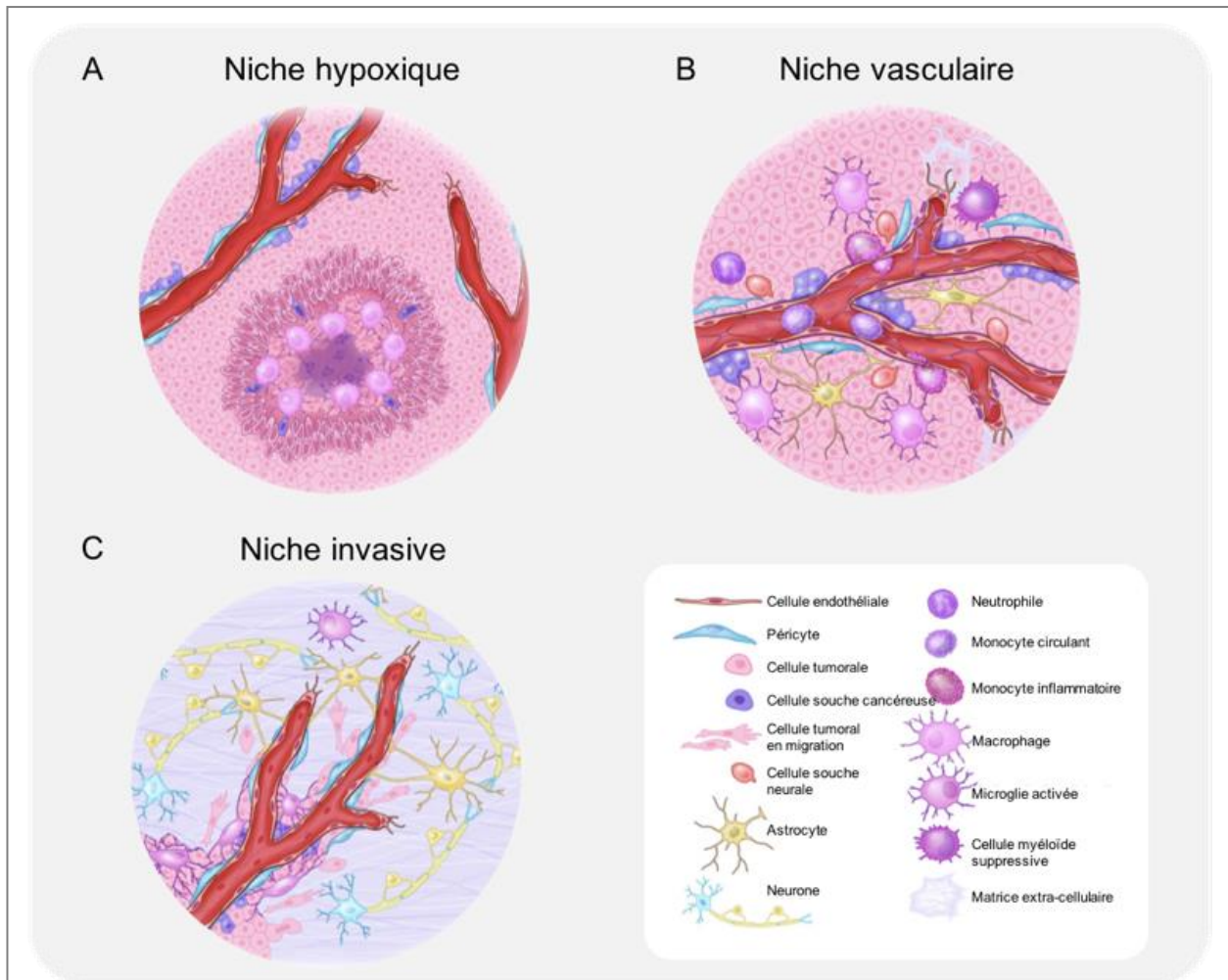


Figure 28 : Représentation des différentes niches des cellules souches cancéreuses

Organisation des composants cellulaires des niches hypoxiques (A) vasculaires (B) et invasive (C) retrouvées dans les glioblastomes. (D'après [Hambardzumyan and Bergers, 2015](#)).

Comme nous l'avons décrit au début de ce paragraphe, l'hypoxie tumorale est une conséquence de la prolifération cellulaire mais aussi de la vascularisation anormale retrouvée au sein de la tumeur. L'hypoxie tumorale représente un des facteurs environnementaux majeurs à l'origine du réseau vasculaire de la tumeur et de ses caractéristiques.

PARTIE 3

LE COMPARTIMENT VASCULAIRE



Judah Folkman

Partie 3 : Le compartiment vasculaire

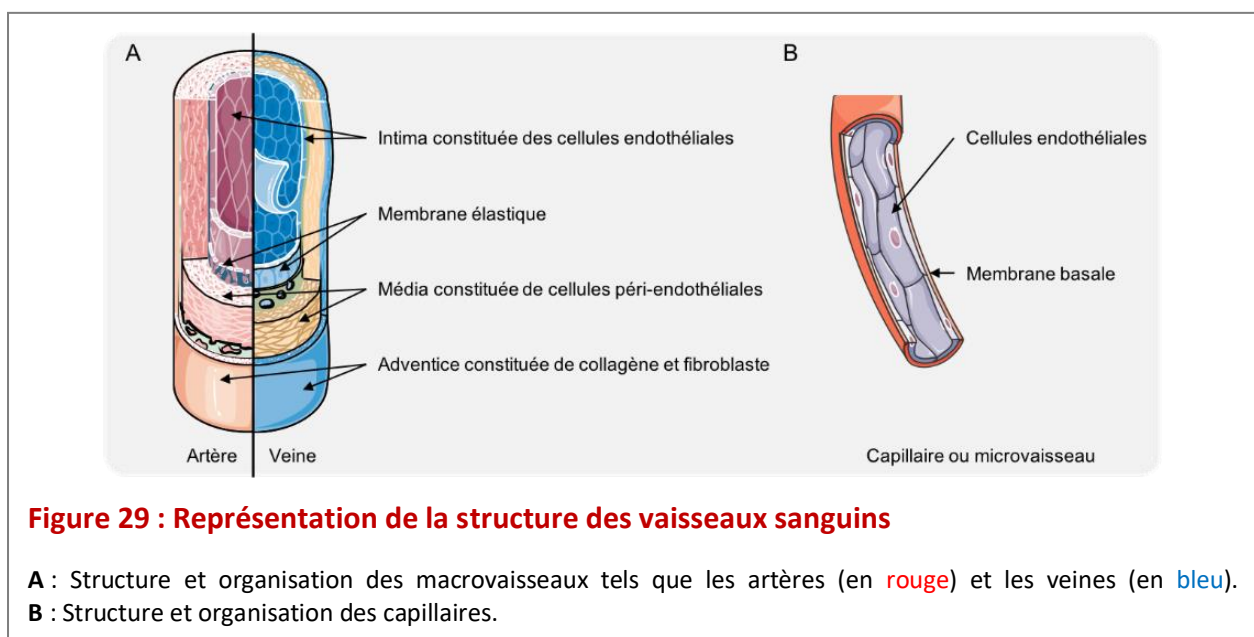
La production de nouveaux vaisseaux sanguins ou angiogenèse est indispensable à tout tissu en développement, y compris le tissu tumoral. Si ce processus est totalement contrôlé en condition physiologique, celui-ci est dérégulé en condition pathologique. La compréhension des mécanismes impliqués dans ces dérégulations repose cependant sur une connaissance fondamentale de l'angiogenèse physiologique.

I. L'angiogenèse physiologique

I.1 Fonction et structure du compartiment vasculaire

Le réseau vasculaire est essentiel au bon fonctionnement du corps humain car il permet de nourrir les cellules/tissus en oxygène et en nutriments, de drainer les déchets métaboliques et de véhiculer les cellules du système immunitaire.

Ce réseau vasculaire est structurellement et spatialement organisé. Les artères et les veines (**Figure 29A**), qui constituent les macrovaisseaux, sont composés d'une couche de cellules endothéliales (ou endothélium), d'une membrane basale et de cellules murales telles que les péricytes ou les cellules musculaires lisses. Ces dernières recouvrent essentiellement les artères et les veines afin de réguler la circulation sanguine, par des mécanismes de vasoconstriction et vasodilatation. Les capillaires ou microvaisseaux (**Figure 29B**), principale zone d'échange entre la circulation sanguine et les tissus, sont, quant à eux, constitués uniquement d'une monocouche de cellules endothéliales et d'une lame basale.



L'organisation des cellules endothéliales au sein des capillaires permet de subdiviser les capillaires en 3 catégories que sont : les capillaires continus, fenestrés et discontinus (**Figure 30**) (Cleaver and Melton, 2003).

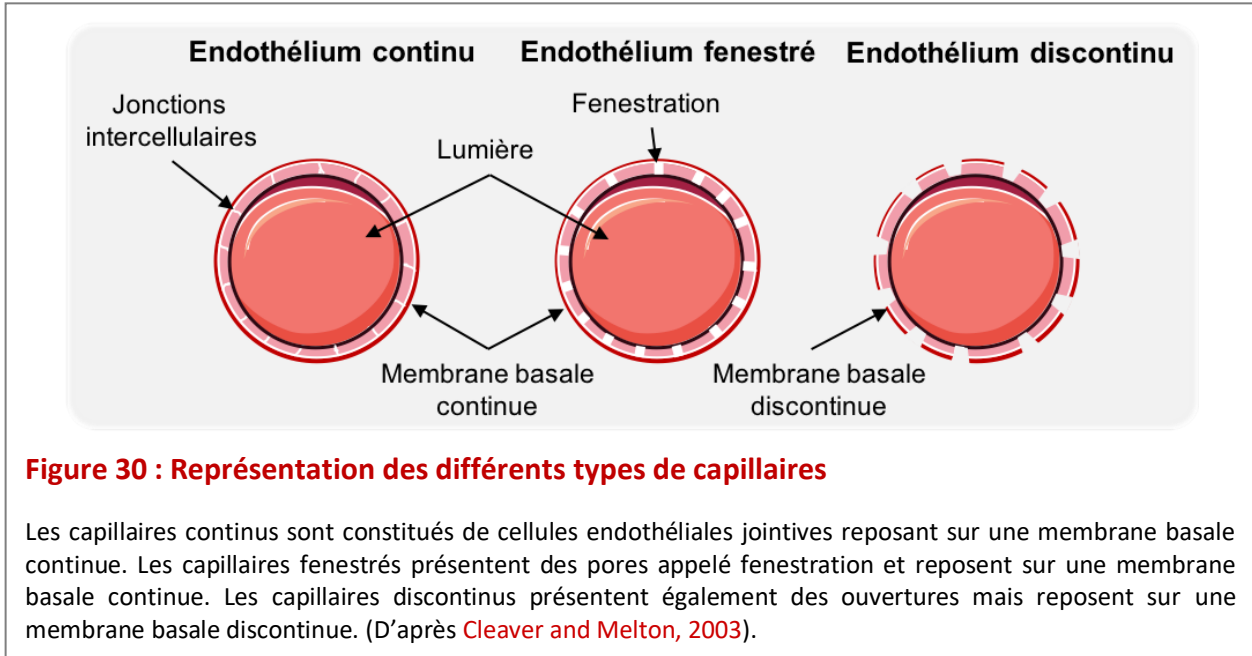


Figure 30 : Représentation des différents types de capillaires

Les capillaires continus sont constitués de cellules endothéliales jointives reposant sur une membrane basale continue. Les capillaires fenestrés présentent des pores appelés fenestrations et reposent sur une membrane basale continue. Les capillaires discontinus présentent également des ouvertures mais reposent sur une membrane basale discontinue. (D'après Cleaver and Melton, 2003).

L'organisation de l'endothélium est dépendante de la fonction du tissu ou de l'organe qu'il irrigue. Nous nous attacherons à décrire les principales propriétés du réseau vasculaire du cerveau.

Une des caractéristiques majeures de la vascularisation cérébrale est la présence d'une BHE (**Figure 31**). Le cerveau qui nécessite un apport sanguin constant et continu est particulièrement sensible aux variations de son environnement ionique. Le cerveau doit donc être protégé. Les vaisseaux cérébraux présenteront donc certaines propriétés intrinsèques. On retrouve effectivement la présence d'un endothélium continu composé de cellules endothéliales ancrées entre elles par de nombreuses jonctions serrées intercellulaires (**Figure 31**). Ces jonctions serrées sont formées par des complexes de protéines transmembranaires liées au cytosquelette d'actine. Parmi ces protéines on retrouve les claudines, les occludines, et les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM) (Benarroch, 2012). La présence de jonctions serrées limite le transport paracellulaire des molécules hydrophiles. Celles-ci vont devoir emprunter la voie transcellulaire, plutôt qu'intercellulaire, pour rejoindre le compartiment intraparenchymateux. De plus, les péricytes et les pieds astrocytaires entourent l'endothélium continu, de façon hermétique (**Figure 31**). Toutes ces particularités

définissent la BHE, barrière physiologique, décrite en 1885 par Paul Ehrlich.

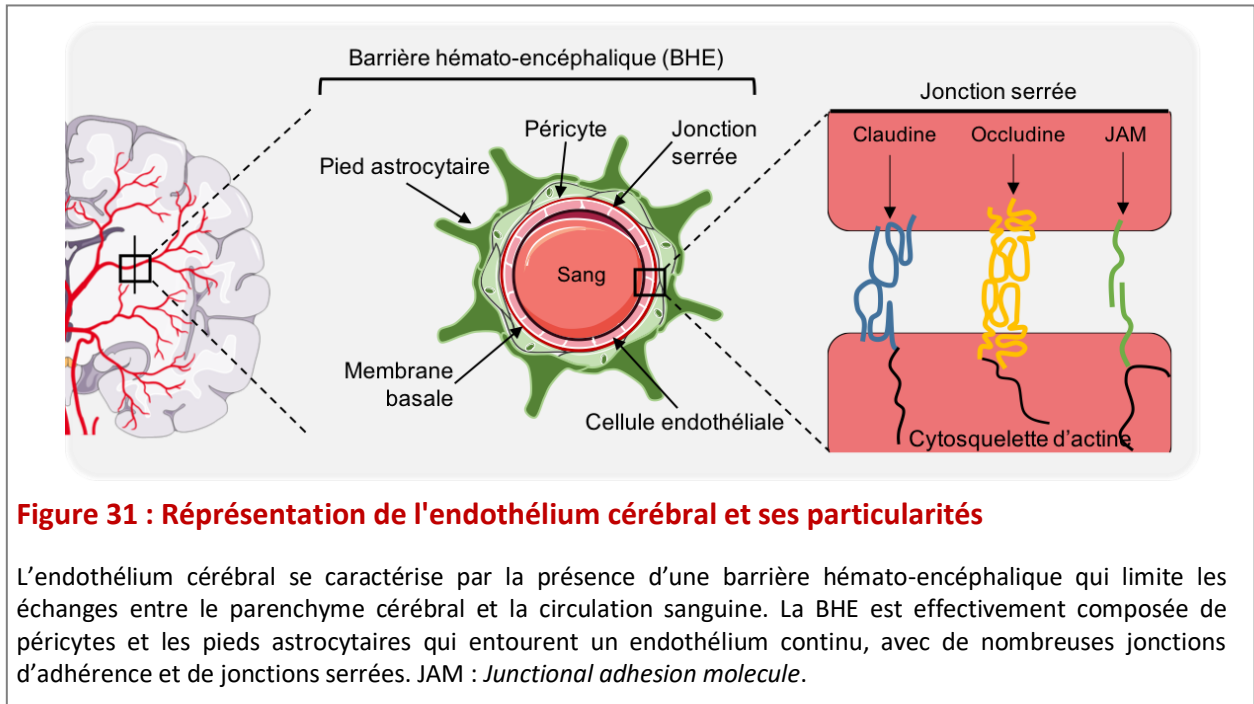


Figure 31 : Représentation de l'endothélium cérébral et ses particularités

L'endothélium cérébral se caractérise par la présence d'une barrière hémato-encéphalique qui limite les échanges entre le parenchyme cérébral et la circulation sanguine. La BHE est effectivement composée de péricytes et les pieds astrocytaires qui entourent un endothélium continu, avec de nombreuses jonctions d'adhérence et de jonctions serrées. JAM : *Junctional adhesion molecule*.

Bien que l'organisation structurale soit différente entre les tissus, les mécanismes de formation des vaisseaux restent semblables.

I.2 Formation des vaisseaux

La vascularisation se développe au cours de l'embryogenèse et fait intervenir deux processus distincts que sont la vasculogenèse et l'angiogenèse.

I.2.1 La vasculogenèse

La vasculogenèse, observée principalement lors de l'embryogenèse, se définit comme la formation *de novo* de vaisseaux sanguins. Ce processus permet la formation d'un réseau vasculaire primitif avec la différenciation de précurseurs mésenchymateux en cellules endothéliales (Swift and Weinstein, 2009).

Les cellules endothéliales et hématopoïétiques possèdent un précurseur commun qui est l'hémangioblaste issu du mésoderme (Figure 32-1). À l'intérieur du sac vitellin, les hémangioblastes forment des agrégats dans lesquels les cellules internes localisées dans le lumen se développent en précurseurs hématopoïétiques alors que la population de cellules externes forme les angioblastes (Figure 32-2). Les angioblastes sont capables de migrer avant

de se différencier *in situ* en cellules endothéliales et ainsi former des plexus primaires de capillaires (**Figure 32-3**) (Risau and Flamme, 1995).

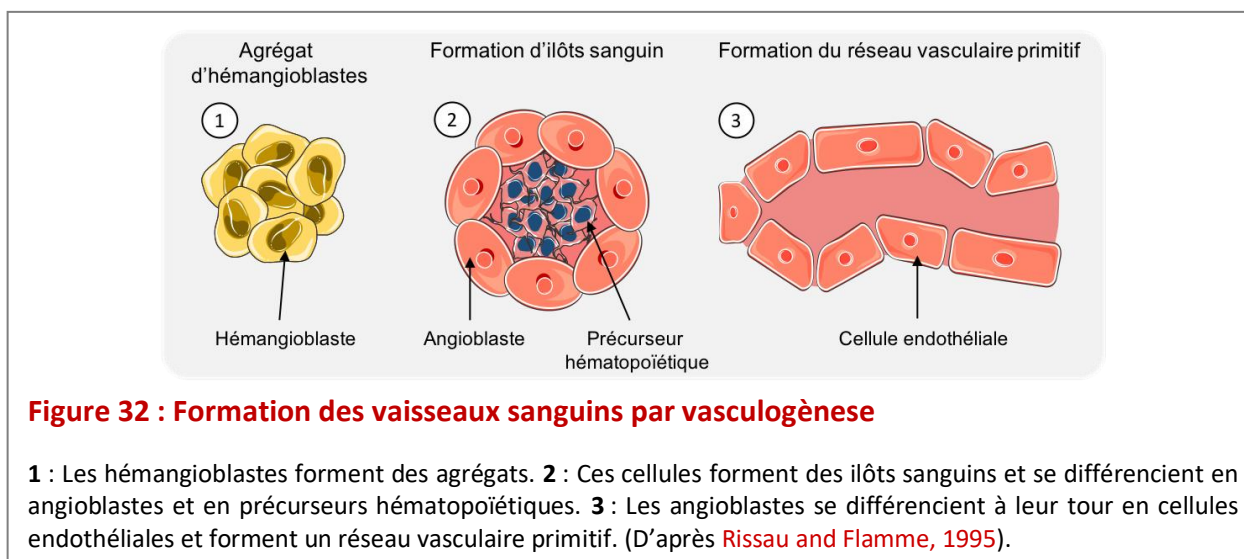


Figure 32 : Formation des vaisseaux sanguins par vasculogénèse

1 : Les hémangioblastes forment des agrégats. **2 :** Ces cellules forment des ilôts sanguins et se différencient en angioblastes et en précurseurs hématopoïétiques. **3 :** Les angioblastes se différencient à leur tour en cellules endothéliales et forment un réseau vasculaire primitif. (D'après Rissau and Flamme, 1995).

Initialement, on pensait que les précurseurs endothéliaux existaient seulement durant la vie embryonnaire. Depuis, ces cellules ont été également décrites chez l'adulte non seulement dans la moelle osseuse mais aussi dans le sang. Ces progéniteurs endothéliaux semblent capables d'être mobilisés pour coloniser les tissus ischémiques ou les tumeurs où ils se différencient en cellules endothéliales matures (Carmeliet, 2000).

1.2.2 L'angiogénèse

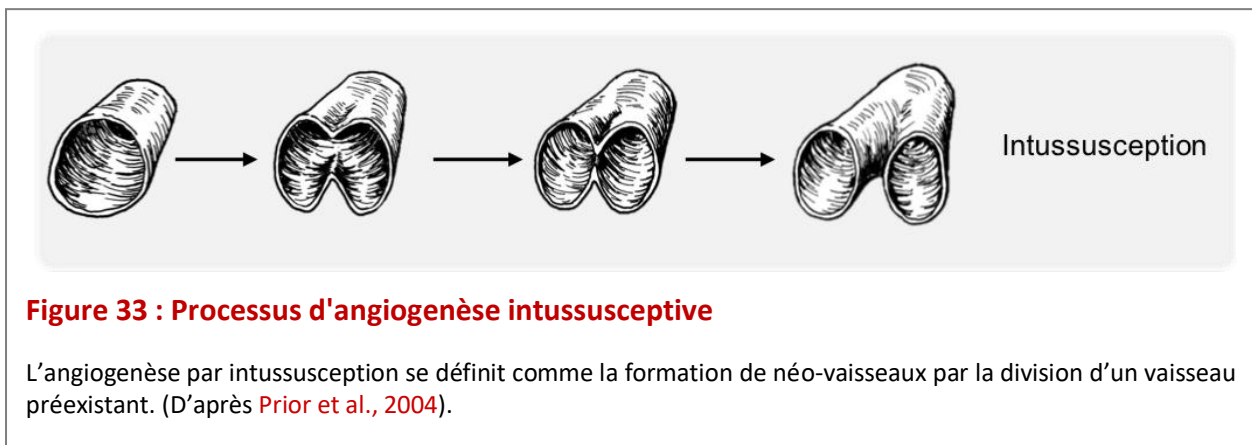
L'angiogénèse se définit comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (Carmeliet and Jain, 2011).

L'angiogénèse est un processus physiologique majeur durant le développement embryonnaire, pendant lequel la prolifération endothéliale est importante. Cependant chez l'adulte, la prolifération des cellules endothéliales devient très faible avec une estimation d'un temps de doublement moyen d'environ 1000 jours. On considère, que 1 cellule sur 10 000 est en prolifération à un instant t (Engerman et al., 1967). On dit que le système vasculaire est quiescent, bien que ce processus puisse être observé dans certaines situations physiologiques (le cycle menstruel, le développement musculaire, la cicatrisation). Chez l'adulte, la croissance angiogénique s'observera essentiellement en conditions pathologiques.

Ce processus se développe selon deux processus que sont le bourgeonnement de vaisseaux préexistants ou bien l'intussusception (Carmeliet, 2000; Prior et al., 2004).

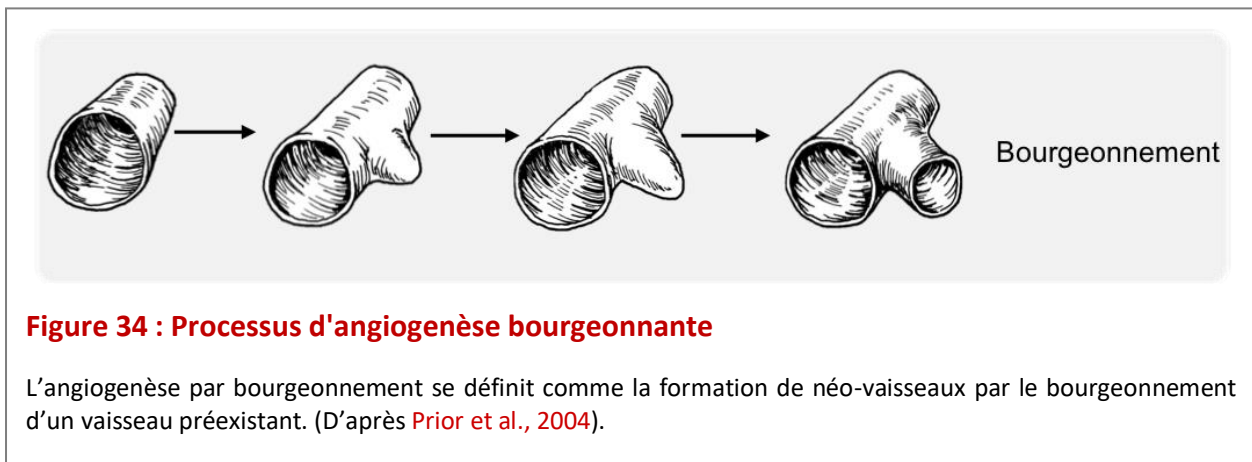
I.2.2.1 L'angiogenèse intussusceptive

L'angiogenèse intussusceptive (**Figure 33**) correspond à la division d'un vaisseau en plusieurs vaisseaux de diamètre inférieur. La division interne longitudinale du vaisseau se fait par insertion de tissu matriciel. Cette insertion crée une zone de contact entre les parois vasculaires opposées. L'espace interstitiel est ensuite progressivement envahi et élargi par des cellules péri-endothéliales et par la MEC.



I.2.2.2 L'angiogenèse bourgeonnante

L'angiogenèse bourgeonnante (**Figure 34**) correspond à la croissance de néo-vaisseaux à partir des extrémités de vaisseaux préexistants. Ce processus commence par une étape d'initiation.



- **Etape d'initiation : Vasodilatation et perméabilité.** L'angiogenèse est initiée par une vasodilatation. La perméabilité vasculaire augmente, ce qui permet l'extravasation des protéines plasmatiques qui instaurent provisoirement un environnement favorable à la migration des cellules endothéliales. Cette augmentation de la perméabilité passe par la formation de fenestrations, d'organites vésiculo-vacuolaires et la redistribution des protéines d'adhésion cellulaire. Une fois le processus initié, plusieurs étapes sont impliquées dans ce processus schématisées sur la **Figure 35**.
- **Destabilisation qui aboutira à la libération des facteurs angiogéniques, à la prolifération et migration des cellules endothéliales.** Pour que les cellules endothéliales migrent de leur site d'origine vers leurs sites de résidence, il est nécessaire que la structure des vaisseaux se déstabilise. Ainsi les cellules endothéliales perdent les contacts intercellulaires et se libèrent du support péri-endothélial dont la présence est nécessaire aux vaisseaux matures (**Figure 35-1**).

Au cours de cette étape, les membranes basales et la MEC seront dégradées par l'intermédiaire de plusieurs protéases de type MMPs (**Figure 35-2**). Lors de cette phase, la MEC est non seulement dégradée par protéolyse mais sa composition est également modifiée (**Carmeliet, 2003**). Ainsi, cette dégradation va permettre de répondre à plusieurs objectifs incluant la possibilité pour les cellules endothéliales de migrer et proliférer après avoir été libérées de leur site de liaison à la matrice *via* les intégrines, le détachement des péricytes mais aussi la libération des facteurs de croissance séquestrés dans la MEC. Par exemple, certaines isoformes du VEGF et du bFGF (*basic fibroblast growth factor*) possèdent des sites de liaison à l'héparine ce qui leur permet de se lier aux protéoglycanes de type héparane sulfate qui sont présents soit dans la membrane basale soit dans la MEC (**Jakobsson et al., 2006**). Ces facteurs de croissance seront donc ainsi libérés suite à une dégradation protéolytique de cette membrane basale ou de la MEC. Certaines études ont montré que la MMP-9 et dans une moindre mesure la MMP-2 sont particulièrement impliquées dans la mobilisation du VEGF séquestré dans la matrice (**Bergers et al., 2000**).

- **Sélection de la cellule bourgeonnante.** L'angiogenèse par bourgeonnement s'initie avec la sélection de cellules endothéliales, dites *tip cells*, et l'activation de ces dernières en réponse à un signal pro-angiogénique comme le VEGF (**Figure 35-3**).

D'un point de vue mécanistique, la liaison du VEGF à son récepteur VEGF-R2 (*vascular endothelial growth factor-receptor 2*) induit l'expression de la protéine DLL-4 par ces cellules *tip*. L'association de la DLL-4, sécrétée avec son récepteur Notch présent sur les cellules endothéliales voisines, dites *stalker*, induit sur ces dernières une diminution d'expression du VEGF-R2 au dépend du récepteur VEGF-R1. Cette régulation d'expression du VEGF-R2 sur les cellules adjacentes permet ainsi une sélection contrôlée de cellules *tip* (Hellström et al., 2007).

Les cellules *tip* sont extrêmement mobiles et présentent de nombreuses protusions au niveau de leur membrane (Gerhardt et al., 2003). De plus, l'activation des cellules endothéliales *tip* par le VEGF induit non seulement un affaiblissement des liaisons entre les cellules endothéliales mais également une dégradation de la matrice extracellulaire par des protéases de type MMPs (Funahashi et al., 2011; Gavard and Gutkind, 2006). Cette étape est également contrôlée par l'Angiopoïétine-2 (Ang-2) qui déstabilise les cellules murales comme les péricytes et provoque le détachement de ces dernières.

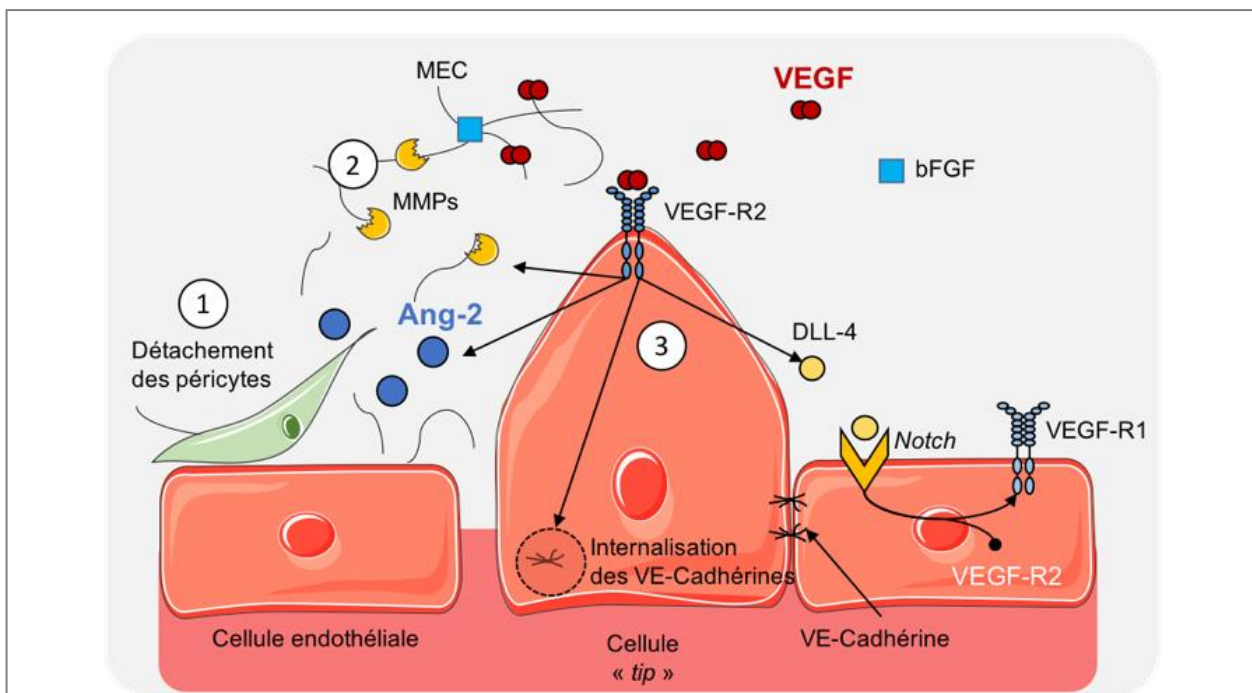


Figure 35 : Sélection de la cellule endothéliale *tip*

1 : Déstabilisation de l'endothélium suite au détachement des cellules murales **2** : La dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) par les métalloprotéases (MMPs) permet le remodelage matriciel ainsi que la libération de facteurs angiogéniques tels que le VEGF et le bFGF. **3** : Sélection de la cellule *tip* par la signalisation du VEGF-A sur son récepteur VEGF-R2. La signalisation du VEGF-R2 maintient la déstabilisation de l'endothélium avec l'internalisation de la VE-Cadhérine, la libération de MMPs et d'Ang-2. La libération de la protéine DLL-4 induite par le VEGF-R2 permet de contrôler l'angiogenèse en réprimant le VEGF-R2 sur les cellules voisines.

- **Migration et fusion des cellules endothéliales.** Suite à ce remodelage matriciel, les cellules endothéliales *tip* migrent et forment des bourgeons de vaisseaux. Ces bourgeons endothéliaux s'allongent par intercalation des cellules endothéliales. En effet, au cours du remodelage matriciel, un gradient de VEGF s'établit et permet notamment l'élongation du bourgeon, par la prolifération des cellules endothéliales *stalker* (**Figure 36-1**) (Foulquier et al., 2018). L'élongation de bourgeons voisins permet à ces derniers de fusionner par anastomose avec la participation dans ce processus, de macrophages (**Figure 36-2**). Ces derniers guident et facilitent la fusion des cellules *tip* en libérant des molécules chimio-attractances telle que la SDF-1 (**Figure 36-3**) (Fantin et al., 2010). La fusion de cellules *tip* s'accompagne d'un remodelage matriciel, initié par la sécrétion de PDGF-B et de TGF- β 1 permettant la stabilisation des néo-vaisseaux avec le recrutement des péricytes (Murakami, 2012). Dès lors que les péricytes sont recrutés, ces derniers sécrètent alors de l'Ang-1. De plus, les contacts inter-endothéliaux sont restaurés avec la relocalisation de la VE-Cadhérine (Cadhérine de l'endothélium vasculaire) à la membrane des cellules endothéliales.
- **Formation d'une lumière.** Les cellules endothéliales s'assemblent afin de former un cordon de cellules qui par la suite s'organisent pour former une lumière (**Figure 36-4**). L'insertion ou l'amincissement des cellules endothéliales en fusionnant avec les vaisseaux préexistants permet aux vaisseaux d'augmenter leur diamètre et leur longueur.
- **Survie des cellules endothéliales.** Une fois assemblées en nouveaux vaisseaux, les cellules endothéliales deviennent quiescentes et ont la capacité de survivre pendant plusieurs années.

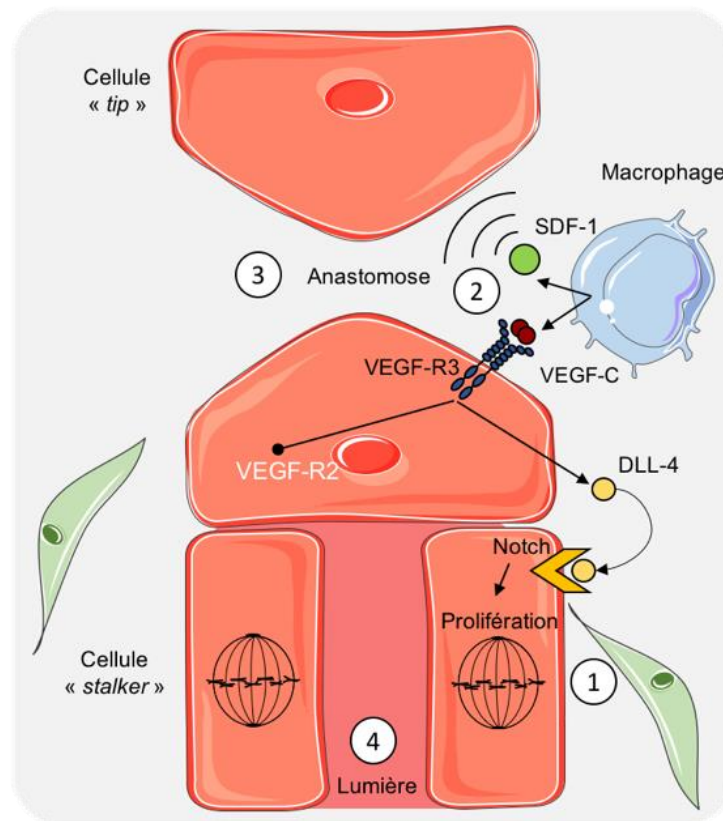


Figure 36 : Migration et élongation du bourgeon vasculaire

1 : L'élongation du bourgeon fait suite à la prolifération des cellules *stalkers*. La signalisation Notch induite par la protéine DLL-4 stimule la prolifération des cellules endothéliales. **2** : Les macrophages guident les cellules *tip* afin de faciliter la fusion des bourgeons. **3** : Ce processus est appelé anastomose. **4** : La lumière du vaisseau se forme suite à l'assemblage des cellules endothéliales.

I.2.2.3 Maturation du réseau vasculaire

Les vaisseaux sanguins formés par vasculogénèse ou angiogénèse sont immatures et doivent subir une étape de maturation incluant une stabilisation (correspondant au recrutement des cellules péri-endothéliales), le développement de la MEC environnante, la formation d'une membrane basale et une spécialisation des cellules endothéliales dépendante du tissu.

Dans tous ces processus, et de façon non exhaustive, les facteurs moléculaires tels les MMPs, les facteurs angiogéniques comme le PDGF, le bFGF, les intégrines et le NO (monoxyde d'azote) jouent un rôle majeur tout comme les forces mécaniques imposées par le débit sanguin.

- **Stabilisation des vaisseaux par les cellules murales :** Les vaisseaux sanguins nouvellement formés sont stabilisés par une association entre les cellules endothéliales et les cellules murales (**Figure 37-1**). L'association des péricytes, des cellules musculaires lisses avec les vaisseaux néoformés régule un grand nombre de processus tels la prolifération des cellules endothéliales, la survie, la migration, la différenciation, l'arborisation vasculaire, le débit sanguin et la perméabilité vasculaire. Toute anomalie dans le recrutement des cellules murales conduira donc à une sensibilisation des cellules endothéliales au VEGF, une perméabilité, une augmentation du diamètre des vaisseaux, des hémorragies, un défaut de perfusion et une hypoxie tissulaire. Ces différentes anomalies sont observées par exemple chez les embryons déficients en PDGF-B, au niveau de la vascularisation de la rétine des sujets diabétiques, dans les hémangiomes et les tumeurs (**Carmeliet, 2000**).

Les péricytes influencent également la sensibilité des vaisseaux à la régression vasculaire : en effet des vaisseaux recouverts de cellules murales sont résistants à la régression induite par une diminution d'oxygène alors qu'une dissociation entre les cellules endothéliales et péricytes conduit à une régression de ces vaisseaux sanguins (**Benjamin et al., 1999**).

L'instauration de la circulation sanguine, avec le flux sanguin, permettra également la stabilisation des néo-vaisseaux (**Figure 37-2**) (**Walti et al., 2013**).

- **Formation de la membrane basale et de la MEC :** La maturation de vaisseaux sanguins inclut également le développement de la membrane basale ainsi que celui de la MEC (**Figure 37-3**) pour laquelle les intégrines représentent des récepteurs spécifiques.

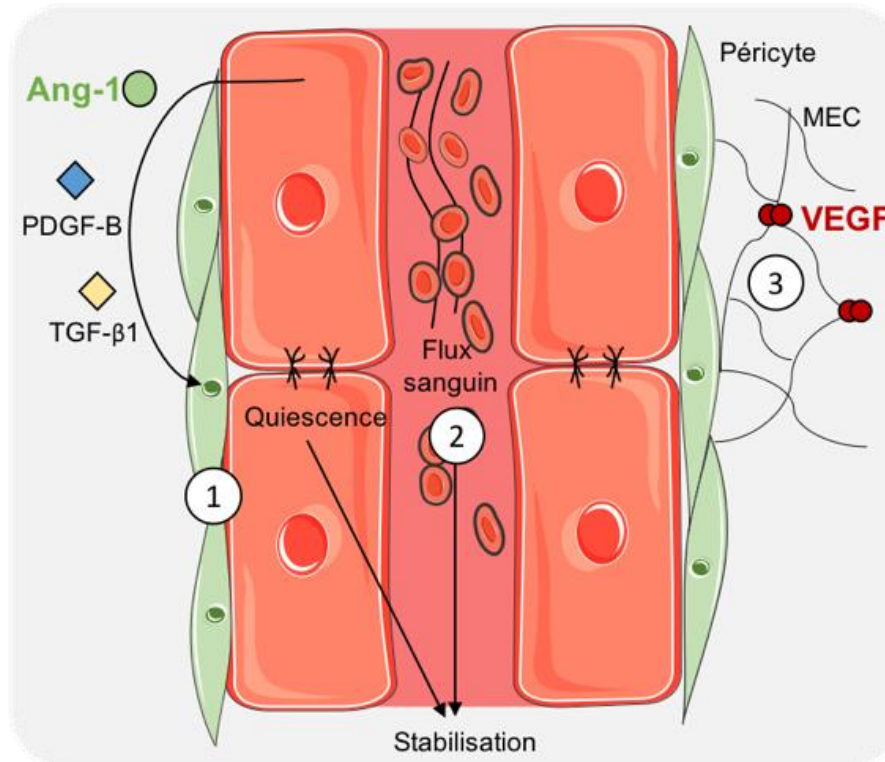


Figure 37 : Stabilisation du néo-vaisseau

1 : Les cellules murales *via* l'Ang-1, le PDGF- β et le TGF- β stabilisent les cellules endothéliales. **2** : L'instauration du flux sanguin permet également de stabiliser les néo-vaisseaux. **3** : La restructuration de la MEC maintient la structure vasculaire et permet de séquestrer les facteurs angiogéniques pour une libération rapide au prochain stimulus.

- **Spécialisation des cellules endothéliales** : La dernière étape permet aux cellules endothéliales présentes au sein du vaisseau d'acquérir des caractères spéciaux qui seront déterminés en partie par le tissu hôte (Risau, 1998). Cette spécialisation inclut :
 - la mise en place du réseau artério-veineux (Wang et al., 1998).
 - la différenciation des cellules endothéliales « tissu-spécifique ».
 - la formation des jonctions adhérentes.

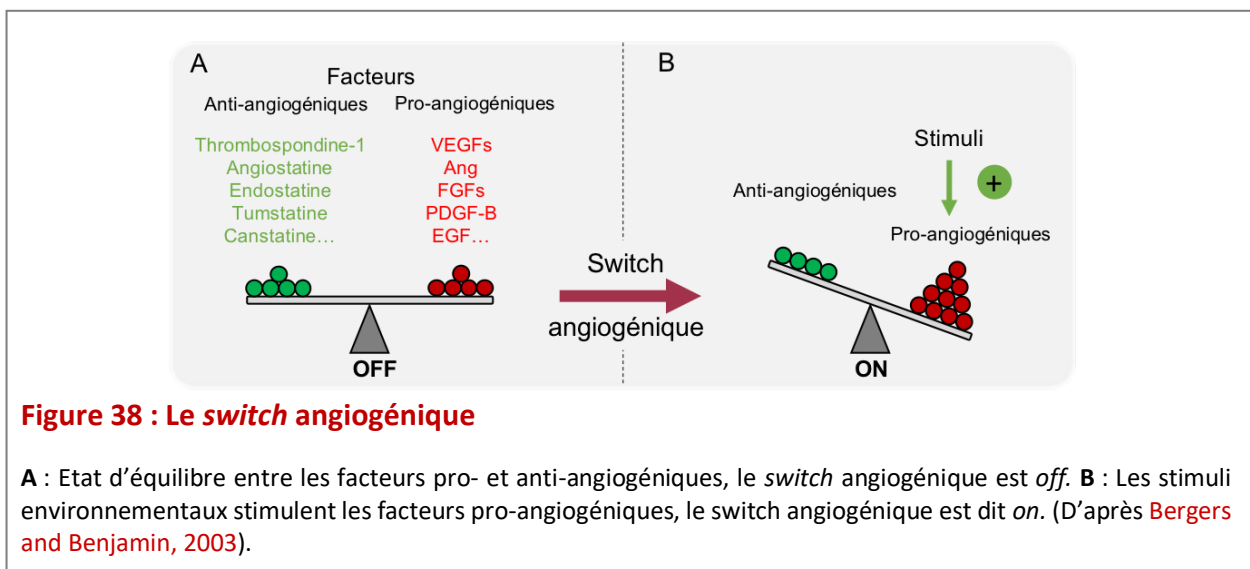
1.2.3 Remodelage vasculaire

Le remodelage vasculaire est défini comme une adaptation des structures vasculaires en un réseau fonctionnel. Au cours de ce remodelage, de nouveaux vaisseaux pourront être inclus et d'autres pourront être détruits, sans aucune expansion du réseau (Risau, 1997). Ce remodelage utilise le processus d'intussusception qui ne requiert pas de prolifération de

cellules endothéliales mais qui nécessite plutôt un réarrangement de la morphologie de ces cellules. En revanche, si un excès de vaisseaux est formé au cours de la néo-vascularisation, il existera un défaut de perfusion qui sera alors à l'origine d'une déstabilisation et d'une régression des vaisseaux surnuméraires (Carmeliet, 2003). Rappelons qu'une absence de péricytes conduit également à la régression de ces vaisseaux « anormaux ».

1.2.4 Le concept de *switch* angiogénique

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'angiogenèse est une suite d'événements complexes qui requiert les activités mitotiques, protéolytiques et chimiotactiques des cellules endothéliales. De nombreuses molécules sont susceptibles de développer une action pro- ou anti-angiogénique et participent à l'établissement d'un équilibre assurant le maintien de l'état basal. On dit alors que le « *switch* » angiogénique est « *off* ». Les effets des molécules pro-angiogéniques sont équilibrés par les molécules anti-angiogéniques (Figure 38A). Toutefois, certaines conditions environnementales notamment en conditions pathologiques, sont capables de déséquilibrer la balance en faveur d'une angiogenèse. On dit alors que le « *switch* » angiogénique est « *on* » (Figure 38B) (Bergers and Benjamin, 2003).



Cette présentation non exhaustive nous a permis d'aborder les principaux mécanismes de mise en place de l'angiogenèse. Les différents acteurs de ce processus, que ce soient les facteurs angiogéniques sécrétés par les cellules endothéliales elles-mêmes ou par les cellules

environnantes, les molécules de la MEC ou les molécules d'adhésion agissent de concert afin de réguler l'angiogenèse.

C'est au cours des années 1980 que les mécanismes moléculaires contrôlant l'angiogenèse ont commencé à être identifiés. Depuis, parmi les facteurs régulant cette angiogenèse, deux familles majeures apparaissent comme étant particulièrement impliquées dans le processus angiogénique : **la famille du VEGF et la famille des Angiopoïétines.**

I.3 La famille du VEGF et ses récepteurs

I.3.1 Le VEGF

Historiquement, le VEGF fut identifié en 1983 par Senger et al., et décrit comme le VPF (*vascular permeability factor*) (Senger et al., 1983). C'est toutefois en 1990, que cette même équipe publie le séquençage en acides aminés du VPF (Senger et al., 1990). Néanmoins, en 1989, l'équipe de Napoléone Ferrara identifie et séquence un facteur mitogène de cellules endothéliales, qu'elle dénomme VEGF et dont la séquence s'avère finalement identique au VPF (Ferrara and Henzel, 1989). La même année, Plouët et al., publient le séquençage d'un facteur mitogène des « cellules endothéliales-spécifiques » qu'ils dénomment « vasculotropine » (Plouët et al., 1989). Plus tard, la comparaison des séquences en acides aminées a permis d'établir que ces trois molécules sont identiques. Le VEGF, dénommé VPF ou vasculotropine, est donc un facteur angiogénique aux propriétés perméabilisantes (50 000 fois plus actif que l'histamine).

Le VEGF est une famille de glycoprotéine comprenant plusieurs membres :

Le VEGF-A, -B, -C, -D et le *placental growth factor* (PlGF). Le gène du VEGF-A, le plus étudié, est situé sur le chromosome 6p21.3 du génome humain et code pour une protéine de 40 kDa constituée de deux chaînes peptidiques identiques reliées par des ponts disulfures. Chez l'Homme, on retrouve six isoformes du VEGF-A résultant d'un épissage alternatif : les VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ qui sont les formes majoritairement exprimées et les VEGF-A₂₀₆ VEGF-A₁₄₅ et VEGF-A₁₁₅.

Un grand nombre de tissus exprime le VEGF-A₁₆₅ de façon constitutive mais en faible quantité. Toutefois, son expression est soumise à de nombreuses régulations. Nous nous

attacherons à décrire brièvement les principaux régulateurs du VEGF-A₁₆₅ que l'on dénommera dans la suite du manuscrit VEGF.

1.3.2 Régulation d'expression du VEGF

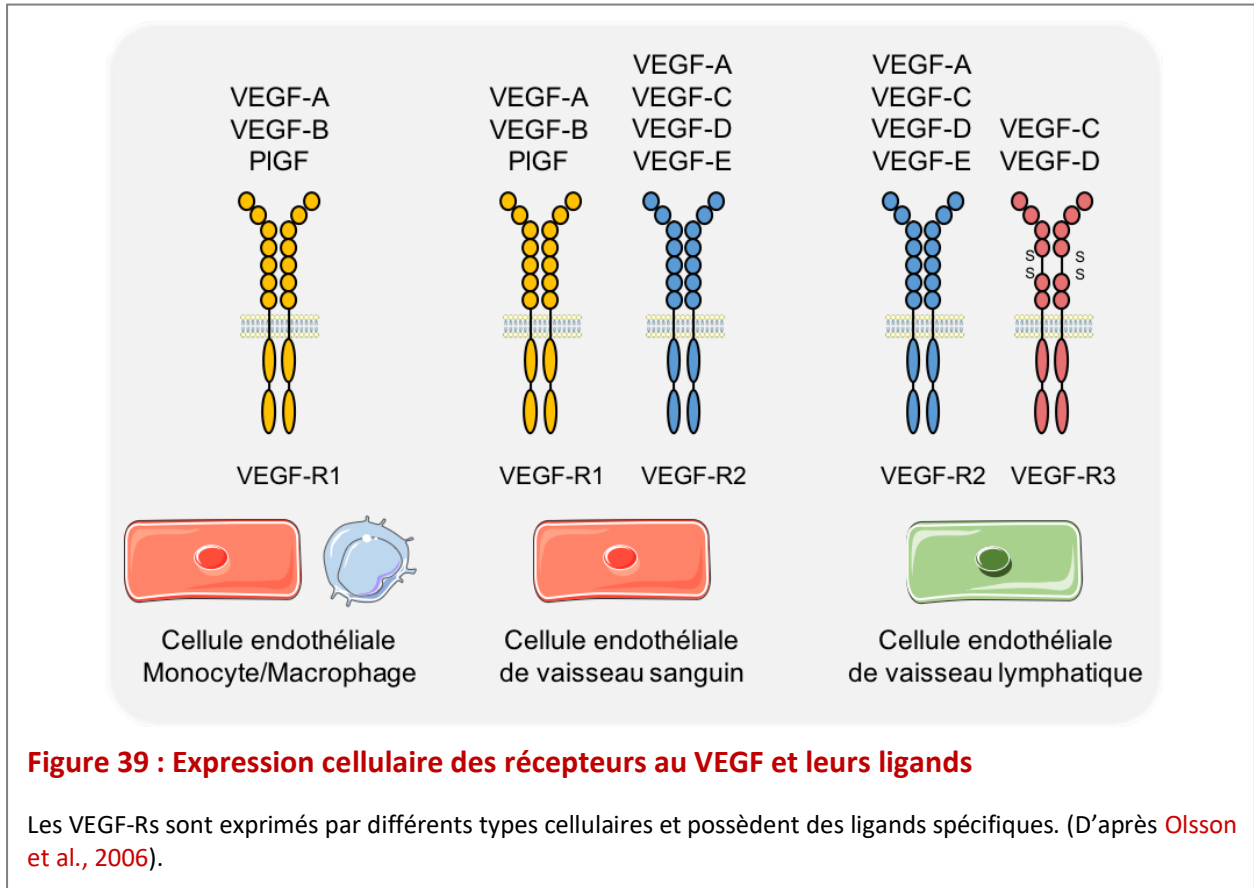
- L'hypoxie a un rôle essentiel dans la régulation du VEGF. En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, le VEGF est un des gènes cibles de HIF-1. Pour rappel, l'hypoxie conduit à une stabilisation et une activation du facteur de transcription HIF-1, qui alors se fixe sur les séquences HRE présentes en amont du gène du VEGF, et permet ainsi sa transcription (Tsuzuki et al., 2000). L'ARN messenger (ARNm) du VEGF, extrêmement labile en normoxie sera stabilisé en hypoxie, par la protéine HuR (*human antigen R*), qui en se fixant sur les résidus AU situés en 3' UTR de l'ARNm, empêchera sa dégradation par des nucléases (Arcondéguy et al., 2013).
- L'expression du VEGF peut être régulée par d'autres facteurs de croissance tels que l'EGF (*epidermal growth factor*), le bFGF ou encore le PDGF-B mais également par certaines cytokines ou ILs pro-inflammatoires (Dunn et al., 2000). Les IL-1 β , IL-6, IL-8, le TGF- α/β ou encore le TNF- α induiront une augmentation d'expression du VEGF (Maloney and Gao, 2015).
- Certaines mutations peuvent être également à l'origine d'une surexpression du VEGF. En effet, l'expression du VEGF est régulée positivement par des mutations activatrices d'oncogènes comme *RAS*, *SRC* ou *EGF-R* ou encore par des mutations inhibitrices de gènes suppresseurs de tumeur tels que *TP53*, *VHL*, *PTEN* ou *NF-1* (Ferrara, 2004; Kerbel, 2008).
- Enfin, comme nous l'avons évoqué précédemment, le VEGF peut être séquestré dans la MEC. Sa libération est régulée par différentes protéines telles que les héparinases, la plasmine ou encore des MMPs (MMP-2, MMP-9). Ce mécanisme de séquestration/libération participe à la régulation d'expression de ce facteur de croissance (Lee et al., 2006a).

1.3.3 Les récepteurs au VEGF

L'action du VEGF repose sur son interaction avec ses récepteurs à activité tyrosine kinase. La famille des récepteurs au VEGF est constituée de trois membres dont l'expression peut être différente en fonction du type cellulaire (Figure 39) (Olsson et al., 2006).

- Le VEGF-R1 ou flt-1 (*fms-related tyrosine kinase-1*) se retrouve à la surface des cellules endothéliales mais aussi des monocytes/macrophages.

- Le VEGF-R2 ou kdr (*human kinase insert domain containing receptor*) ou flk-1 (*fetal liver kinase-1*) chez la souris est retrouvé sur les progéniteurs endothéliaux, les cellules endothéliales, aussi bien du réseau vasculaire que lymphatique.
- Enfin, le VEGF-R3 ou flt-4 (*fms-related tyrosine kinase-4*) est, quant à lui, retrouvé principalement sur les vaisseaux lymphatiques.



Ces récepteurs au VEGF sont constitués d'un domaine extracellulaire, composé de 7 domaines *immunoglobulin like* (Ig), à l'exception du VEGF-R3 qui en comporte 6 car un domaine *Ig-like* est remplacé par un pont disulfure (**Figure 39**). Nous retrouvons ensuite un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire qui est composé par 2 régions à activité tyrosine kinase, permettant la transduction du signal.

Ces récepteurs peuvent s'associer entre eux afin de former des homodimères et des hétérodimères tels que VEGF-R1/VEGF-R2 ou VEGFR-2/VEGR-R3.

De façon intéressante, les VEGF-Rs peuvent également interagir avec des co-récepteurs dépourvus d'activité tyrosine kinase comme les protéoglycanes à héparanes

sulfates, la neuropiline (NRP-1 et NRP-2) ou encore les intégrines α/β , afin de faciliter/potentialiser la liaison et la signalisation du VEGF (Favier et al., 2006; Jakobsson et al., 2006; Somanath et al., 2009).

I.3.4 La signalisation VEGF/VEGF-R

L'importance du VEGF et de ses récepteurs dans le processus angiogénique a réellement été démontrée à l'aide de souris transgéniques. L'inactivation du gène *VEGF* chez la souris conduit à des défauts de vascularisation majeurs et entraîne la mort des embryons au stade E9 (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Ces souris développent une structure vasculaire primitive (par un phénomène de vasculogénèse) mais sont incapables de développer des capillaires nécessaires à la survie de l'embryon. De même, des mutations dans le gène *FLT-1* induisent une vascularisation anormale qui conduit à une mort *in utero* des embryons au stade E8 (Fong et al., 1999). Shalaby et al, ont, quant à eux, montré que l'inactivation du gène *FLK-1*, codant pour le VEGF-R2, entraîne également la mort des embryons, avec un défaut dans le développement des cellules hématopoïétiques et endothéliales (Shalaby et al., 1995). Ces différentes observations ont permis d'illustrer le rôle fondamental du système VEGF/VEGF-R dans la formation du réseau vasculaire. Ces données physiologiques ont ensuite été complétées par des expériences visant à montrer que le VEGF est impliqué dans de nombreuses étapes du processus angiogénique enclenchées par la fixation du VEGF à ses récepteurs.

I.4 Effets biologiques du VEGF et voies de signalisation

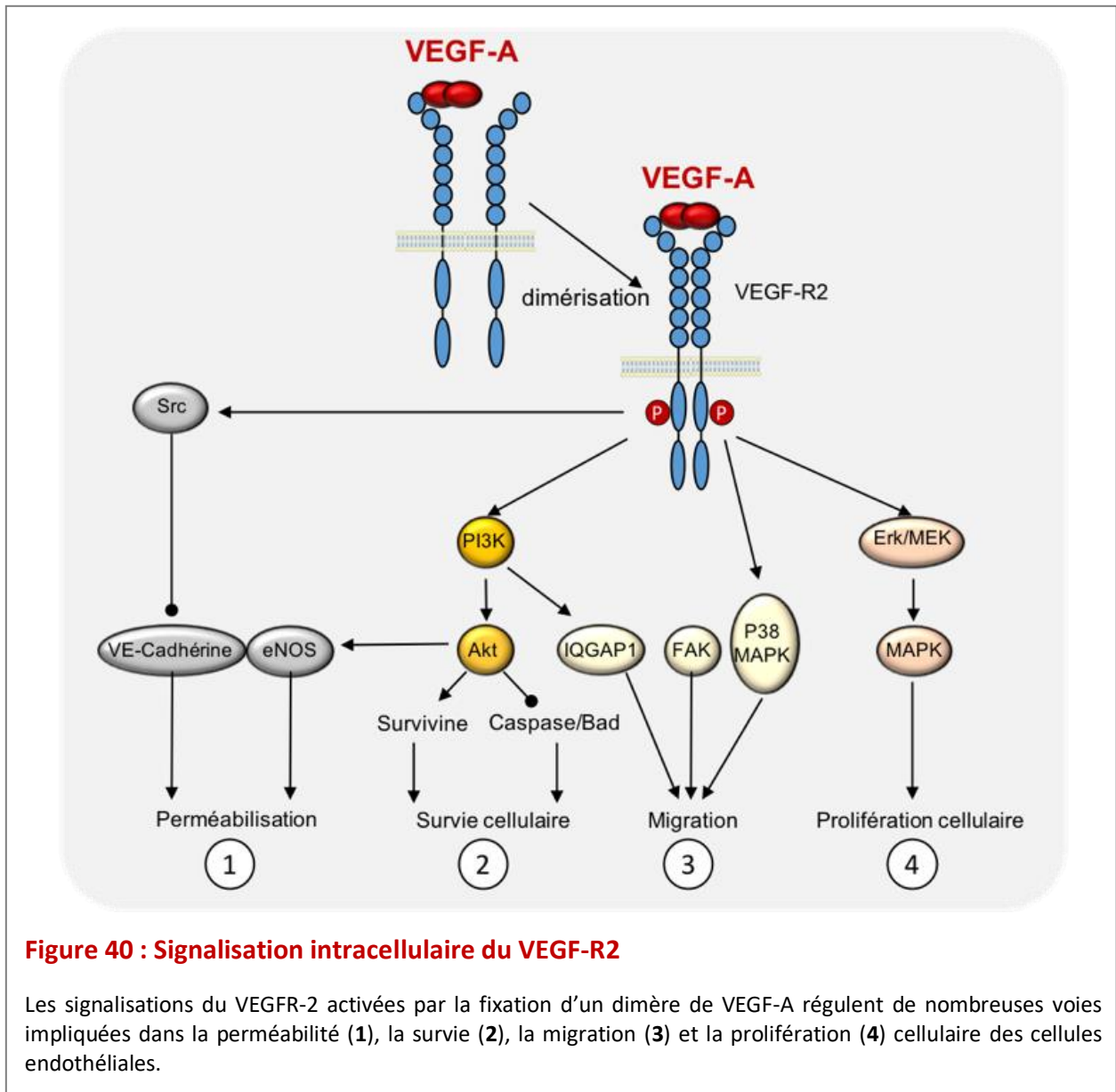
Le VEGF, en se liant à ses récepteurs, induit leur dimérisation. En effet, étant sous forme homodimérique, un des monomères se lie à un récepteur et l'autre se lie à un autre récepteur. Ceci conduit à une transphosphorylation de ces domaines kinases sur des résidus tyrosines. S'en suit une activation de différentes voies de signalisation à l'origine d'effets biologiques différents (Figure 40).

Toutes les isoformes du VEGF se lient et activent aussi bien le VEGF-R1 que le VEGF-R2 avec toutefois une affinité supérieure pour le VEGF-R1. Cependant, la signalisation induite par le VEGF-R1 est plus faible par comparaison au VEGF-R2 (Shibuya and Claesson-Welsh, 2006).

La majorité des voies intracellulaires activées sous l'action du VEGF se réalise par l'intermédiaire du VEGF-R2 alors que peu d'activité semble être dépendante du VEGF-R1 (Koch and Claesson-Welsh, 2012). Nous décrivons donc les effets biologiques amorcés par le système VEGF/VEGF-R2.

Au niveau du système vasculaire, le VEGF *via* le VEGF-R2 stimule la perméabilité de l'endothélium, la survie, la migration et la prolifération des cellules endothéliales, soit l'ensemble des étapes contribuant à l'angiogenèse (Figure 40).

- Afin de faciliter l'angiogenèse, la signalisation du VEGF-R2 induit une **perméabilité** du réseau vasculaire (Figure 40-1). La voie PI3K/Akt, tout comme la voie PLC γ /PKC, entraînent l'activation de l'enzyme eNOS (Holmes et al., 2007; Olsson et al., 2006). Le NO ainsi synthétisé augmente la perméabilité des vaisseaux. Le VEGF-R2 active également la Src qui en aval induit une internalisation de la VE-Cadhérine et une diminution des liaisons intercellulaires (Gavard and Gutkind, 2006).
- La voie PI3K/Akt est également impliquée dans la **survie** cellulaire (Figure 40-2), en activant la survivine et en inhibant les voies pro-apoptotiques comme la caspase-9 et Bad (*Bcl-2 associated agonist of cell death*) (Holmes et al., 2007; Olsson et al., 2006).
- La signalisation VEGF/VEGF-R2 participe également à la **migration** des cellules endothéliales (Figure 40-3). Plusieurs voies vont être activées afin de promouvoir la migration cellulaire comme la voie PI3K/IQGAP1, ou encore la voie de la FAK (*focal adhesion kinase*), toutes impliquées dans la réorganisation du cytosquelette par leur action sur les fibres d'actine (Holmes et al., 2007; Olsson et al., 2006). De plus, dans certaines cellules endothéliales comme les cellules endothéliales cérébrales humaines de microvaisseaux, l'activation du VEGF-R2 induit la sécrétion des MMPs (Funahashi et al., 2011). Ces MMPs pourront exercer un rétrocontrôle positif en libérant le VEGF séquestré dans la matrice (Lee et al., 2005).
- La signalisation du VEGF-R2 régule positivement la **prolifération** cellulaire (Figure 40-4) *via* l'activation de la voie PLC γ /PKC/Erk/MAPK (Holmes et al., 2007; Takahashi et al., 2001). Certaines études ont également montré une prolifération des cellules HUVEC (*human umbilical vein endothelial cell*), induite par la voie Ras/Raf/MEK/MAPK (Meadows et al., 2001).



Le VEGF, par sa capacité à contrôler toutes les étapes de l'angiogenèse, a longtemps été considéré comme le facteur cardinal de l'angiogenèse. Toutefois, il est désormais admis que ce facteur ne peut à lui seul induire la formation de nouveaux vaisseaux parfaitement fonctionnels. Une autre famille de protéines est décrite pour agir de concert avec le VEGF : la famille des Angiopoïétines.

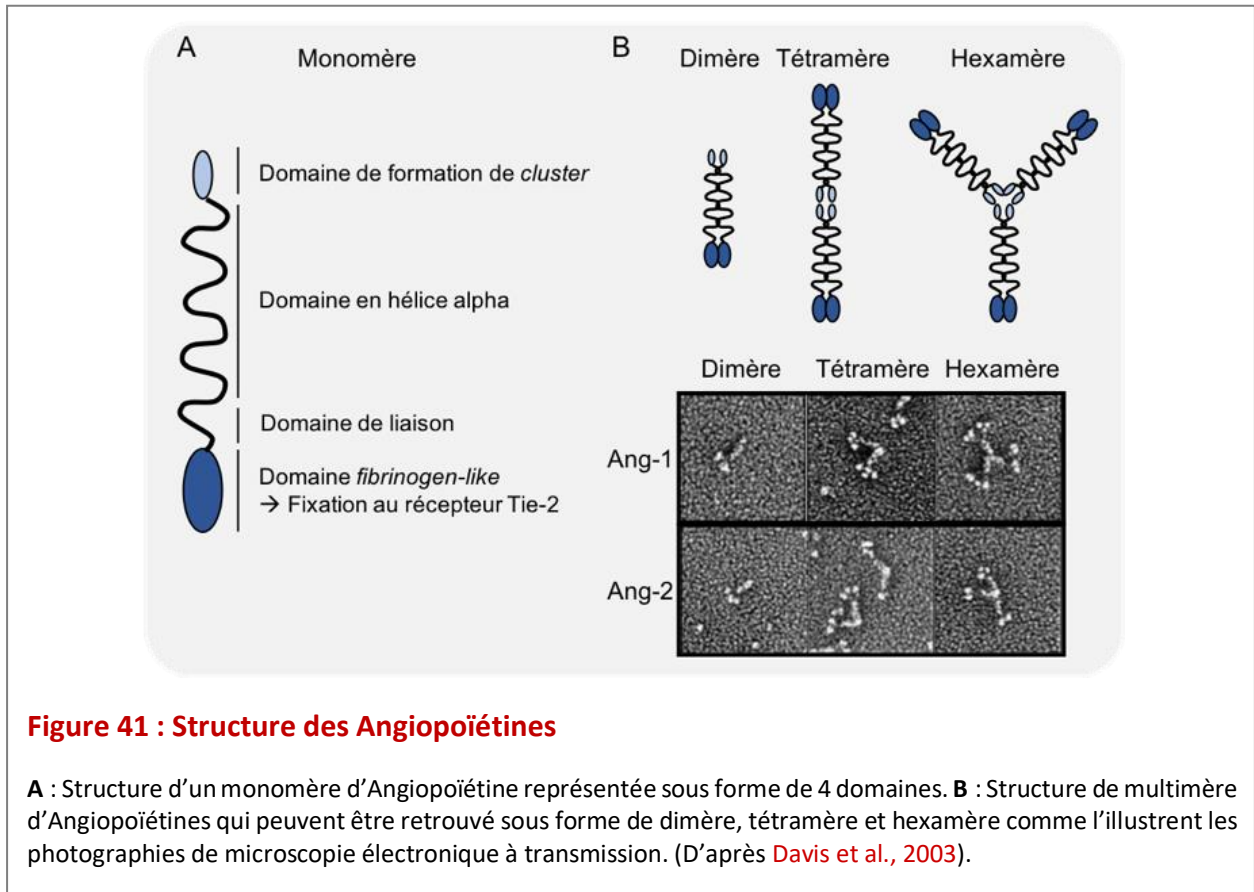
I.5 Les Angiopoïétines et leurs récepteurs

I.5.1 Les Angiopoïétines

Les Angiopoïétines représentent une famille majeure des facteurs angiogéniques. Elles régulent effectivement le développement vasculaire mais aussi la stabilité de ce réseau par le biais du récepteur Tie-2 (*tyrosine kinase with immunoglobuline and epidermal growth factor homology domain*). Historiquement, le récepteur fut isolé dans les années 1980, parallèlement à la famille des VEGFs, bien avant la découverte des Angiopoïétines, Ang-1 et Ang-2, qui furent découvertes respectivement en 1996 et 1997 (Maisonpierre et al., 1997; Suri et al., 1996).

Les gènes *ANG-1* et *ANG-2* se situent tous deux sur le chromosome 8q23.1 et codent pour des protéines de 57 kDa. Plus récemment, la famille des Angiopoïétines s'est agrandi avec la découverte de l'Ang-4 (dont l'orthologue chez la souris, est Ang-3).

Les Angiopoïétines sont des protéines qui sont glycosylées avant d'être sécrétées. Leur poids moléculaire est alors de l'ordre de 70 kDa. Elles présentent une structure en 4 domaines (**Figure 41A**). Le domaine N-terminal ou domaine de formation de *cluster*, suivi d'un domaine en hélice α , d'un domaine de liaison et enfin d'un domaine *fibrinogen like* en C-terminal qui est impliqué dans la fixation au récepteur. Les Angiopoïétines existent majoritairement sous une forme multimérique allant du dimère à l'héxamère (**Figure 41B**). Cette organisation implique le domaine en hélice α et le domaine de liaison qui permettent de retrouver principalement l'Ang-1 sous forme de tétramère et l'Ang-2 sous forme dimérique (Davis et al., 2003).



Bien que ces deux cytokines présentent 60 % d'homologie de séquences, on retient communément qu'elles exercent des effets biologiques opposés après s'être fixées à leur récepteur. Par ailleurs, elles présentent des profils d'expression cellulaire spécifiques.

1.5.2 Expression cellulaire des Angiopoïétines

- La source majoritaire de l'Ang-1, au niveau de l'endothélium, ne serait pas les cellules endothéliales mais les cellules péri-endothéliales. L'Ang-1 est, en effet, exprimée principalement par les cellules musculaires lisses et les péricytes (Kim et al., 2000b; Sundberg et al., 2002). Aucune expression d'Ang-1 n'est détectée dans les cellules endothéliales.

Il est à noter qu'après sécrétion par les cellules, l'Ang-1 a la capacité de se lier à la MEC par son peptide « linker » situé dans le domaine *fibrinogen like* (Xu and Yu, 2001). Cette séquestration permet une action rapide de l'Ang-1 lors du remodelage matriciel.

- L'Ang-2 est, en revanche, principalement produite par les cellules endothéliales (Hegen et al., 2004). Lorsque le système vasculaire est quiescent, l'Ang-2 est stockée dans les corps

de Weibel-Palade, granules retrouvés spécifiquement dans ces cellules endothéliales. Ce mode de stockage permet une sécrétion rapide de cette cytokine en réponse à différents stimuli comme la thrombine, l'histamine ou encore le VEGF (Cossutta et al., 2019; Fiedler et al., 2004).

Plus récemment, tout comme pour le VEGF, une expression au niveau des cellules nerveuses de l'Ang-1 et l'Ang-2 a été décrite et plus spécifiquement dans les astrocytes, neurones et les progéniteurs neuronaux (Marteau et al., 2013; Valable et al., 2003). Plus récemment, une expression de l'Ang-2 a été décrite dans les oligodendrocytes (Kawashima et al., 2019).

L'expression des Angiopoïétines est, comme celle du VEGF, sous contrôle des signaux capables de réguler l'angiogenèse.

1.5.3 Régulation d'expression des Angiopoïétines

Différents stimuli environnementaux du compartiment vasculaire participent à la régulation d'expression des Angiopoïétines. De façon non exhaustive, nous retiendrons les principaux.

- L'hypoxie est l'un des signaux majeurs du contrôle d'expression des Angiopoïétines. Ainsi, *in vitro*, un traitement hypoxique, suite à l'activation de HIF-2, est capable d'induire l'expression de l'Ang-1 dans des péricytes alors que HIF-1 serait impliqué dans l'augmentation d'expression d'Ang-2 dans des cellules endothéliales issues de microvaisseaux cérébraux (Mandriota and Pepper, 1998; Park et al., 2016b; Simon et al., 2008). L'implication de HIF dans la régulation des Angiopoïétines n'est cependant pas clairement élucidé et semble être cellule-dépendante puisqu'une autre étude réalisée sur des cellules endothéliales HUVEC, relate, certes, une induction d'expression de l'Ang-2 mais indépendamment de l'activation de ce facteur de transcription (Pichiule et al., 2004).
- Certaines cytokines pro-angiogéniques, comme le VEGF et le bFGF, modulent positivement l'expression de l'Ang-2 (Mandriota and Pepper, 1998).
- Le contact cellulaire semble également jouer un rôle dans la régulation d'expression d'Ang-2. Choi et al, ont montré, sur des cellules endothéliales en front de vascularisation, que

le contact intercellulaire *via* la VE-Cadhérine permet d'activer le co-activateur de transcription YAP (*Yes-associated protein*), qui induit en final une expression d'Ang-2 (Choi et al., 2015).

- Enfin, les Angiopoïétines sont également modulées en réponse à des cytokines pro-inflammatoires tel le TNF- α dont la présence conduit à une augmentation d'expression de l'Ang-2 mais aussi de l'Ang-1 (Brown et al., 2004; Kim et al., 2000b). Le facteur de transcription ETS (*epithelium-specific ESE-1*) a été identifié comme un des facteurs inducteurs de l'Ang-1 dans ces conditions (Brown et al., 2004).

I.6 Les récepteurs aux Angiopoïétines

I.6.1 Le récepteur Tie-2

La famille des récepteurs dénommée Tie ou Tek (*tunica interna endothelial cell kinase*) est composée de deux membres : Tie-1 et Tie-2 (Figure 42). Ces récepteurs sont des monomères de 145 kDa composés d'un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et enfin un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. Le domaine extracellulaire peut être décomposé comme suit : deux domaines *IgG-like*, trois *domaines EGF-like*, un troisième domaine *IgG-like* et trois domaines *fibronectin type III* (Augustin et al., 2009). Ces deux récepteurs affichent 33 % de similitude dans leur domaine extracellulaire et 73 % dans leur domaine intracellulaire. A ce jour, le récepteur Tie-1 est toujours orphelin. Néanmoins, ce récepteur en formant des complexes hétérodimériques avec Tie-2 (Tie-1/Tie-2) est essentiel, dans certaines conditions, pour l'activité agoniste des Angiopoïétines sur Tie-2 (Leppänen et al., 2017).

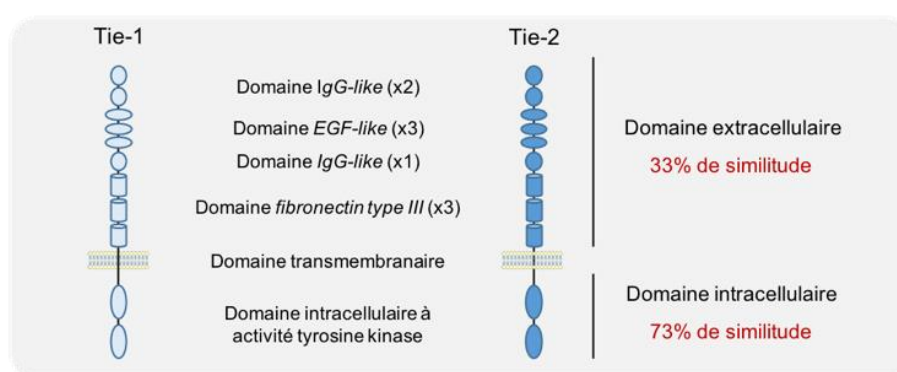


Figure 42 : Représentation de la structure des récepteurs Tie

Les récepteurs Tie-1 et Tie-2 sont des récepteurs à activité tyrosine kinase qui présentent une grande homologie et sont organisés en différents domaines de type IgG (*Immunoglobuline like*), EGF (*epidermal growth factor*) et fibronectine type III. (D'après Augustin et al., 2009).

Toutefois, la majorité de la signalisation des Angiopoïétines se fait par le biais de Tie-2 sous forme d'homodimères Tie-2/Tie-2.

Contrairement aux Angiopoïétines, l'expression cellulaire des récepteurs Tie est plus large. Bien qu'initialement décrit comme spécifique des cellules endothéliales, le récepteur Tie-2 est également retrouvé au niveau des monocytes/macrophages, des neutrophiles, des éosinophiles, des neurones et des cellules souches neurales (Feistritzer et al., 2004; Lemieux et al., 2005; Parati et al., 2002; Valable et al., 2003; Venneri et al., 2007).

1.6.2 La signalisation du système Ang/Tie

Tout comme pour le système VEGF/VEGF-R, les modèles de souris transgéniques ont permis d'établir que tous les acteurs du système Angiopoïétines/Tie-2 sont essentiels pour le développement et la maturation du réseau vasculaire. Ainsi, l'inactivation du gène *TIE-2* chez la souris, induit une déstructuration du réseau vasculaire conduisant à la mort des embryons à un stade précoce E10 (Dumont et al., 1994). Les souris *knock-out* (KO) pour le gène *ANG-1*, tout comme les souris KO pour *TIE-2*, meurent également au stade embryonnaire avec un phénotype semblable (Suri et al., 1996). Au contraire, les souris KO pour le gène *ANG-2* ne présentent pas de mortalité embryonnaire (Fiedler et al., 2006). Ces observations ont permis de proposer que le système Ang/Tie-2 n'est pas indispensable à la vasculogénèse mais qu'en revanche, il interviendrait dans la prolifération et la maturation du système vasculaire. En accord avec cette hypothèse, les souris transgéniques surexprimant l'Ang-1 présentent une forte densité vasculaire alors que les souris surexprimant l'Ang-2 meurent au stade embryonnaire E10 avec des défauts de la vascularisation (Maisonpierre et al., 1997; Suri et al., 1998). Ces différences observées respectivement pour les souris transgéniques surexprimant l'Ang-1 et l'Ang-2 ont contribué à définir le rôle respectif de chacun de ces facteurs dans le processus angiogénique. C'est ainsi que différents auteurs ont proposé que l'Ang-2 agirait dans les premières phases du processus angiogénique afin d'induire une déstabilisation des vaisseaux alors que l'Ang-1 agirait plus tardivement dans les étapes de maturation des vaisseaux. Ainsi, si le ratio Ang-1/Ang-2 en conditions physiologiques est de 8/1 afin de maintenir les vaisseaux dans un état stabilisé, celui-ci s'inverse pour prendre une valeur de 1/8 pour les vaisseaux en restructuration (Goede et al., 1998).

I.6.3 Ang-1 et Ang-2 : deux ligands pour un même récepteur

Historiquement, l'Ang-1 et l'Ang-2 ont été décrites comme exerçant respectivement, des rôles d'agoniste et d'antagoniste du récepteur Tie-2 (Davis et al., 1996; Maisonpierre et al., 1997). Bien qu'elles ne présentent qu'une homologie structurale de 60 %, l'Ang-1 et l'Ang-2 se lient au récepteur Tie-2 avec une affinité identique (Maisonpierre et al., 1997).

Ce couple de protéines représente un système unique en biologie : en se liant à Tie-2, l'Ang-2 empêche la fixation de l'Ang-1 et bloque donc les effets de cette dernière (Maisonpierre et al., 1997). Des études structurales ont montré que la région extracellulaire du récepteur constitué du 1er domaine de type IgG et des trois domaines de type fibronectine était nécessaire et suffisante pour lier l'Ang-1 et l'Ang-2, suggérant que les différentes fonctions de ces deux ligands de Tie-2 ne pouvaient s'expliquer par une différence de liaison au récepteur (Fiedler et al., 2003).

Concernant l'Ang-1, il a été démontré que la forme tétramérique de cette cytokine était la structure minimale requise pour induire l'activation de Tie-2 (Davis et al., 2003). De façon paradoxale, des dimères de cette même cytokine développent une activité antagoniste pour ce récepteur. Mais de façon plus surprenante, l'Ang-2 est capable de s'oligomériser suivant le même schéma que l'Ang-1 suggérant ainsi que son activité antagoniste serait due à une propriété structurale subtile qui pourrait se localiser au niveau de la séquence de liaison au récepteur (Yu et al., 2013).

Cette dichotomie de rôle entre ces deux Angiopoïétines n'est plus aussi stricte puisqu'un certain nombre d'études a depuis rapporté que selon le type cellulaire et suivant la concentration utilisée, l'Ang-2 peut activer la signalisation du récepteur Tie-2 et jouer aussi un rôle d'agoniste pour ce récepteur Tie-2 (Kim et al., 2000a). Cependant, nous décrivons dans ce manuscrit les données les plus documentées et établies pour chacune de ces Angiopoïétines.

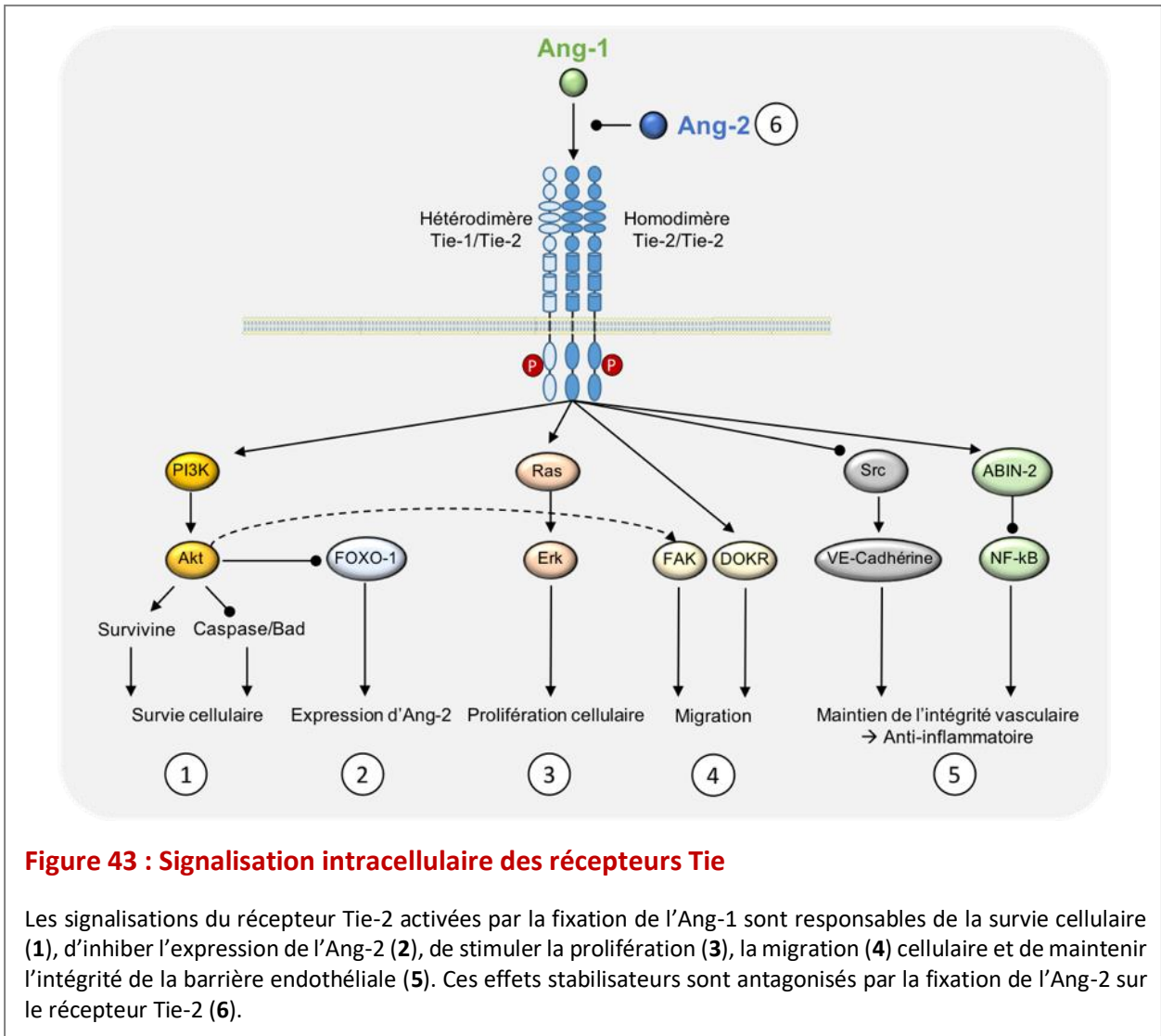
I.6.4 Effets biologiques de l'Ang-1

L'Ang-1, en se liant à son récepteur Tie-2, induit la dimérisation du récepteur et son autophosphorylation au niveau des résidus tyrosine. Cette phosphorylation activatrice permet de recruter de nombreux effecteurs qui initieront des cascades de signalisations intracellulaires (Figure 43). Ces signalisations seront responsables de la

survie/prolifération/migration cellulaire et du maintien de la barrière endothéliale : l'Ang-1 a un rôle protecteur sur la vascularisation.

- L'activation de Tie-2 par Ang-1 favorise la **survie** des cellules endothéliales (**Figure 43-1**) *via* la voie de signalisation PI3K/Akt/survivine ou PI3K/Akt/Bad, sans toutefois modifier la prolifération cellulaire (Davis et al., 1996; Kim et al., 2000b). L'activation de cette voie de signalisation participe également à limiter un effet potentiel d'Ang-2. En effet, en parallèle, la voie Akt induit l'inactivation par phosphorylation du facteur de transcription FOXO-1 (*forkhead box O*), qui contrôle l'expression d'Ang-2. Ce rétrocontrôle négatif sur l'expression d'Ang-2 (**Figure 43-2**) permet le maintien du phénotype quiescent du système vasculaire (Daly et al., 2004).
- Cependant, dans certaines conditions, lorsque les contacts intercellulaires sont absents, la phosphorylation de Tie-2 active préférentiellement la voie Ras/ERK qui promeut la **prolifération** des cellules endothéliales (**Figure 43-3**), au détriment de la voie Akt (Fukuhara et al., 2008).
- La phosphorylation de Tie-2 suite à la fixation de l'Ang-1 stimule également la **migration** des cellules endothéliales (**Figure 43-4**) *via* la voie DOKR et la voie PI3K. En effet, cette voie PI3K permet le remodelage du cytosquelette par la phosphorylation de la FAK (Makinde and Agrawal, 2008).
- Ce système Ang-1/Tie-2 maintient également la **perméabilité** des cellules endothéliales (**Figure 43-5**). En effet, la phosphorylation de Tie-2 permet une séquestration de la protéine Src et un maintien des jonctions inter-endothéliales par les VE-Cadhérines. En absence d'Ang-1 mais en présence de VEGF, la protéine Src induit une cascade de signalisation qui aboutit à la phosphorylation et l'internalisation de la VE-Cadhérine (Gavard and Gutkind, 2006). De plus, cette séquestration de Src s'oppose aux effets du VEGF et contribue ainsi au maintien du phénotype quiescent des cellules endothéliales (Gavard et al., 2008).

Afin de renforcer le maintien de la barrière endothéliale, l'activation de Tie-2 par l'Ang-1, permet également le recrutement et l'activation de ABIN-2 qui inhibe secondairement la protéine NF-κB et l'expression des gènes liés à **l'inflammation** dépendants de NF-κB, tels que *ICAM-1* (*intracellular adhesion molecule-1*), *VCAM-1* (*vascular cell adhesion molecule-1*) ou encore la E-Sélectine (Hughes et al., 2003).



1.6.5 Effets biologiques de l'Ang-2

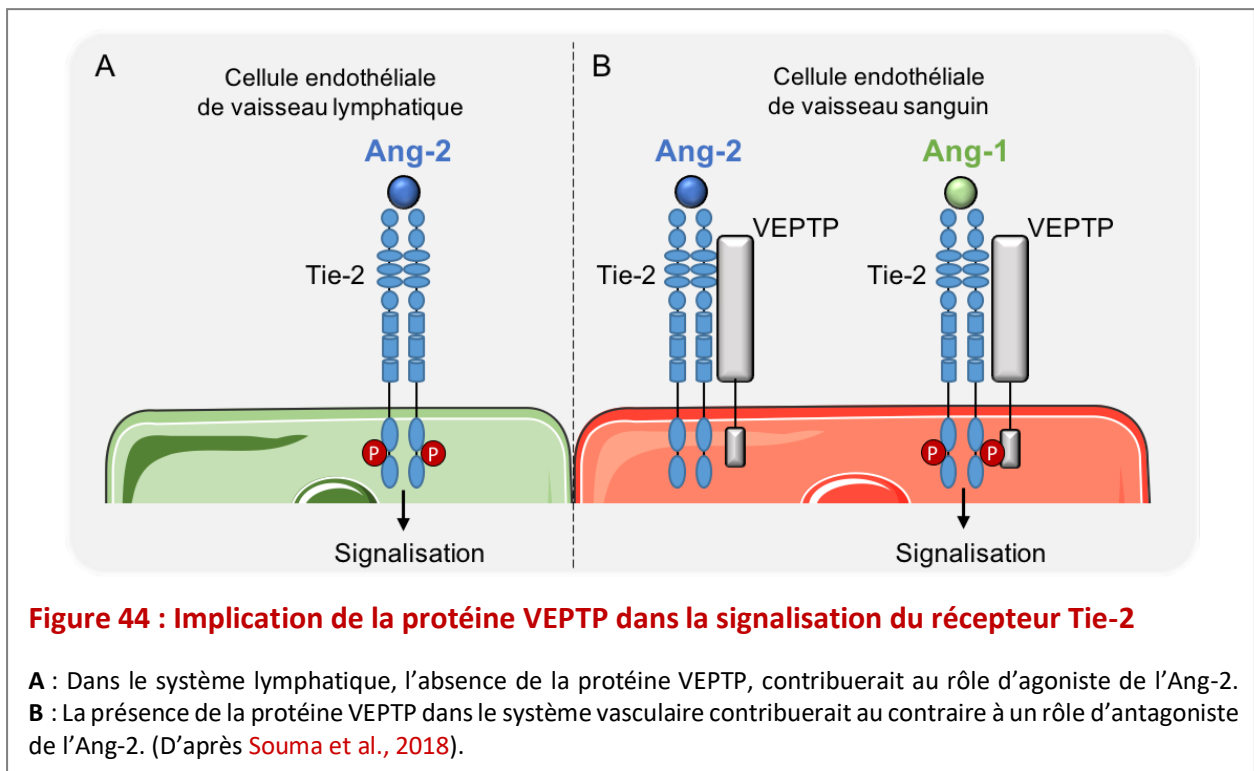
L'Ang-2, comme énoncé précédemment, se lie à Tie-2 avec une affinité similaire à l'Ang-1. Longtemps considérée comme antagoniste du récepteur Tie-2, l'Ang-2 s'oppose à l'Ang-1 et inhibe la phosphorylation de Tie-2 (Figure 43-6), comme en attestent depuis un certain nombre d'études menées *in vitro* et *in vivo* (Maisonpierre et al., 1997; Yuan et al., 2009). La liaison d'Ang-2 sur Tie-2 interfère alors avec les effets stabilisants d'Ang-1, rendant

les vaisseaux plus accessibles et plus sensibles à d'autres facteurs angiogéniques tels que le VEGF.

Depuis, plusieurs études ont montré que l'Ang-2 pouvait aussi exercer un rôle d'agoniste. Effectivement, les rôles agonistes et antagonistes de cette cytokine seraient dépendants du contexte cellulaire, de sa concentration disponible dans l'environnement et de la présence ou non de certains autres partenaires de la voie de signalisation Tie-2 (Kim et al., 2000a).

- Lorsque la liaison d'Ang-2 sur le récepteur Tie-2 induit une phosphorylation de ce récepteur, celle-ci est toutefois moins importante que celle observée en réponse à l'Ang-1 (Yuan et al., 2009). C'est ainsi qu'à forte concentration (800 ng/ml), l'Ang-2, en activant la voie PI3K favorise, tout comme l'Ang-1, la **prolifération** des cellules endothéliales (Kim et al., 2000a). Un effet **pro-angiogénique** de l'Ang-2 a également été observé sur un modèle *in vitro* d'angiogenèse, bien que plus faible que celui obtenu avec l'Ang-1 mais spécifique d'une liaison au récepteur Tie-2 puisque bloqué par le récepteur soluble correspondant (Teichert-Kuliszewska et al., 2001).
- Tout comme le VEGF, l'Ang-2 serait également un facteur **perméabilisant**. En effet, Peters et al., ont montré sur des cellules endothéliales de rétine en culture, une augmentation de la perméabilité exercée par l'Ang-2, renforcée en présence de VEGF (Peters et al., 2007). Cette perméabilité pourrait être liée à la diminution d'expression de ZO-1 (*zonula occludens-1*) au niveau des jonctions serrées de ces cellules. Cependant, cet effet perméabilisant de l'Ang-2 est actuellement discuté puisqu'il a été rapporté sur des modèles *in vivo* d'ischémie cérébrale et d'inflammation qu'un apport d'Ang-2 réduit la perméabilité vasculaire de façon similaire à l'Ang-1 (Daly et al., 2006; Marteau et al., 2013).
- Il est désormais démontré que l'Ang-2 fonctionne comme un agoniste Tie-2 dans l'endothélium lymphatique (**Figure 44A**), contrairement à son rôle antagoniste dans le système vasculaire sanguin (**Figure 44B**). Souma et al, ont émis l'hypothèse que la fonction agoniste/antagoniste contexte-dépendante de l'Ang-2 et ses effets opposés sur Tie-2 dans des lits vasculaires différents (lymphatique versus vasculaire) pourraient s'expliquer par une expression différentielle de régulateurs négatifs impliqués dans la voie de signalisation de

Tie-2, tels que la protéine VEPTP (*vascular endothelial protein tyrosine phosphatase*) (Souma et al., 2018).



De la même façon, il a été proposé plus récemment que l'effet agoniste/antagoniste d'Ang-2 dépendrait de l'hétérodimérisation de Tie-2 avec Tie-1. En effet, en absence de Tie-1, l'activité agoniste de l'Ang-2 disparaît pour *switcher* vers un rôle d'antagoniste (Korhonen et al., 2016).

1.6.6 Tie-1, un partenaire de Tie-2 ?

La signalisation de Tie-1 est restée très longtemps méconnue. Cependant, comme nous venons de le mentionner, le récepteur Tie-1 peut être, dans certaines conditions, nécessaire pour une activation totale du récepteur Tie-2. En effet, la délétion du récepteur Tie-1 réduit la phosphorylation activatrice du récepteur Tie-2. Ce rôle de Tie-1 serait également dépendant de l'environnement. Par exemple, en conditions inflammatoires, le TNF- α en clivant Tie-1, contribue à diminuer la signalisation intracellulaire du récepteur Tie-2 induite par Ang-1. S'en suivra une translocation et une activation du facteur FOXO-1, régulateur positif de l'Ang-2. Dans ces conditions, l'équilibre sera en faveur de l'Ang-2 : l'Ang-2 sera surexprimée alors que

dans le même temps, l'expression de Tie-2 et de l'Ang-1 sera diminuée (Korhonen et al., 2016). Le clivage de Tie-1 favorise ainsi le rôle antagoniste de l'Ang-2 dont la conséquence sera de déstabiliser la vascularisation permettant alors une meilleure accessibilité du VEGF aux cellules endothéliales.

1.6.7 Les intégrines : récepteurs alternatifs aux Angiopoïétines

Indépendamment du récepteur Tie-2, les Angiopoïétines ont également la capacité de se lier à une autre famille de récepteurs membranaires, les intégrines (Felcht et al., 2012). Ces dernières se composent d'hétérodimères α/β présents à la surface des cellules. Ces molécules peuvent fixer certaines molécules de la MEC et servent alors de lien entre celles-ci et le cytosquelette de la cellule. La liaison de ces molécules aux intégrines provoque le regroupement de dimères, la formation de complexes d'adhésion et l'activation d'un grand nombre de voies de signalisation. De fait, les intégrines participent à la régulation de nombreux processus cellulaires tels le cycle cellulaire, l'expression génique, la réorganisation du cytosquelette, la différenciation et la migration cellulaire.

Carlson et al., ont été les premiers à montrer sur des cellules dépourvues du récepteur Tie-2, mais exprimant les intégrines, notamment l'intégrine α_5 , que l'Ang-1 et l'Ang-2 favorisaient leur adhésion et ce de la même façon que pour des cellules endothéliales possédant le récepteur Tie-2 (Carlson et al., 2001)

De façon intéressante, certains hétérodimères d'intégrines, comme le dimère $\alpha_5\beta_1$, pourraient également renforcer l'effet de la liaison d'Ang-1 à Tie-2 (Cascone et al., 2005).

On sait désormais que l'Ang-1 peut interagir avec d'autres hétérodimères d'intégrines tels que $\alpha\nu\beta_5$ et $\alpha_5\beta_1$ alors que l'Ang-2 se lie aux intégrines $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_5\beta_3$ et $\alpha\nu\beta_5$ afin de favoriser une signalisation intracellulaire dépendante de la FAK et la prolifération des cellules endothéliales (Felcht et al., 2012).

Ces interactions sont toutefois plus faibles à celles entre les Angiopoïétines et le récepteur Tie-2. Cependant, elles n'en sont pas moins nécessaires. Dans les conditions d'angiogenèse pour lesquelles les cellules *tip* expriment plus faiblement Tie-2 ou encore dans

les conditions inflammatoires pour lesquelles le clivage de Tie-1 diminue la phosphorylation de Tie-2, les intégrines joueront un rôle primordial dans le contrôle de l'angiogenèse.

I.7 Les systèmes Angiopoïétines/Tie et VEGF/VEGF-R: une action coordonnée de l'angiogenèse

Progressivement, les données de la littérature ont fait apparaître que l'effet du VEGF serait potentialisé par la présence des Angiopoïétines. La coopération VEGF/Ang-1 a été notamment démontrée par l'utilisation de souris double transgéniques surexprimant à la fois le VEGF et l'Ang-1 : ces souris présentent une densité vasculaire, au niveau de la peau, supérieure aux souris transgéniques surexprimant individuellement l'un ou l'autre de ces facteurs (Thurston, 2002).

Ces résultats ont permis de proposer un modèle de coopération entre les Angiopoïétines et le VEGF qui doivent agir, à l'état physiologique, de façon coordonnée et régulée dans le processus de formation des néo-vaisseaux (Figure 45).

- À l'état de quiescence (Figure 45-1), les vaisseaux sont dans un état mature et stable car l'Ang-1 permet de maintenir une forte cohésion entre les cellules endothéliales et les cellules dites murales (cellules musculaires lisses, péricytes).
- En réponse à un stimulus pro-angiogénique (Figure 45-2), l'Ang-2 surexprimée au niveau des cellules endothéliales s'oppose aux effets stabilisateurs de l'Ang-1. Le décollement des cellules péri-endothéliales et la perte de la signalisation Ang-1/Tie-2 qui s'en suivent, conduisent à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Dans ces conditions, le rôle antagoniste de l'Ang-2 induit une déstabilisation de l'endothélium.
- En présence de VEGF (Figure 45-3), celui-ci pourra se fixer sur son récepteur VEGF-R2 dont l'accessibilité sur les cellules endothéliales est favorisée par le décollement des cellules périvasculaires. L'activation de la signalisation VEGF/VEGF-R permettra la prolifération des cellules endothéliales et donc la synthèse de néo-vaisseaux (Hanahan, 1997). Cette étape nécessite donc une disponibilité du VEGF qui est soit néosynthétisé ou libéré de la MEC. Cette augmentation d'expression de VEGF contribuera à maintenir la déstabilisation vasculaire. Notamment, car le VEGF stimule la libération d'Ang-2 par les cellules endothéliales en augmentant l'exocytose des corps de Weibel Palade (Cossutta et al., 2019; Fiedler et al.,

2004). Par ailleurs, le VEGF a la capacité de cliver Tie-1, qui pour rappel favorise le rôle antagoniste de l'Ang-2 (Singh et al., 2012).

- La formation de bourgeons capillaires est alors observée. Ceux-ci deviennent des vaisseaux matures et fonctionnels sous l'influence de l'Ang-1 (Figure 45-4). Cette cytokine, libérée principalement par les cellules périmurales, en se fixant à son récepteur Tie-2, induit la libération secondaire de facteurs attractants par les cellules endothéliales (PDGF-B et TGF-β1) permettant le recrutement des cellules musculaires lisses et péricytes, qui viennent recouvrir les cellules endothéliales (Folkman and D'Amore, 1996; Uemura et al., 2002).

Une synthèse de MEC et de lame basale mais aussi un arrangement entre les protéines des jonctions inter-endothéliales sont également observés. Toutes ces étapes sont nécessaires pour que le néo-vaisseau soit fonctionnel.

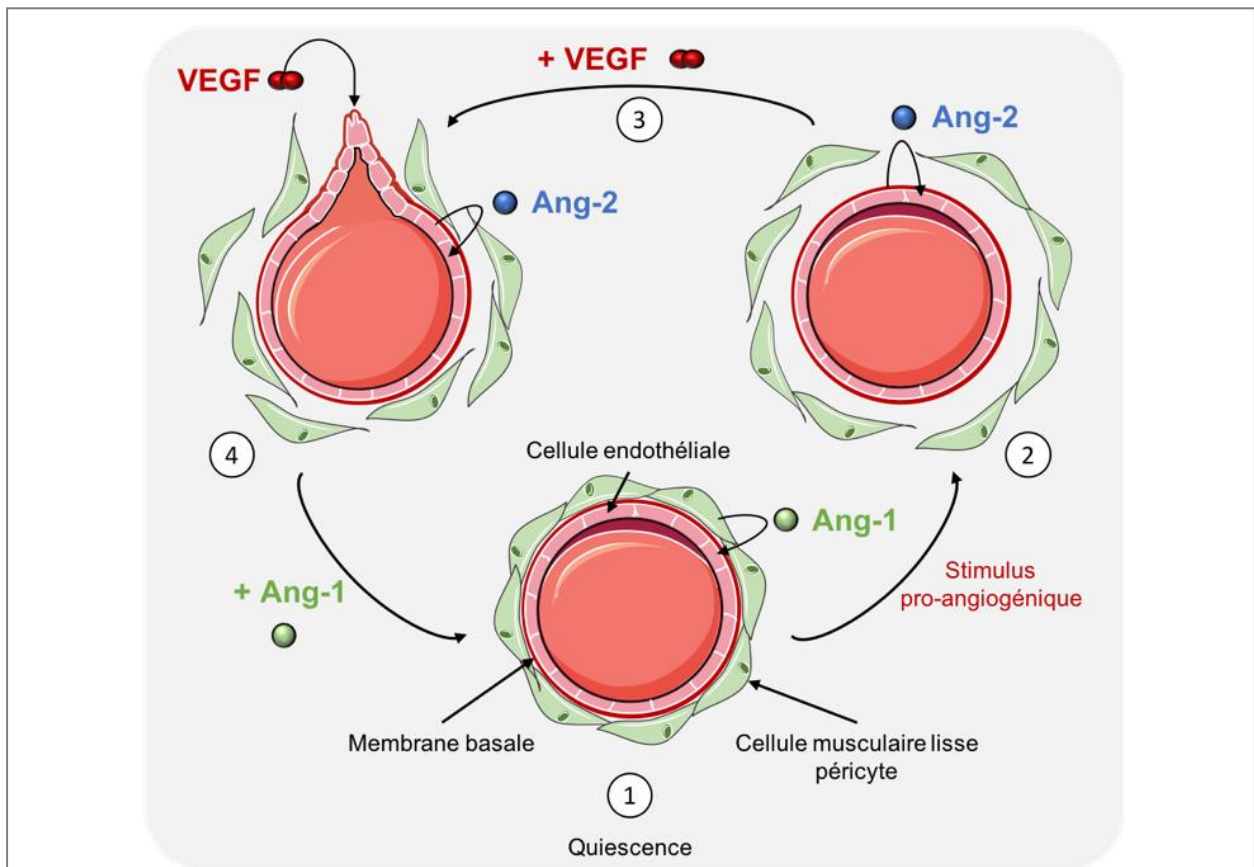


Figure 45 : Action synergique des Angiopoïétines et du VEGF dans l'angiogenèse

1 : À l'état quiescent, l'endothélium est stabilisé sous l'action de l'Ang-1. 2 : En réponse à un stimulus angiogénique, l'Ang-2 libérée s'oppose à l'Ang-1 et déstabilise la structure vasculaire. 3 : Le décollement des cellules murales rend alors accessible le récepteur VEGF-R, dont la signalisation induite par le VEGF sécrété et/ou libéré favorise l'expansion du réseau vasculaire. 4 : Les vaisseaux néo-synthétisés sont par la suite maintenus par la sécrétion d'Ang-1. (D'après Mandriota and Pepper, 1998).

L'angiogenèse est un processus finement régulé par un nombre important de facteurs activateurs ou inhibiteurs dont font partie le VEGF et les Angiopoïétines. Toutefois, lors de dérèglement ou dysfonctionnement des systèmes de régulation, ce phénomène peut devenir pathologique et être impliqué dans le développement de nombreuses maladies dont les cancers.

II. L'angiogenèse tumorale

II.1 Croissance tumorale et dépendance angiogénique

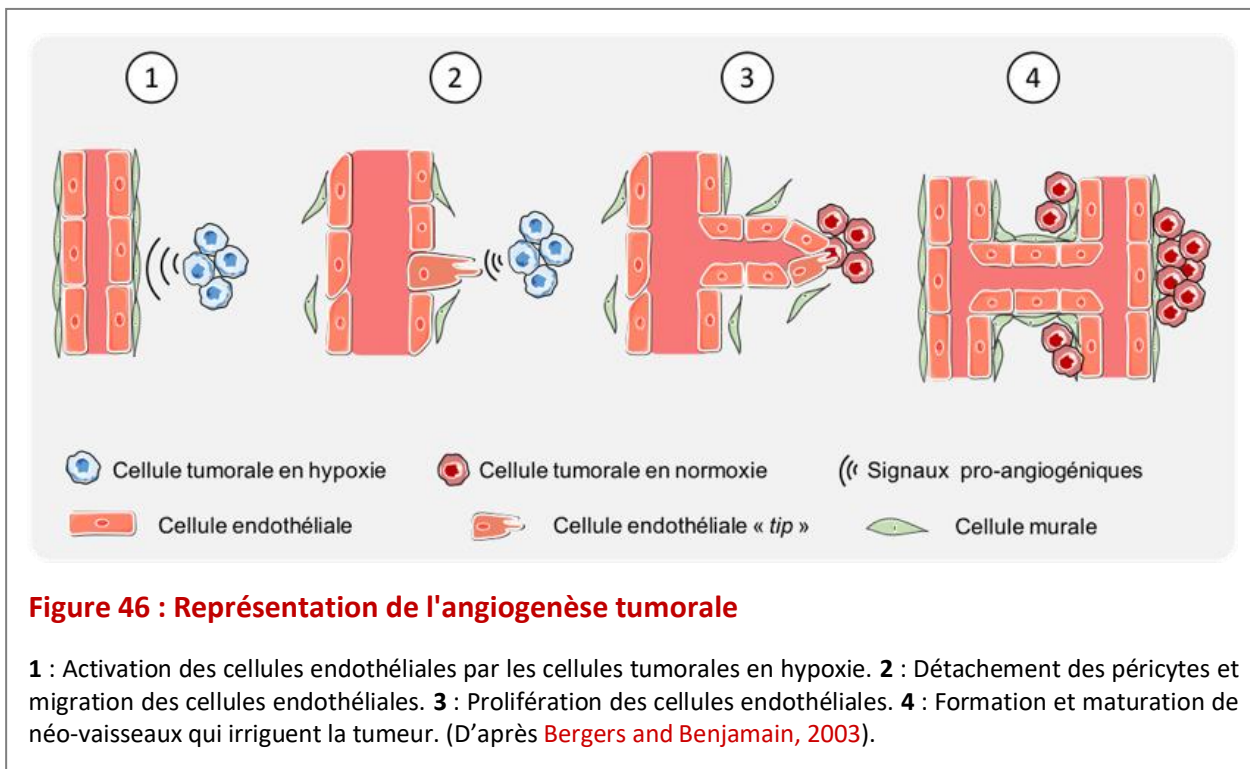
Le lien entre cancer et angiogenèse est établi depuis longtemps. Ce lien suggéré dès les années 1945, a été confirmé dans les années 1970, par Judah Folkman qui met en évidence que l'angiogenèse est un processus essentiel au développement d'une tumeur et que celle-ci ne peut se développer au-delà de 2-3 mm³ si celle-ci n'est pas vascularisée (Algire et al., 1945; Folkman, 1971). Le postulat formulé à cette époque était que pour répondre à leurs besoins, les cellules cancéreuses pouvaient produire des substances angiogéniques et ainsi induire, à distance, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

Il est actuellement établi que la croissance tumorale n'est pas linéaire et qu'elle se déroule selon deux phases distinctes : une première étape dite « avasculaire » suivie d'une seconde dans laquelle la vascularisation, et donc l'angiogenèse, joue un rôle essentiel.

II.2 *Switch* angiogénique et tumeur

Dans la plupart des cas, les cellules tumorales initient leur croissance dans un environnement avascularisé. Jusqu'à une taille généralement de quelques mm³, l'apport en nutriments et en oxygène est assuré par simple diffusion passive. Les tumeurs atteignent ensuite un « état de dormance » qui se caractérise par un équilibre entre prolifération et mort cellulaire. Puis, le « *switch* » angiogénique doit se produire pour réactiver le processus angiogénique nécessaire à la croissance tumorale. Différents stimuli peuvent être à l'origine du *switch* angiogénique et de l'initiation de l'angiogenèse : un stress métabolique (situation d'hypoxie, baisse du pH, chute de la concentration de glucose), un stress mécanique (pression induite par la prolifération cellulaire), des mutations géniques (activation d'oncogènes ou délétion de gènes suppresseurs de tumeurs) ou encore une réponse inflammatoire.

Parmi ces différents facteurs, l'hypoxie semble être l'élément prépondérant. Comme toutes cellules, les cellules cancéreuses ont besoin d'apport en oxygène et nutriments pour leur croissance. A partir d'un certain stade de développement de la tumeur, des cellules tumorales se trouvent trop éloignées des vaisseaux sanguins et l'apport par simple diffusion passive ne peut plus avoir lieu (limite de diffusion : 100-200 μm). Ces cellules se retrouvent donc en situation d'hypoxie, libèrent des facteurs pro-angiogéniques et ainsi induisent le phénomène d'angiogenèse (**Figure 46-1**). La prolifération des cellules endothéliales est alors fortement augmentée puisque le temps de doublement des cellules endothéliales dans la tumeur est d'environ 72 h, contre 1000 h en quiescence. L'angiogenèse débute par le détachement des péricytes et la dilatation des vaisseaux (**Figure 46-2**), puis le bourgeonnement vasculaire (**Figure 46-3**) et enfin la formation et la maturation de nouveaux vaisseaux (**Figure 46-4**). L'angiogenèse se poursuit tout au long de la croissance tumorale afin d'assurer un apport correct en oxygène et nutriments (**Bergers and Benjamin, 2003**).



II.3 Les vaisseaux tumoraux

II.3.1 Processus mis en jeu pour assurer la vascularisation tumorale

Au regard de la dépendance d'une vascularisation à proximité, la tumeur utilisera différents processus d'angiogenèse de façon à s'assurer de pouvoir bénéficier d'un flux sanguin (Hardee and Zagzag, 2012). Nous les décrirons brièvement.

L'angiogenèse par bourgeonnement (Figure 47-1) décrit précédemment dans le chapitre angiogenèse physiologique, est également l'un des mécanismes majeurs de l'angiogenèse tumorale. Cette angiogenèse sera sous le contrôle de la surexpression des facteurs pro-angiogéniques, en particulier le VEGF et l'Ang-2 mais qui, associés aux dérégulations de nombreuses voies de signalisation, et contrairement à l'angiogenèse physiologique, induiront une sélection aberrante de cellules *tip* et une angiogenèse accrue et incontrôlée.

La cooptation (Figure 47-2): la tumeur peut détourner à son profit les vaisseaux du tissu sain avoisinant. Ce procédé correspond à la « fusion » du réseau vasculaire du tissu hôte avec la vascularisation de la tumeur. Ce phénomène de cooptation intervient en partie, suite à l'invasion du tissu environnant par les cellules tumorales (Holash et al., 1999; Seano and Jain, 2020).

La vasculogenèse (Figure 47-3) : la néoangiogenèse tumorale peut aussi impliquer la participation de cellules souches et donc ré-initier chez l'adulte, en conditions pathologiques, un processus décrit au cours de l'angiogenèse développementale. Des précurseurs des cellules endothéliales circulants, issus des progéniteurs cellulaires de la moelle osseuse, peuvent être recrutés et participer à l'élaboration de la nouvelle vascularisation. Ce recrutement est stimulé par l'hypoxie retrouvée dans les tumeurs et suite à l'activation de HIF-1 α . Ce facteur HIF induit l'expression de VEGF et de SDF-1 qui génèrent une chimio-attraction des progéniteurs endothéliaux sur lesquels on retrouve le récepteur au SDF-1, dénommé CXCR4.

Le mimétisme vasculaire ou *vascular mimicry* (Figure 47-4) : ce mécanisme correspond à la formation de pseudo-vaisseaux suite à une incorporation de cellules tumorales, ou de macrophages dans le réseau vasculaire afin d'étendre celui-ci (Angara et al., 2017).

La transdifférenciation des cellules tumorales (Figure 47-5) : implique les CSG. En effet, celles-ci ont la capacité de se différencier en un phénotype « pseudo-endothélial » pour créer

un réseau vasculaire indépendamment du processus d'angiogenèse classique. Ce mécanisme de (trans)-différenciation a également été observé pour des macrophages ainsi que pour des cellules de GB différenciées (Ricci-Vitiani et al., 2010; Yan et al., 2011).

L'intussusception (Figure 47-6) : qui correspond à la séparation d'un vaisseau en deux, permet ainsi d'augmenter les ramifications au sein de l'arbre vasculaire.

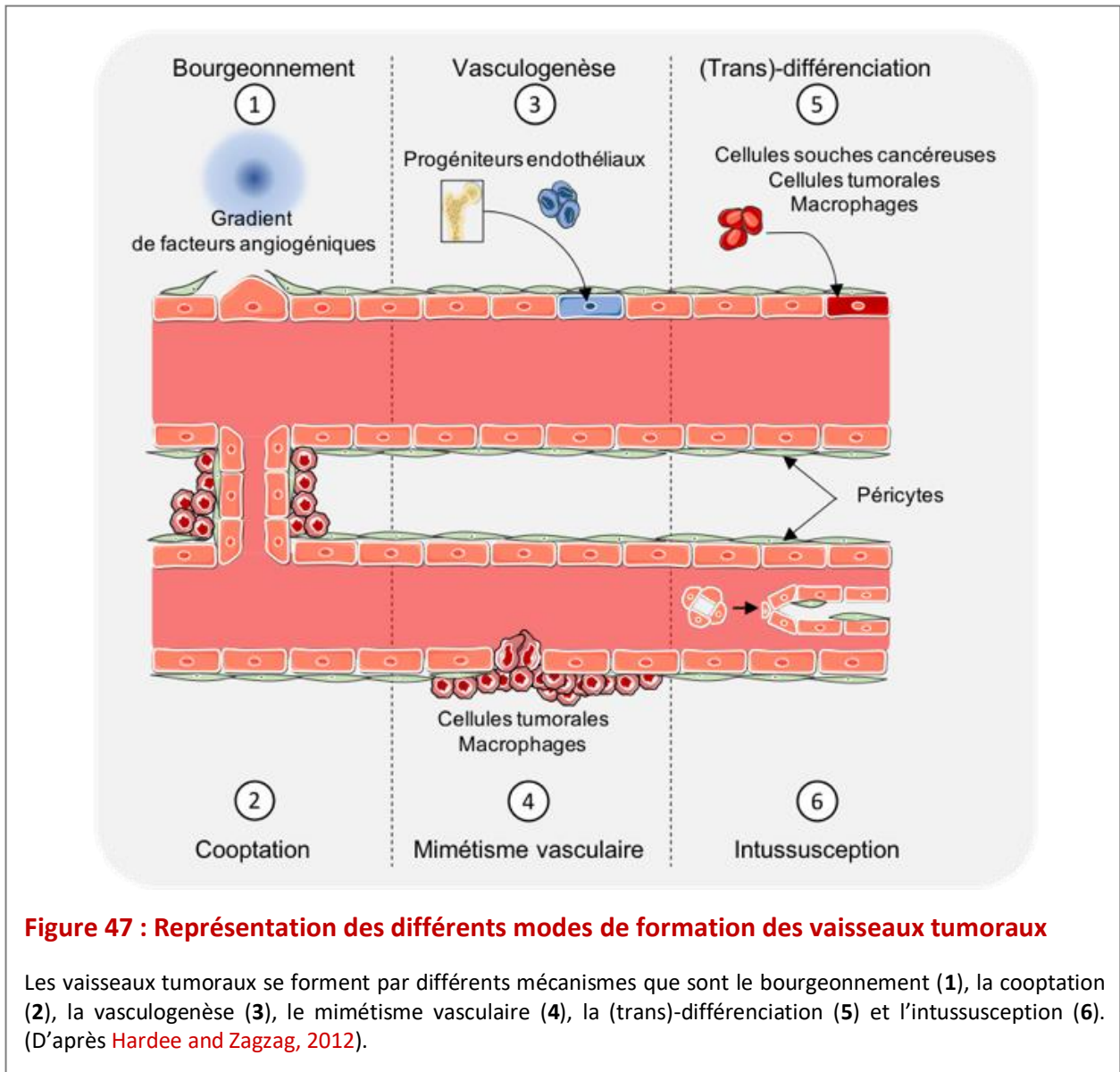


Figure 47 : Représentation des différents modes de formation des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux tumoraux se forment par différents mécanismes que sont le bourgeonnement (1), la cooptation (2), la vasculogenèse (3), le mimétisme vasculaire (4), la (trans)-différenciation (5) et l'intussusception (6). (D'après Hardee and Zagzag, 2012).

Cette angiogenèse tumorale fait donc intervenir les mêmes acteurs que l'angiogenèse dite physiologique, cependant en condition tumorale, l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques, retrouvé normalement à l'état de quiescence, est dérégulé et en faveur des acteurs pro-angiogéniques (Bergers and Benjamin, 2003). Ce déséquilibre aura pour

conséquence d’aboutir certes à la formation de néo-vaisseaux mais ces vaisseaux tumoraux seront « anormaux ».

II.3.2 Caractéristiques du réseau vasculaire tumoral

Quel que soit le mécanisme utilisé pour constituer le réseau vasculaire, les vaisseaux produits lors de l’angiogenèse tumorale sont anormaux à la fois d’un point de vue structurel et fonctionnel. Contrairement aux vaisseaux des tissus sains, ils sont hautement désorganisés, tortueux et de diamètres irréguliers. Ils sont caractérisés par des branchements et interconnexions excessifs. Leurs parois sont également fragiles et de constitution variable. Elles présentent des fenestrations en raison de jonctions intercellulaires lâches et élargies. La membrane basale est discontinue et incomplète ce qui conduit à une perméabilité accrue de ces vaisseaux.

Ces anomalies structurales ont des conséquences fonctionnelles. La structure de ces vaisseaux est à l’origine d’un flux sanguin irrégulier et chaotique. Ceci conduit, malgré la néovascularisation, à maintenir un état d’hypoxie et une acidité dans certaines régions des tumeurs. Ce phénomène contribue à entretenir une surproduction de facteurs pro-angiogéniques et participe ainsi à une persistance et une exacerbation de l’architecture anormale de ces vaisseaux.

Nous nous intéresserons dans la partie suivante de cette introduction à décrire les éléments majeurs à l’origine de cette angiogenèse dans les GB, tumeurs qui comme nous l’avons décrit en début d’introduction, sont hautement vascularisées, hypoxiques et très agressives.

II.4 L’angiogenèse dans les glioblastomes

II.4.1 Généralités

Dans les gliomes, la vascularisation est corrélée au grade de malignité et au pronostic de ces tumeurs (**Figure 48**) (Bekaert et al., 2017; Jain et al., 2015; Leon et al., 1996). Ainsi, les GB qui sont les formes les plus malignes des gliomes, font partie des tumeurs pour lesquelles les changements vasculaires apparaissent les plus marqués, notamment dans les régions bordant les zones de nécrose (Kleihues and Ohgaki, 2000). La présence de prolifération

vasculaire et de zones de nécrose annonce la croissance rapide et la progression clinique de ces tumeurs. Cette prolifération vasculaire intense est un critère histopathologique caractéristique des GB. Dans ces tumeurs, 12,5 % des cellules endothéliales sont en prolifération, ce qui suggère une multiplication par 40 du taux de renouvellement normal.

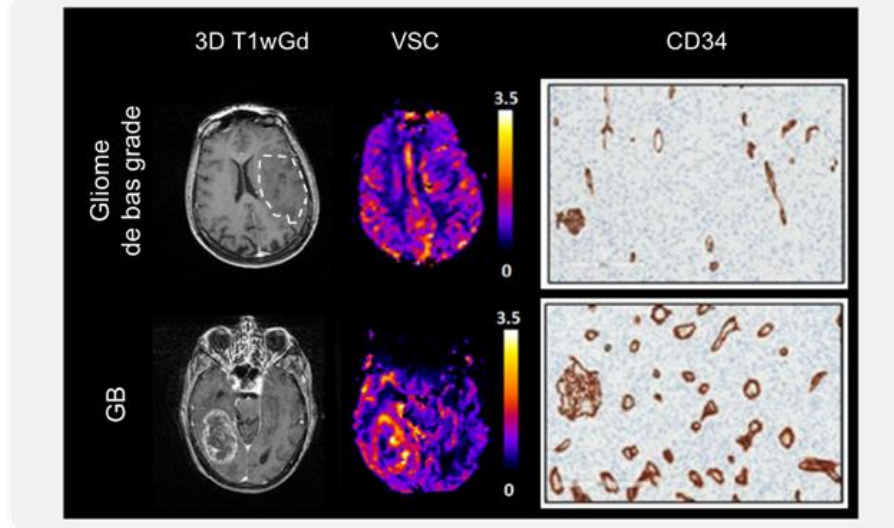


Figure 48 : La vascularisation dans les glioblastomes

Visualisation de la vascularisation dans un gliome de bas grade et dans un GB. L'analyse par IRM permet d'obtenir des cartes du volume sanguin cérébral (VSC) après injection d'un agent de contraste. (D'après [Bekaert et al., 2017](#)). Visualisation des structures vasculaires par un immunomarquage du CD34. (D'après [Guarnaccia et al., 2018](#)).

Le réseau microvasculaire des GB serait en constant remodelage, avec des phénomènes de cooptation, de régression vasculaire, puis formation de nouveaux vaisseaux puis régression... formant ainsi un cercle vicieux. Ce renouvellement chronique du réseau microvasculaire (qui est unique aux microvaisseaux tumoraux) a été décrit par Dvorak et al., comme « une blessure qui ne se cicatrise jamais » ([Dvorak et al., 1995](#)).

Les microvaisseaux des GB semblent avoir trois origines principales : l'angiogenèse, la cooptation et l'intussusception ([Hardee and Zagzag, 2012](#); [Holash et al., 1999](#)). Bien que la proportion de chacun de ces trois mécanismes ne soit pas encore très claire, il semble que l'angiogenèse et la cooptation soient les mécanismes principaux impliqués dans les premières étapes de la croissance tumorale et donc dans la progression des gliomes.

L'initiation de la vascularisation tumorale se fait effectivement par le processus de cooptation des vaisseaux préexistants proches du site d'initiation tumorale (Winkler et al., 2009). Ensuite, la régression des vaisseaux cooptés provoque l'apparition d'une hypoxie permettant la synthèse de facteurs pro-angiogéniques induisant secondairement une angiogenèse par bourgeonnement, toutefois anarchique.

L'intussusception intervient plus tardivement au cours du développement tumoral, dès lors que la vascularisation est instaurée.

Bien que ces 3 trois mécanismes soient les plus impliqués dans l'angiogenèse tumorale, on retrouve également dans les GB, les mécanismes énoncés précédemment tels que le recrutement de progéniteurs endothéliaux issus de la moelle osseuse, la différenciation des CSG, la transdifférenciation des cellules tumorales et le mimétisme vasculaire. Le mimétisme vasculaire, qui augmente avec le grade du gliome, est d'ailleurs associé à un mauvais pronostic pour le patient (El Hallani et al., 2010; Liu et al., 2011).

Au cours du développement tumoral, l'organisation des vaisseaux semble être spatialement régulée selon 3 zones distinctes. Une zone centrale « avasculaire » voire nécrotique, une zone intermédiaire constituée de gros vaisseaux tortueux et une zone périphérique qui se caractérise par des bourgeons vasculaires et des vaisseaux plus petits, assimilables à des capillaires (Forster et al., 2017). Ces données sont en faveur d'une angiogenèse « centrifuge ».

II.4.2 Structure des vaisseaux tumoraux dans les glioblastomes

Comme pour tout type de tumeurs solides, les vaisseaux présents dans les GB sont structurellement et fonctionnellement anormaux. En effet, les vaisseaux sont extrêmement tortueux et présentent un diamètre bien supérieur au réseau vasculaire du tissu sain (Figure 49A).

On retrouve effectivement, dans la zone intermédiaire de ces tumeurs des vaisseaux dont le diamètre peut varier de 3 à 40 μm , contre une moyenne de 8 μm pour les capillaires cérébraux du tissu sain (Forster et al., 2017; Torre et al., 1998). D'un point de vue fonctionnel, ces vaisseaux présentent une forte perméabilité avec notamment une perte d'expression de

VE-Cadhérine mais également une couverture péricytaire altérée associée à une diminution d'expression du PDGF-B et la persistance des facteurs pro-angiogéniques (Benjamin et al., 1999; Cooke et al., 2012; Hida et al., 2013; Sennino et al., 2007). De plus, cette vascularisation anarchique provoque des variabilités du flux sanguin et donc un défaut d'oxygénation dans la tumeur, pouvant générer des zones d'hypoxie aiguë et chronique. Cette hypoxie tumorale induite permet le maintien de l'angiogenèse tumorale, par l'expression des facteurs pro-angiogéniques, formant ainsi un cercle vicieux (Figure 49B).

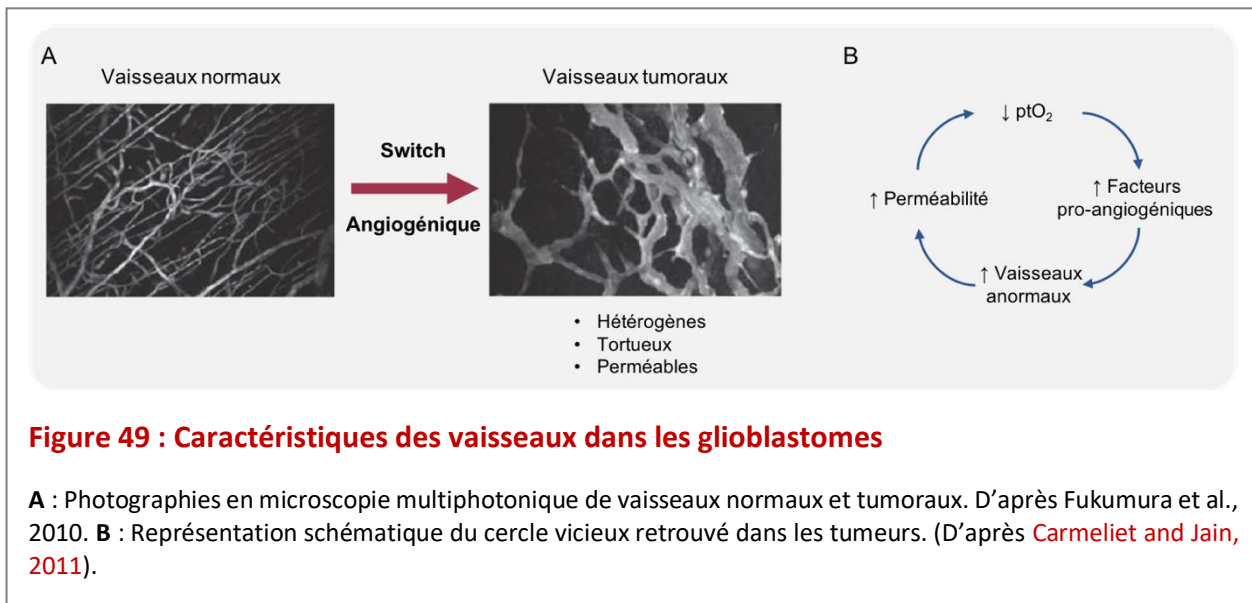


Figure 49 : Caractéristiques des vaisseaux dans les glioblastomes

A : Photographies en microscopie multiphotonique de vaisseaux normaux et tumoraux. D'après Fukumura et al., 2010. **B** : Représentation schématique du cercle vicieux retrouvé dans les tumeurs. (D'après Carmeliet and Jain, 2011).

II.5 Le switch angiogénique : l'hypoxie et les facteurs pro-angiogéniques, un duo indissociable

La forte prolifération des cellules tumorales ainsi que la vascularisation anormale des tumeurs, favorisent l'apparition de zones hypoxiques et/ou nécrotiques. Au niveau cellulaire, ce défaut d'oxygénation caractéristique des GB se traduit par une stabilisation du facteur HIF-1 α , qui se conclut alors par la synthèse et la sécrétion d'un grand nombre de facteurs pro-angiogéniques

Nous nous focaliserons dans la suite du manuscrit aux rôles exercés par le VEGF et les Angiopoïétines dans l'angiogenèse des GB.

II.5.1 Expression du VEGF et de ses récepteurs dans les glioblastomes

Plusieurs études ont décrit une surexpression du VEGF dans les glioblastomes en comparaison aux gliomes de bas grade (**Figure 50A**) et au tissu cérébral sain (Plate et al., 1992; Yao et al., 2001).

L'expression élevée et diffuse du VEGF dans les GB, est associée à un mauvais pronostic pour la survie globale des patients (**Figure 50B**) (Loureiro et al., 2020; Yao et al., 2001). Au cours du développement tumoral, les conditions environnementales des tumeurs cérébrales que sont l'hypoxie, l'acidose, le remodelage vasculaire mais aussi les mutations des cellules tumorales comme par exemple les mutations de p53, régulent positivement l'expression et la libération du VEGF (Fukumura et al., 2001; Kerbel, 2008). L'analyse des tissus tumoraux montre une expression du VEGF dans les cellules péri-nécrotiques ou cellules en palissade, confirmant ainsi l'implication de l'hypoxie dans l'induction de l'expression du VEGF dans ce tissu tumoral. Au niveau cellulaire, l'expression du VEGF, détectée au niveau des cellules endothéliales et inflammatoires, est également retrouvée dans les cellules tumorales illustrant l'hypothèse de Folkman selon laquelle les cellules tumorales synthétisent des facteurs angiogéniques.

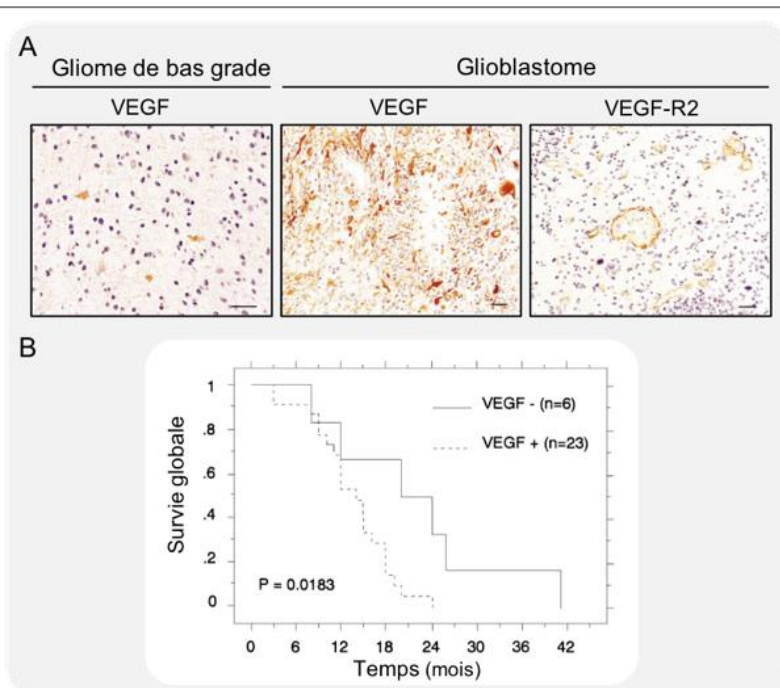


Figure 50 : Expression du système VEGF/VEGF-R dans les glioblastomes

A : Immunomarquage du VEGF et du VEGF-R2 dans un gliome de bas grade et dans un GB. **B** : Courbe de survie de patients porteurs de GB en fonction du niveau d'expression du VEGF. (D'après Yao et al., 2001).

Le VEGF, surexprimé dans les GB, peut alors agir sur la vascularisation en se fixant sur les récepteurs VEGF-R2 également surexprimés (**Figure 50A**), quant à eux, par les cellules endothéliales (Loureiro et al., 2020; Plate et al., 1993; Yao et al., 2001).

L'importance du VEGF et de ses récepteurs dans le processus angiogénique des GB a été notamment mise en exergue dans des études de corrélation. Celles-ci ont ainsi démontré une corrélation entre le niveau d'expression du VEGF avec la densité microvasculaire des gliomes et le volume sanguin cérébral de la tumeur (Bekaert et al., 2017; Yao et al., 2001).

Sur le plan mécanistique, ces données descriptives sont à rapprocher des effets biologiques du VEGF, décrits dans les chapitres précédents. Le VEGF néosynthétisé ou libéré de la MEC contribuera à la prolifération, migration des cellules endothéliales et ainsi à la formation des néo-vaisseaux. Sans oublier que le VEGF est un facteur doué également de propriétés de perméabilisation vasculaire suite à la perte des jonctions inter-endothéliales. Les conséquences de ces effets seront une perte de l'intégrité fonctionnelle de la BHE durant la croissance tumorale associée à une augmentation de la pression du liquide interstitiel (PLI). Cette augmentation de PLI est cruciale dans les tumeurs cérébrales car elle augmente l'œdème et la pression intracrânienne à l'origine de complications importantes pour les patients (Boucher et al., 1997; Gavard and Gutkind, 2006). En effet, en accord avec son effet perméabilisant, l'expression du VEGF est également corrélée avec les œdèmes tumoraux dans les gliomes.

II.5.2 Expression des Angiopoïétines et du récepteur Tie-2 dans les glioblastomes

Dans les tumeurs cérébrales, l'Ang-1 est fortement exprimée dans les tumeurs de haut grade mais est absente ou à l'état de traces dans le tissu cérébral sain et les tumeurs de bas grade (Stratmann et al., 1998). Toutefois, dans les GB, cette expression retrouvée au niveau des cellules tumorales est hétérogène avec des régions de marquage intense alternant avec des régions de marquage moins prononcé ou de marquage très faible (Ding et al., 2001). Grâce aux modèles animaux, il a été proposé que l'expression de l'Ang-1 apparaîtrait tardivement au cours de la croissance tumorale et pourrait intervenir dans la stabilisation des vaisseaux tumoraux (Zagzag et al., 1999). Ainsi, l'expression de l'Ang-1 ne semble pas prendre part précocement au processus tumoral et ne semble pas être un facteur indispensable à la mise en place de l'angiogenèse dans ces tumeurs.

II.5.2.1 Expression de l'Ang-2 dans les glioblastomes

Tout comme le VEGF, l'expression d'Ang-2 est corrélée au grade des gliomes (**Figure 51A**). Ainsi, l'Ang-2 est retrouvée principalement dans les GB, où son expression est corrélée à un mauvais pronostic chez le patient (**Figure 51B**) (Koga et al., 2001; Scholz et al., 2016). Au niveau cellulaire, l'Ang-2 est surexprimée aussi bien par les cellules endothéliales, principale source d'Ang-2, que par les cellules de GB mais dans une moindre proportion suggérant un rôle autocrine et paracrine de cette cytokine (Audero Enrica et al., 2001). L'observation des analyses immunohistochimiques, montre une expression d'Ang-2 localisée dans les régions péri-nécrotiques et périphériques de la tumeur (Koga et al., 2001).

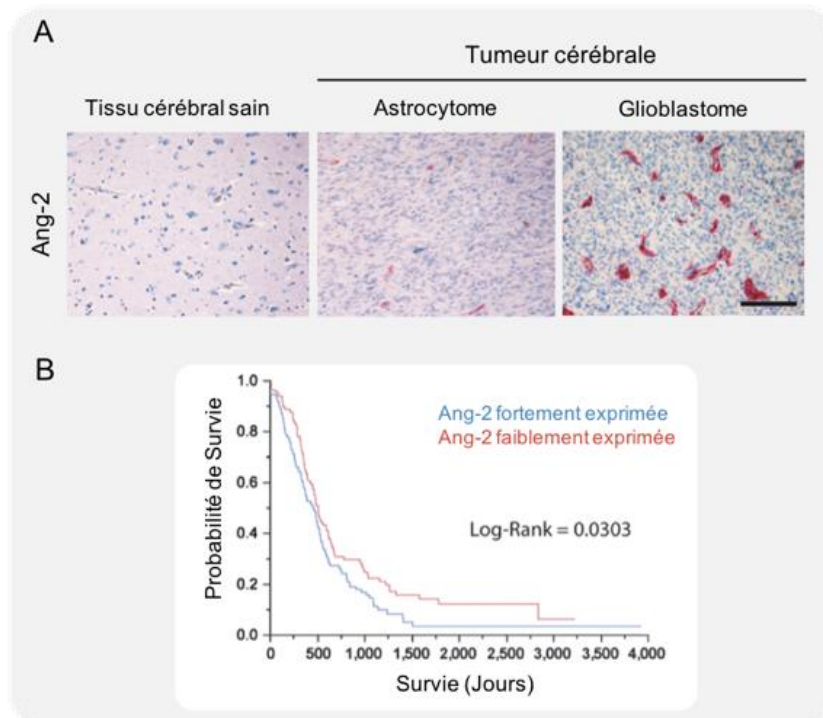


Figure 51 : Expression de l'Ang-2 dans les glioblastomes

A : Immunomarquage de l'Ang-2 dans le tissu cérébral sain et dans différents types de tumeurs cérébrales. Echelle = 100 µm. **B** : Courbes de survie des patients porteurs de GB en fonction de l'expression de l'Ang-2. (D'après Scholz et al., 2016).

De façon intéressante, cette localisation de l'Ang-2 mise en évidence par Koga et al., est à rapprocher de l'organisation de la vascularisation tumorale des GB (Koga et al., 2001). En effet, l'Ang-2 est retrouvée dans la zone centrale avasculaire et dans la zone périphérique caractérisée par la présence de bourgeons vasculaires et assimilable à une région

angiogénique de la tumeur. Ainsi, l'Ang-2 serait exprimée par les vaisseaux en prolifération mais également en régression (Koga et al., 2001). L'expression précoce de l'Ang-2 par les cellules endothéliales, participerait à la régression vasculaire, puis pour des phases plus tardives, en présence de VEGF, l'Ang-2 contribuerait à la formation des néo-vaisseaux tumoraux. En effet, l'hypoxie provoquée par la régression des vaisseaux, au sein de la masse tumorale, serait à l'origine de la synthèse de VEGF et d'Ang-2.

Ce mécanisme pathologique serait à rapprocher des mécanismes impliqués dans les remodelages vasculaires physiologiques qui ont clairement mis en évidence l'ambivalence de l'Ang-2 : en l'absence du VEGF, cette cytokine induit la régression des vaisseaux tumoraux alors qu'en présence de VEGF elle favorise la formation de nouveaux vaisseaux en facilitant l'effet du VEGF (Maisonpierre et al., 1997).

II.5.2.2 Expression de Tie-2 dans les glioblastomes

Comme l'Ang-2, une augmentation d'expression de Tie-2 semble être associée à un grand nombre de tumeurs, y compris les tumeurs cérébrales. Des études immunohistochimiques réalisées sur des gliomes humains ont ainsi mis en évidence une surexpression de Tie-2 dans les cellules endothéliales, dans les formes les plus malignes et les plus vascularisées des tumeurs cérébrales astrocytaires (Stratmann et al., 1998). Une étude temporelle de l'expression de Tie-2 dans un modèle orthotopique de GB chez le rat montre que celle-ci pourrait être tardive et être également liée à la mise en place d'une zone d'hypoxie au sein de la tumeur (Holash et al., 1999). En effet, l'expression de Tie-2 est induite par un stress hypoxique dans les cellules endothéliales issues de microvaisseaux, d'artères ou veines (Willam et al., 2000) .

II.5.3 Les Angiopoïétines : quelles implications dans les glioblastomes ?

Depuis les années 2000, la signalisation Ang/Tie-2 dans la gliomagenèse a été peu étudiée à l'échelle clinique. En revanche, un certain nombre d'études pré-cliniques cherche toujours à identifier les rôles respectifs de l'Ang-1 et l'Ang-2 dans la vascularisation tumorale.

Les connaissances actuelles de la biologie des Angiopoïétines dans l'angiogenèse pathologique ne sont pas toujours en accord avec les résultats expérimentaux qui décrivent

tant des effets pro- et anti-angiogéniques à la fois pour l'Ang-1 et l'Ang-2. Par exemple, la surexpression de l'Ang-1 dans différents modèles expérimentaux de tumeur du colon, du poumon, de carcinome mammaire conduit à une maturation des vaisseaux tumoraux néoformés par recrutement des péricytes ou des cellules musculaires lisses associée à une réduction ou à un blocage de la croissance tumorale. Cependant, un effet inverse, à savoir pro-angiogénique est observé pour d'autres modèles expérimentaux de tumeurs en particulier pour les tumeurs cérébrales conduisant à une augmentation du volume tumoral (Machein et al., 2004). Ces divergences de résultats pourraient s'expliquer par la nature des facteurs angiogéniques qui serait différente et spécifique de chaque type de tumeur. Toutefois, la littérature s'accorde à retenir que l'effet de l'Ang-1 conduira à améliorer l'architecture des vaisseaux caractérisée par une maturation liée à la présence de péricytes.

En revanche, la présence de l'Ang-2 est nécessaire pour initier l'angiogenèse et celle-ci est associée à un désengagement des péricytes au niveau des vaisseaux tumoraux ainsi qu'à une perturbation des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales pouvant conduire à une augmentation de la perméabilité vasculaire (Reiss et al., 2005).

Mais comme pour l'Ang-1, le mode d'action de l'Ang-2 dans la tumorigenèse est encore à l'heure actuelle mal connu et controversé. Il a été rapporté, sur un modèle de GB chez le rat, qu'une surexpression de l'Ang-2 conduisait à une réduction du volume tumoral (Machein et al., 2004). De même, sur un modèle de GB utilisant la lignée cellulaire humaine (U87), l'apport de l'Ang-2 au niveau cérébral *via* des adénovirus diminue le volume tumoral et augmente la survie des souris par rapport aux animaux contrôles. Selon ces auteurs, cette augmentation de la survie des animaux serait liée à la déstabilisation des vaisseaux associée à une nécrose des cellules tumorales (Lee et al., 2006b). L'équipe CERVOxy a également montré, sur un modèle de gliosarcome 9L, qu'un apport chronique d'Ang-2 au niveau cérébral était capable de réduire le volume de la tumeur et ceci suite à un remodelage vasculaire, conduisant à une pseudo-normalisation des vaisseaux présents au sein de la masse tumorale (Vable et al., 2009). Inversement, la neutralisation de l'effet biologique de l'Ang-2 par l'utilisation d'un peptide fusion neutralisant l'Ang-2 est à l'origine d'une réduction de la tumeur sur un modèle de GB (Klopper et al., 2016; Peterson et al., 2016; Villeneuve et al., 2008).

En résumé, l'effet de l'Ang-2 sur la croissance tumorale demeure donc encore en débat.

Des approches pharmacologiques pour inhiber les fonctions biologiques des Angiopoïétines ont été également développées afin de contribuer à évaluer l'incidence de ces facteurs angiogéniques dans la croissance tumorale. Ces approches ont utilisé soit une forme soluble du récepteur Tie-2, soit des mutants dominants négatifs Tie-2 et ce sur des modèles de carcinomes mammaires, de colon, de sarcome de Kaposi mais aussi de GB (Lin et al., 1998; Popkov et al., 2005; Reiss et al., 2005; Zadeh et al., 2004). Sur chacun de ces modèles, l'inhibition de la voie de signalisation des Angiopoïétines a un impact négatif sur la croissance tumorale et entraîne une augmentation de la survie des animaux. Cet effet bénéfique est associé à une diminution de la densité vasculaire et à une apoptose importante des cellules endothéliales ainsi qu'à une dilatation des vaisseaux tumoraux.

Collectivement, ces données de la littérature soulignent la discordance d'effets des Angiopoïétines selon les modèles de tumeur utilisés mais aussi les méthodologies utilisées. Ainsi, l'effet de l'Ang-2 dans les tumeurs cérébrales est encore débattu puisqu'un effet bénéfique mais aussi néfaste est attribué à cette cytokine.

L'angiogenèse étant dépendante d'un équilibre d'expression entre le VEGF, l'Ang-1 et l'Ang-2, l'évolution spatio-temporelle de chacune de ces trois protéines est déterminante dans la compréhension de la contribution fonctionnelle de ces cytokines à l'angiogenèse et la croissance de ces tumeurs cérébrales.

Les anomalies du réseau vasculaire des GB conduisent inévitablement à une perfusion tumorale hétérogène et à l'apparition de zones hypoxiques. Une des conséquences de cette hétérogénéité de la perfusion de la tumeur contribuera non seulement à maintenir l'angiogenèse tumorale mais aussi à limiter l'efficacité des traitements de RT et CT qui dépendent largement de la perfusion tumorale. En effet, au-delà de la contrainte de passage de la BHE, les effets de la CT sont directement proportionnels à la concentration de la drogue au sein de la tumeur. De plus, comme nous l'avons décrit précédemment, l'oxygène joue un rôle majeur dans l'effet cytotoxique de la RT.

De façon importante, en conditions cliniques, ce réseau vasculaire, de par sa localisation au sein de la masse tumorale, pourra de surcroît, être altéré par les traitements conventionnels.

III. Le compartiment vasculaire des glioblastomes : effet de la radiochimiothérapie

III.1 Effet de la radiothérapie sur le compartiment vasculaire

Bien que l'objectif de la RT soit de cibler les cellules tumorales, la vascularisation tumorale reçoit la même dose que la tumeur. Cette irradiation n'est pas sans conséquences pour ce compartiment vasculaire et l'atteinte de celui-ci sera dépendante de la modalité de la RT appliquée.

III.1.1 Réponse à l'irradiation, dose unique.

III.1.1.1 Réponses cellulaires

La RT délivrée en dose unique induit de façon précoce des dommages moléculaires qui se traduiront plus ou moins tardivement par des altérations des vaisseaux tumoraux. En effet, en réponse à la RT (**Figure 52-1**), on observe :

- Une mort précoce (entre 4 h et 12 h post-irradiation) des cellules endothéliales par apoptose dépendante de la voie de l'aSMase comme l'attestent les études réalisées sur les souris aSMase^{-/-} (Niaudet et al., 2017; Paris et al., 2001; Peña et al., 2000).
- Une mort post-mitotique, plus tardive (entre 24 h et 72 h post-irradiation), et ce lorsque les dommages à l'ADN ne peuvent être réparés (Bonnaud et al., 2007).
- Une sénescence cellulaire radio-induite qui apparaît quelques jours après la RT est associée au phénotype SASP (Lafargue et al., 2017; McRobb et al., 2017; Ungvari et al., 2013). En accord avec ces données *in vitro*, Borovski et al., ont mis en évidence la présence de cellules endothéliales en sénescence sur des biopsies de patients porteurs de GB et ayant suivi le protocole Stupp (Borovski et al., 2013).

Cette sénescence SASP s'accompagne également d'une diminution de VE-Cadhérine qui induit plus tardivement une augmentation de la perméabilité des vaisseaux (Paris et al., 2014).

- Une activation endothéliale. En effet, l'irradiation induit un changement de phénotype des cellules endothéliales. Ce phénomène d'activation se définit comme une augmentation d'expression des molécules d'adhésion telles que VCAM-1, ICAM-1 et E-Sélectine et dont la conséquence sera de favoriser l'adhésion et le recrutement des cellules inflammatoires (Gaugler et al., 2004; Heckmann et al., 1998; Nübel et al., 2004). A titre d'exemple, une étude *in vivo* a notamment montré que l'adhésion des leucocytes est fortement diminuée au niveau de l'endothélium de souris ICAM-1^{-/-} après une irradiation à 10 Gy (Mollà et al., 2003).

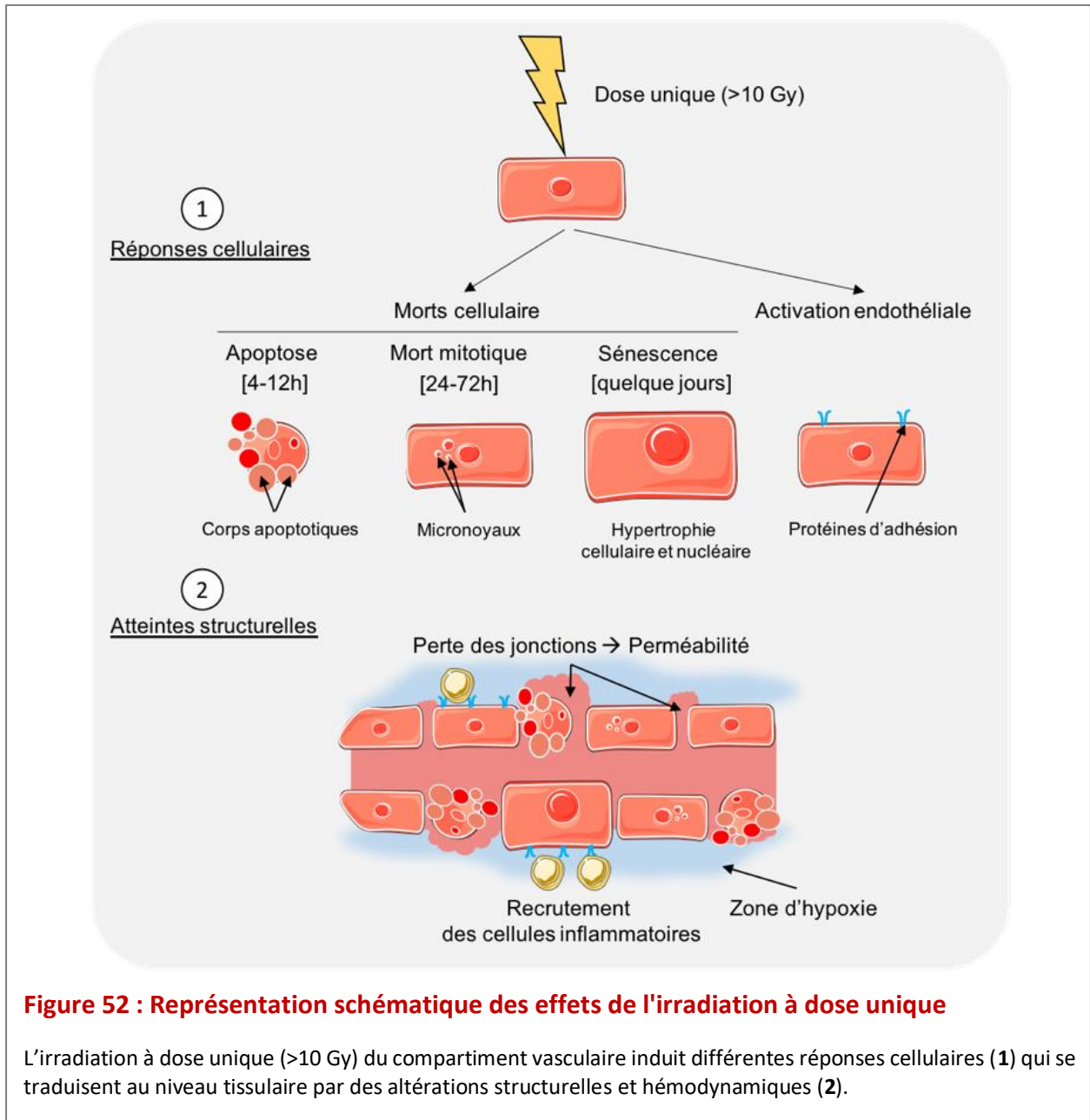
De plus, il a été mis en évidence une perte du collagène IV, constituant majeur de la lame basale des vaisseaux, accompagnée d'une augmentation d'activité des MMP-2 et MMP-9, facilitant ainsi le remodelage vasculaire (Lee et al., 2012). Ces résultats mettent en avant un phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales irradiées.

III.1.1.2 Altérations structurelles et hémodynamiques des vaisseaux

En réponse à l'irradiation à dose unique, les vaisseaux sanguins subissent des altérations structurelles et hémodynamiques (Figure 52-2). En effet, ces vaisseaux seront immatures, les jonctions inter-endothéliales plus lâches (suite à la diminution d'expression de la VE-Cadhérine), la membrane basale absente ou anormalement épaisse, la perméabilité vasculaire sera augmentée et la perfusion diminuée. Ces modifications hémodynamiques, ainsi que la raréfaction vasculaire induite par la RT, vont favoriser l'apparition de régions hypoxiques, avec une stabilisation de HIF-1, notamment dans les GB (Kioi et al., 2010). Cette hypoxie locale et aiguë est cependant incapable, à elle seule, de réinitialiser un processus angiogénique alors qu'une hypoxie chronique systémique permet de restaurer la vascularisation altérée par l'irradiation (Warrington et al., 2011). L'hypoxie induite par les dommages vasculaires s'accompagnera également du recrutement de cellules inflammatoires qui stimuleront l'activation endothéliale (Chen et al., 2009). En revanche, l'hypoxie ainsi générée, augmentera la résistance des cellules tumorales à la RT.

Bien que ces résultats ressortent dans un certain nombre d'études, il est toutefois difficile de proposer des conclusions consensuelles. En effet, les dommages de la RT sur la vascularisation dépendent fortement de la taille des vaisseaux, du stade de maturation des vaisseaux, de l'état de prolifération des cellules endothéliales, mais surtout de la dose délivrée. Les données présentées précédemment sont le reflet d'une irradiation à dose unique

et supérieure à 10 Gy. Les cellules endothéliales développeront des réponses différentes en réponse à une RT fractionnée et à plus faible dose.



III.1.2 Réponse à l'irradiation, dose fractionnée

III.1.2.1 Réponses cellulaires

L'irradiation fractionnée se rapproche du traitement appliqué en clinique, puisque chez les patients porteurs d'un GB, la RT est délivrée avec 30 fractions à la dose de 2 Gy/fraction, soit une dose totale de 60 Gy.

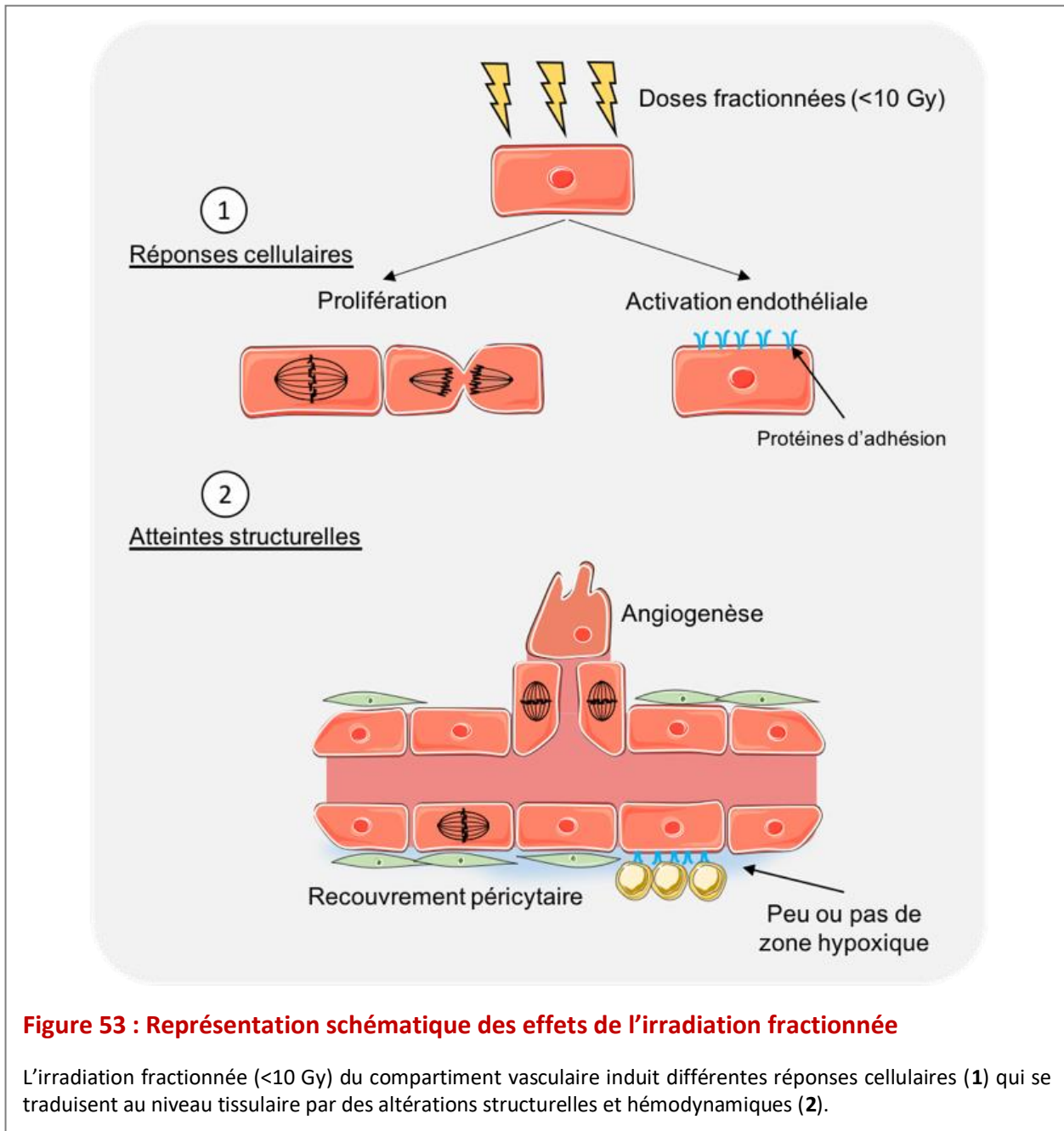
Une irradiation fractionnée avec de faibles doses semble affecter la vascularisation différemment qu'une irradiation à dose unique. Les études, *in vitro*, bien que peu nombreuses ont permis de montrer que, dans ces conditions, la viabilité des cellules endothéliales n'est pas altérée après une RT fractionnée à faible dose (Cervelli et al., 2014; Sofia Vala et al., 2010). En revanche, celle-ci favoriserait plutôt la prolifération des cellules endothéliales (Figure 53-1). Cet effet serait la conséquence d'une augmentation d'expression de la eNOS et du VEGF suite à l'activation de HIF (Kim et al., 2014).

Tout comme la RT à dose unique, la RT fractionnée conduit également à une activation endothéliale associée à un recrutement des cellules immunitaires, toutefois, l'intensité de cette activation est augmentée avec le fractionnement de la RT (Cervelli et al., 2014).

III.1.2.2 Atteintes structurelles et hémodynamiques des vaisseaux

Les études *in vivo* sont plus nombreuses et s'accordent avec les résultats des études *in vitro*. En effet, lorsque la RT est fractionnée, les atteintes vasculaires (Figure 53-2) sont moins intenses avec une diminution moindre de la densité vasculaire, voire dans certains modèles une augmentation du nombre de vaisseaux (Chen et al., 2009; Kleibeuker et al., 2016). Le fractionnement à faible dose semble augmenter la vascularisation et stimuler l'angiogenèse dans de nombreux modèles tumoraux (Janssen et al., 2010; Marques et al., 2020). Contrairement aux doses uniques, et selon le modèle tumoral, l'hypoxie tissulaire n'est pas systématiquement retrouvée après un fractionnement de la RT et ceci notamment parce que, dans ces conditions, l'irradiation améliore le recouvrement des vaisseaux néoformés par les péricytes (Potiron et al., 2013). La perfusion des vaisseaux s'en trouve améliorée et l'oxygénation est transitoirement restaurée (Clément-Colmou et al., 2020; Hu et al., 2016). Ces modifications structurelles et fonctionnelles s'apparentent à une normalisation vasculaire.

Ainsi, la RT selon la modalité utilisée, pourra modifier le compartiment vasculaire, et moduler l'efficacité de la RT (mais aussi la CT) sur les cellules tumorales. Toutefois, la radiosensibilité du compartiment vasculaire dépendra non seulement de la sensibilité intrinsèque des cellules endothéliales mais aussi de leur environnement.



III.2 Effet de la chimiothérapie (TMZ) sur le compartiment vasculaire

Le TMZ n'affecte en aucun cas la vascularisation (Hida et al., 2013; Park et al., 2016a; Son et al., 2006; Virrey et al., 2009). Les travaux de Virrey et al., montre *in vitro* une résistance des cellules endothéliales en réponse à 100 μ M de TMZ. Cette chimiorésistance est également retrouvée dans un modèle de GB humain (U87) après une administration fractionnée de TMZ à la dose 5 mg/kg, puisqu'aucune modification de la vascularisation n'est observée à 60 jours après un marquage CD31 (Virrey et al., 2009). Le mécanisme sous-jacent à cette résistance

implique un reflux rapide du TMZ par les cellules endothéliales qui expriment fortement les transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) (Wijaya et al., 2017).

Les données préalablement exposées témoignent de l'importance du compartiment vasculaire dans la croissance des tumeurs, y compris les GB. Le début des années 2000 a vu naître des traitements ciblant la vascularisation tumorale avec l'espoir de limiter, voire d'éradiquer le développement des cancers solides. Alors que les GB ont longtemps été exclus du champ d'application des thérapeutiques innovantes, au regard de leur riche vascularisation et de l'échec thérapeutique relatif des traitements conventionnels pour ces tumeurs, les traitements anti-angiogéniques ont été testés en association ou non à la CT et la RT.

IV. La vascularisation tumorale : une nouvelle cible de traitement

Dès les premières publications de ses travaux, en 1971 et 1972, J. Folkman voit le blocage de l'angiogenèse comme une nouvelle stratégie thérapeutique contre le cancer. Toutefois, la pertinence de cette stratégie ne sera reconnue que plus d'une vingtaine d'années après. En effet, la communauté scientifique privilégiait à l'époque l'étude de la cellule cancéreuse et ne s'intéressait que très peu aux relations entre la tumeur et son environnement. Au début des années 2000, les stratégies anti-angiogéniques se sont révélées être prometteuses avec la mise sur le marché des premières molécules indiquées pour le traitement de différents cancers métastatiques. Ce n'est que plus tardivement que certaines de ces molécules ont été proposées comme traitement adjuvant des GB.

IV.1 Les thérapies anti-angiogéniques

Le rôle fondamental exercé par le VEGF dans l'angiogenèse tumorale en a fait une cible de choix des stratégies anti-angiogéniques. Bien que les Angiopoïétines aient été également identifiées comme des médiateurs moléculaires de l'angiogenèse tumorale, celles-ci ont été considérées comme des cibles d'intérêt que plus récemment.

Nous nous attacherons dans cette partie du manuscrit à décrire les principales voies de ciblage du VEGF et des Angiopoïétines.

IV.1.1 Stratégies anti-angiogéniques ciblant la signalisation VEGF/VEGF-R

Deux grandes stratégies ont été proposées pour bloquer l'effet biologique du VEGF :

- Des stratégies ciblant le VEGF pour bloquer son expression en utilisant des ribozymes des nucléotides anti-sens, des récepteurs solubles ou des anticorps anti-VEGF (**Figure 54**).
- Des stratégies visant la signalisation du VEGF utilisant des anticorps anti-VEGF-R ou des inhibiteurs des tyrosines kinases (TKI) des récepteurs au VEGF (**Figure 54**) (**Ferrara and Adamis, 2016**).

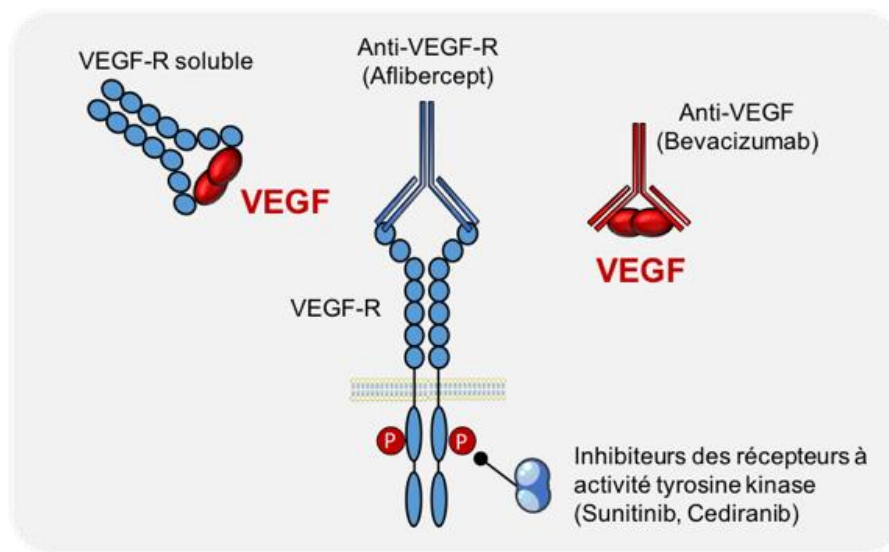


Figure 54 : Représentation des différents inhibiteurs du système VEGF/VEGF-R

Différentes stratégies sont employées pour inhiber la signalisation VEGF/VEGF-R. On retrouve des anticorps anti-VEGF ou anti-VEGF-R, des récepteurs solubles et des inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase.

IV.1.1.1 Les Anti-VEGF : Le bevacizumab

C'est en 2004, que le premier anti-VEGF a été mis sur le marché sous le nom de Bevacizumab (BVZ). Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF, empêchant ainsi sa liaison avec ses récepteurs VEGF-R1 et VEGF-R2. Le BVZ (ou avastin®, laboratoire Roche) a été la première molécule à avoir reçu, en 2004, l'agrément de la FDA (*food and drug administration*) pour le traitement des cancers du colon en association avec le traitement de référence par CT au 5-Fluoro-uracil (**Emmanouilides et al., 2007**). Ce n'est qu'en 2007 que le BVZ a fait l'objet d'études cliniques de phase II pour les GB, mais en association avec un traitement par CT (**Vredenburgh et al., 2007**). Si les résultats ont été prometteurs sur

les modèles pré-cliniques de GB avec une diminution de la densité vasculaire associée à un ralentissement de la croissance tumorale (Corroyer-Dulmont et al., 2013; Kloepper et al., 2016), les essais thérapeutiques ont été plus décevants. En effet, les études cliniques de phase III multicentriques (AVAGlio and RTOG 0825), réalisées aux Etats-Unis et en France, n'ont pas montré de bénéfice sur la survie des patients porteurs de GB lorsque le BVZ est apporté en 1^{ère} ligne combiné aux traitements conventionnels. En revanche, il a été observé une augmentation de la survie sans progression et une amélioration de la qualité de vie des patients (Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014). Toutefois, cette amélioration de la qualité de vie ne serait pas due à un effet angiostatique du VEGF mais serait attribuable à un effet anti-œdémateux du BVZ en diminuant la pression intracrânienne. Ces résultats mitigés ont donc tempéré les espoirs suscités par les premières études cliniques non contrôlées.

L'absence de réponse durable observée avec le BVZ en tant qu'agent unique a conduit à proposer que son association avec un agent cytotoxique pourrait apporter un bénéfice plus significatif car la combinaison permettrait de cibler à la fois les cellules endothéliales et les cellules cancéreuses. Le BVZ a été évalué en association avec la lomustine dans le cadre de l'essai BELOB, une étude multicentrique de phase II menée aux Pays-Bas. Les résultats ont été également décevants puisque malgré une survie sans progression quelque peu prolongée, le traitement lomustine/BVZ n'a pas conféré davantage de survie par rapport au traitement par lomustine seule chez les patients atteints de GB en progression (Wick et al., 2017).

IV.1.1.2 Les Anti-VEGF-R : L'aflibercept

L'aflibercept est une protéine fusion qui contient les domaines extracellulaires des récepteurs VEGF-R1 et VEGF-R2 lui permettant ainsi de lier et d'inhiber l'activité du VEGF et du PlGF (Holash et al., 2002). Tout comme le BVZ, il a été dans un premier temps testé en phase II et III sur des tumeurs colorectales, cependant que ce soit en monothérapie ou en association avec une CT, l'aflibercept n'améliore pas la survie des patients porteurs de GB. Une étude de phase II a également été réalisée aux Etats-Unis en traitement de seconde ligne sur des patients porteurs de GB en phase de récurrence sans toutefois améliorer leur survie (de Groot et al., 2011).

IV.1.1.3 Les inhibiteurs d'activité tyrosine kinase : Le sunitib et le cediranib

Les inhibiteurs des récepteurs aux activités tyrosines kinases ont été développés et déclinés par un grand nombre d'industries pharmaceutiques. Ces molécules ciblent le site de liaison de l'ATP du récepteur induisant ainsi un blocage de voie de signalisation intracellulaire. Il faut noter que la plupart des VEGF-R-TKI actuellement développés ne sont pas spécifiques au récepteur VEGF-R2 et sont capables de se fixer sur d'autres récepteurs à activité tyrosines kinases (tels Kit, PDGF-R, RET, RAF et EGF-R) ce qui à priori devrait renforcer les effets anti-angiogéniques recherchés.

Le sunitinib appartient à cette famille de molécule. Cette molécule multicible inhibe les récepteurs aux activités tyrosines kinases du VEGF-R1 et PDGF-R alors que le cediranib inhibe tous les VEGF-R. Bien que ces molécules aient montré un effet positif sur la survie des modèles pré-cliniques de GB (de Boüard et al., 2007; Peterson et al., 2016; Valable et al., 2011), les essais cliniques avec le sunitinib ou le cediranib en monothérapie n'ont apporté aucun bénéfice chez les patients porteurs de GB récurrents (Batchelor et al., 2013; Grisanti et al., 2019).

IV.1.2 Concept de normalisation vasculaire

Les résultats obtenus après ces thérapies anti-angiogéniques (TAA) sont quelque peu surprenants. En effet, par définition les TAA ont pour but de détruire et empêcher la formation de vaisseaux dans la tumeur, diminuant ainsi l'acheminement des molécules thérapeutiques comme la CT. Néanmoins, les résultats montrent, dans certaines situations, une meilleure efficacité des agents anti-angiogéniques en association avec la CT. Ces constats ont permis à Jain d'émettre l'hypothèse selon laquelle les vaisseaux des tumeurs traitées par TAA se normalisent, en réponse à un équilibre de biodisponibilité entre facteurs pro- et anti-angiogéniques (**Figure 55**). Les vaisseaux tumoraux « normalisés » retrouveraient des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles comparables à celles de vaisseaux d'un tissu sain (Jain, 2005). Cette phase de normalisation permettrait alors une meilleure oxygénation de la tumeur et un meilleur acheminement des molécules thérapeutiques au sein de cette tumeur. De plus, cette meilleure oxygénation de la tumeur favoriserait l'efficacité de la RT.

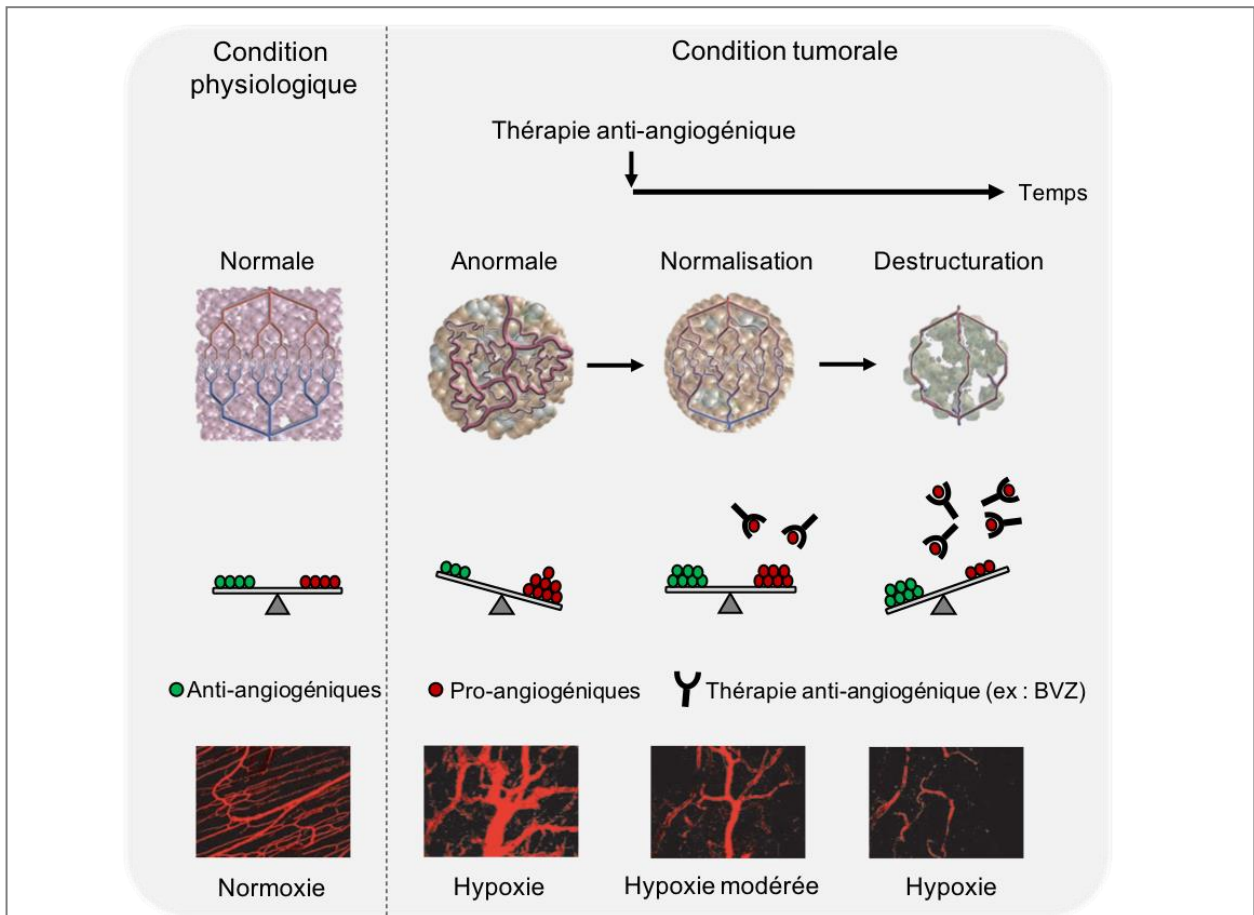
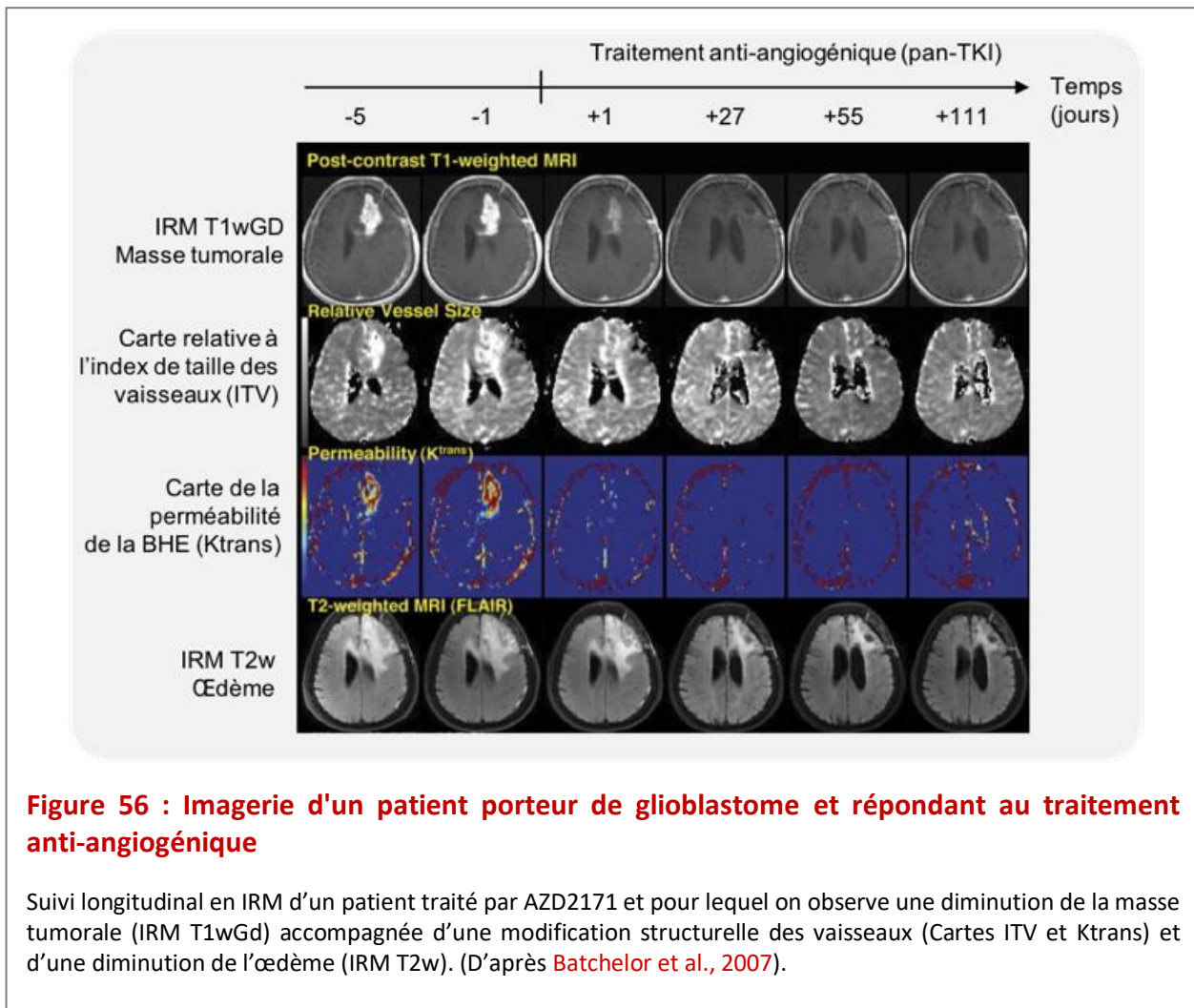


Figure 55 : Concept de normalisation vasculaire

En condition physiologique, il existe un état d'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques favorisant un réseau vasculaire organisé et fonctionnel. En condition tumorale, la production et la libération en excès de facteurs pro-angiogéniques induit un réseau vasculaire anormal et non fonctionnel qui génère des zones d'hypoxie. L'utilisation d'un traitement anti-angiogénique (ex : BVZ) permet de rétablir un état d'équilibre et d'induire une normalisation partielle du réseau vasculaire favorisant l'efficacité des traitements anti-cancéreux notamment par une amélioration de la perfusion sanguine et diminution de l'hypoxie. L'utilisation prolongée d'anti-angiogénique peut entraîner la destruction du réseau vasculaire et la ré-apparition d'une hypoxie tumorale. (D'après Jain, 2005).

Cette hypothèse de normalisation semble être confirmée par de nombreuses études pré-cliniques. Wachsberger et al., ont montré sur un modèle de GB, que la RT était plus efficace lorsqu'elle était associée à l'aflibercept (Wachsberger et al., 2007). Des essais cliniques sont actuellement en cours pour tester l'association des TAA avec les traitements conventionnels. Cependant, il est très difficile d'utiliser cette fenêtre thérapeutique de normalisation, car il est effectivement difficile de juger le moment opportun pour y associer des traitements combinés. En clinique, il serait notamment nécessaire que les patients puissent bénéficier d'un suivi par imagerie multimodale IRM comme le suggère l'étude de

Batchelor (**Figure 56**) qui permettrait d’appréhender, en temps réel, l’évolution de la vascularisation (taille des vaisseaux, perméabilité) (Batchelor et al., 2007).



Sur le plan moléculaire, les travaux de Winkler et al., ont permis de préciser sur un modèle pré-clinique de GB que, durant la phase de normalisation consécutive à l'utilisation d'un anti-VEGF-R2, les vaisseaux de la tumeur retrouvent une couverture péricytaire suite à une augmentation d'expression de l'Ang-1. De plus, la lame basale de ces vaisseaux s'amincit suite à une activation de la MMP-2 et MMP-9 (Winkler et al., 2004).

Cet état de normalisation n'est cependant que transitoire, puisque la poursuite prolongée du TAA déséquilibre la balance en faveur des facteurs anti-angiogéniques conduisant à une destruction des vaisseaux et une hypoxie massive (**Figure 55**) qui par la suite induit l'expression de facteurs pro-angiogéniques et participeront au phénomène d'échappement ou de résistance à ces TAA.

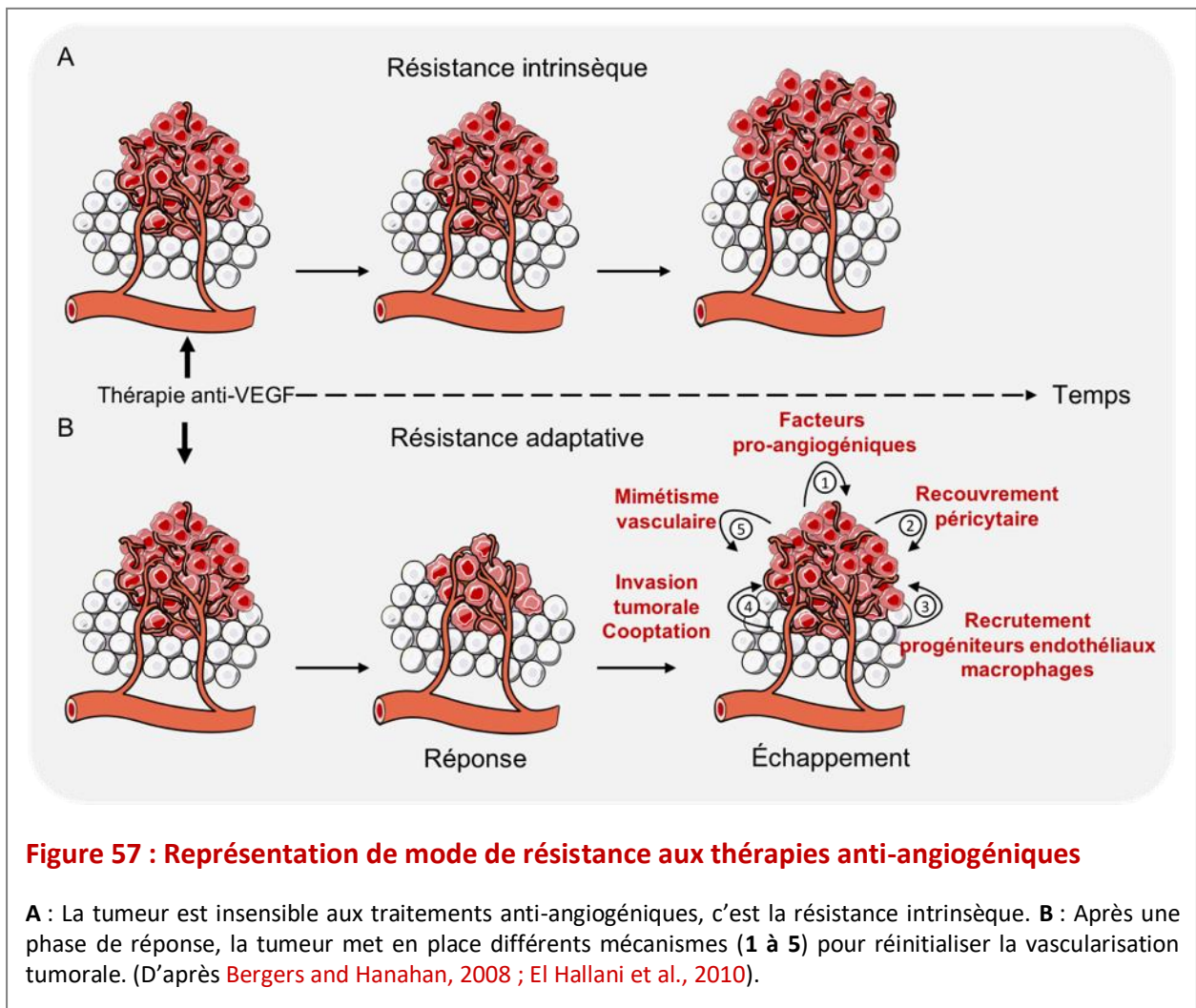
IV.1.3 La résistance aux TAA

Les TAA, lorsqu'ils sont efficaces ne le sont, le plus souvent, que transitoirement. Les études pré-cliniques et cliniques ont, en effet, mis en évidence un échappement face à ces TAA et ont cherché à comprendre les mécanismes sous-jacents à cette résistance. Bien que ces mécanismes d'échappement puissent être spécifiques à chaque traitement et à chaque contexte tumoral, selon Bergers et Hanahan, 2 modes principaux permettraient d'expliquer la résistance aux TAA (Bergers and Hanahan, 2008; Haibe et al., 2020) :

- Un mode de résistance intrinsèque : la tumeur ne répond pas aux TAA et continue sa croissance, malgré les traitements (Figure 57A).
- Un mode dit de résistance adaptative. Après une phase de réponse, la tumeur a la capacité de s'adapter et de mettre en place des mécanismes de compensation permettant une reprise de la croissance tumorale, notamment en stimulant de nouveau un processus angiogénique. Selon cette dernière hypothèse, 5 modes d'évasion ont été proposés (Figure 57B).
 - Un mécanisme de compensation des cellules endothéliales et tumorales par la synthèse d'autres facteurs pro-angiogéniques comme le FGF, les Ephrines ou encore les Angiopoïétines. Par exemple, pour des patients porteurs de GB traités au BVZ, il a été retrouvé lors de la phase de récurrence, une augmentation d'Ang-2 tant au niveau tumoral que plasmatique (Labussière et al., 2016; Scholz et al., 2016). Cette augmentation d'expression d'Ang-2 au niveau vasculaire a été également retrouvée sur un modèles pré-cliniques de GB (Cortes-Santiago et al., 2016).
 - Une amélioration du recouvrement par les péricytes. Comme nous l'avons décrit précédemment, c'est un des mécanismes qui témoigne d'une normalisation vasculaire. Les péricytes sont recrutés afin de s'opposer à la régression vasculaire et maintenir une vascularisation tumorale.
 - Un recrutement de cellules issues de la moelle osseuse comme les progéniteurs endothéliaux ou encore les cellules de la lignée myéloïde (les monocytes/macrophages pro-angiogéniques et cellules dendritiques) (Piao et al., 2012; Soubéran et al., 2019). L'hypoxie naissante, avec la diminution de la perfusion, permettra de stabiliser HIF-1 α qui par l'intermédiaire de l'expression de ses gènes cibles comme le *SDF-1*, le *VEGF* et l'*ANG-2*, sera

notamment responsable du recrutement de cellules inflammatoires (Aghi et al., 2006; Du et al., 2008).

- Une invasion tumorale et une cooptation. Ce mécanisme a lieu quand la tumeur ne peut réinitialiser l'angiogenèse. Les cellules tumorales migrent dans le tissu environnant et utilisent le système vasculaire de ce dernier pour relancer la croissance tumorale.
- Le mimétisme vasculaire. L'incorporation de cellules tumorales dans la vascularisation existante a été observé suite à un traitement au BVZ chez des patients porteurs de GB (El Hallani et al., 2010).



Au-delà de ces 5 modes de résistance et d'échappement, il a été également proposé, plus récemment, que le recrutement des cellules immunitaires innées prenne une part importante. Nous aborderons ce point dans la partie de ce manuscrit consacrée au « compartiment inflammatoire ».

IV.2 Stratégies anti-angiogéniques ciblant la signalisation Angiopoïétines/Tie

En raison du faible bénéfice thérapeutique des anti-angiogéniques ciblant l'axe VEGF/VEGF-R2, les recherches se sont orientées vers des stratégies alternatives de façon à contourner les écueils de ces thérapies (Rivera and Bergers, 2015). Au regard du rôle exercé par l'Ang-2 dans la progression d'un grand nombre de cancers, certains groupes ont développé différentes stratégies thérapeutiques ciblant ce ligand du récepteur Tie-2.

Plusieurs stratégies ont été testées pour bloquer l'effet biologique de l'Ang-2 dont la première a consisté à proposer un peptide fusion neutralisant l'Ang-2. Cette stratégie a montré son efficacité sur des modèles pré-cliniques de carcinome épidermoïde cutané et de carcinome colorectal puisque ce traitement conduisait à une régression vasculaire et un ralentissement de la croissance tumorale (Oliner et al., 2004). D'autres molécules, ciblant également la neutralisation de l'Ang-2 ont été commercialisées par différents laboratoires pharmaceutiques sous les noms de Trébanabib, MED13617, Rebastinib, après avoir montré des effets bénéfiques sur des modèles pré-cliniques de tumeurs, y compris de GB, tant sur la vascularisation tumorale que sur la croissance tumorale (Kloepper et al., 2016; Peterson et al., 2016). Toutefois, les résultats de ces essais cliniques sont plus mitigés dans les tumeurs solides dont les GB (Gillen et al., 2019; Hyman et al., 2018).

D'autres stratégies ciblent Tie-2, Tie-1 sans beaucoup plus de succès.

Au regard de la complémentarité d'action du VEGF et de l'Ang-2 dans l'angiogenèse, le choix s'est orienté vers une stratégie de double ciblage. En effet, Park et al., ont proposé que le seul blocage d'Ang-2 pouvait ne pas être suffisant pour conduire à la déstabilisation des vaisseaux tumoraux, suggérant qu'un double blocage d'Ang-2 et de VEGF pourrait être plus efficace (Park et al., 2016a) De fait, dans d'autres contextes tumoraux, l'efficacité du double blocage était supérieure à celle du blocage unique du VEGF ou de l'Ang-2 pour limiter la croissance tumorale, l'angiogenèse et les métastases (Brown et al., 2010; Coutelle et al., 2015; Kienast et al., 2013; Koh et al., 2010; Scholz et al., 2016). Toutefois que ce soit en monothérapie ou en association, un échappement au traitement est toujours observé, notamment car ces stratégies anti-vasculaires aboutissent systématiquement à une hypoxie tumorale.

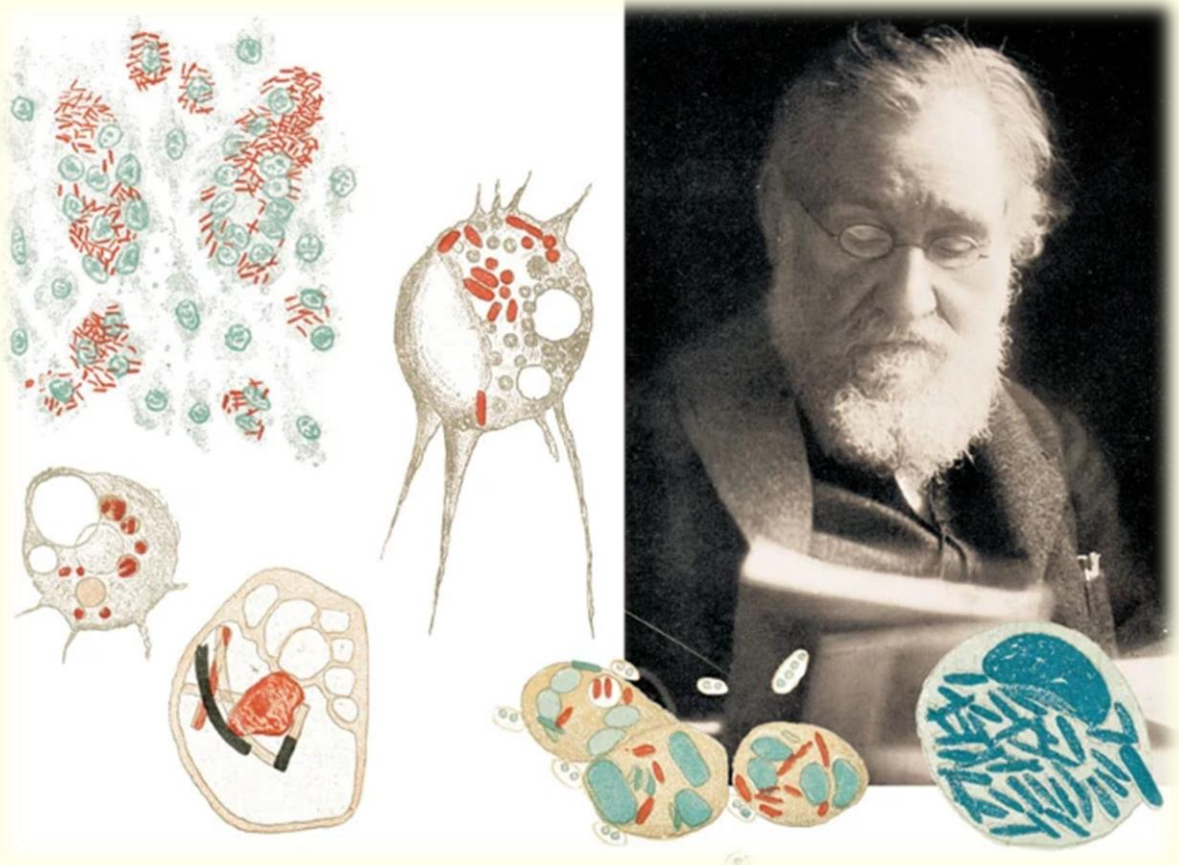
De façon inattendue, en cherchant à générer des anticorps bloquant l'Ang-2 en inhibant l'interaction Ang-2/Tie-2, l'équipe de Park a découvert de façon fortuite, un groupe d'anticorps capable de lier l'Ang-2 mais aussi d'activer le récepteur Tie-2. Parmi ceux-ci, l'anticorps dénommé ABTAA (pour *Ang2-Binding and Tie2-Activating Antibody*) s'est révélé être particulièrement efficace en association avec le TMZ (Park et al., 2016a). La co-administration d'ABTAA et de TMZ aboutit à une normalisation vasculaire et une meilleure distribution de la CT, une diminution de l'hypoxie tumorale, qui se traduit par un allongement de la survie des animaux. A l'heure actuelle, aucune étude clinique n'a été engagée pour les GB.

De façon intéressante, l'utilisation de ces stratégies anti-angiogéniques et l'identification de leurs effets sur les modèles pré-cliniques ont permis de montrer qu'au-delà du compartiment tumoral et vasculaire, ces molécules ciblant la voie du VEGF et des Angiopoïétines pouvaient également exercer une influence sur la réponse inflammatoire. C'est ainsi qu'en réponse au traitement à l'ABTAA, un effet positif sur la réponse inflammatoire anti-tumorale est observé. L'environnement de ces tumeurs cérébrales s'est enrichi en cellules de l'inflammation anti-tumorale (Park et al., 2016a). De même, la résistance au BVZ observée dans les modèles de GB s'accompagne d'une augmentation d'expression d'Ang-2 au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux et d'un enrichissement de l'environnement tumoral en cellules de l'inflammation pro-tumorale (Cortes-Santiago et al., 2016; Scholz et al., 2016).

Ainsi, ces données illustrent le lien étroit entre le compartiment vasculaire et le compartiment inflammatoire que nous allons aborder dans la 4^{ème} partie de cette introduction.

PARTIE 4

LE COMPARTIMENT INFLAMMATOIRE



Ilya I. Metchnikov

Partie 4 : Le compartiment inflammatoire

I. Inflammation et tumeur

I.1 Généralités sur l'inflammation

L'inflammation proprement dite correspond à l'activation du système immunitaire en réponse à un stress (pathogène ou non) habituellement absent en condition physiologique.

On distingue deux types d'inflammation : l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. L'inflammation aiguë est transitoire et initiée par une blessure et/ou une infection. Il en résulte une réponse bénéfique afin de lutter contre les pathogènes. Au contraire, l'inflammation chronique est une inflammation prolongée induite par des maladies auto-immunes mais aussi la présence d'une tumeur.

La réaction inflammatoire, induite par la présence de pathogène ou encore par la présence de molécules endogènes à motifs DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), est un mécanisme de défense qui repose sur deux types de réponses : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Chacune de ces réponses fait intervenir les leucocytes, cellules spécialisées issues de la lignée hématopoïétique et dites immunocompétentes. Ainsi, parmi les leucocytes, on retrouve, les cellules myéloïdes (polynucléaires, macrophages, cellules dendritiques) et les cellules lymphoïdes (lymphocytes, *natural killer*). Par cette mobilisation cellulaire parfaitement orchestrée, la réaction inflammatoire aura normalement un effet bénéfique en éradiquant l'élément étranger.

Cependant, dans un contexte tumoral, le système immunitaire est détourné au profit du développement tumoral. Il en résulte ainsi, un dysfonctionnement des cellules inflammatoires qui favorisent l'immunosuppression et le développement tumoral.

I.2 Inflammation et tumeur : l'échappement tumoral

Le premier lien entre cancer et inflammation date de 1863, lorsque Rudolf Virchow a décrit l'infiltration de leucocytes dans une tumeur. C'est seulement 100 ans plus tard que la théorie de l'immunosurveillance face aux cancers a été introduite par Burnet et Thomas (Burnet, 1971; Thomas, 1982). Cette hypothèse repose sur la reconnaissance des cellules tumorales et notamment des antigènes de tumeur par le système immunitaire de l'hôte, afin

d'éliminer ces cellules. Bien que ce concept fut grandement controversé, l'implication du système immunitaire a été finalement mis en évidence avec l'utilisation de souris transgéniques immunodéficientes : ces dernières développant plus facilement des tumeurs après injection de cellules cancéreuses que les souris immunocompétentes. Il semblerait toutefois, que cette défense immunitaire soit insuffisante pour éliminer la tumeur. En effet, cette immunosurveillance requiert la présence d'antigènes spécifiques de la tumeur afin de stimuler l'immunité de l'hôte. Or, bien que certains antigènes soient spécifiques de la tumeur, une grande partie de ceux-ci émanent de mutations génétiques. Ainsi, ces antigènes peuvent présenter des similitudes structurales avec les antigènes du soi, ce qui conduit alors au phénomène de tolérance immunitaire.

Par ailleurs, la tumeur met en place différentes stratégies pour échapper au système immunitaire, c'est le concept d'«*immunoediting*» (**Figure 58**). Ce concept repose sur le fondement des 3E : **Elimination, Equilibre et Echappement** (van der Burg et al., 2016).

- La première phase est **l'élimination** (**Figure 58-1**), les cellules tumorales sont éliminées grâce à l'immunosurveillance qui reste active. L'apparition d'antigènes tumoraux stimule la réponse immunitaire avec le recrutement de cellules inflammatoires comme les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes et les *natural killer*.
- Puis, la tumeur entre dans une phase **d'équilibre** (**Figure 58-2**), c'est une période durant laquelle la tumeur n'est pas visible en clinique et les cellules tumorales sont en dormance. Le système immunitaire de l'hôte contient les cellules tumorales sans toutefois éliminer la tumeur car d'autres cellules tumorales continuent de proliférer. C'est notamment pendant cette phase d'équilibre que les cellules tumorales mettent en place des mécanismes pour échapper au système immunitaire qui constitue la troisième et dernière étape de *l'immunoediting*.
- C'est au cours de cette phase que les cellules tumorales vont **échapper** (**Figure 58-3**) au système immunitaire après avoir sélectionné des clones non-immunogènes, suite par exemple à une perte d'expression d'antigènes tumoraux. Par ailleurs, les cellules tumorales développent des mécanismes d'immunosuppression en sécrétant des interleukines impliquées dans le recrutement de cellules immunosuppressives. La tumeur échappe ainsi à

l'immunosurveillance et réinitialise sa croissance. L'échappement à l'immunité fait partie intégrante des « *Hallmarks of cancer* » (Hanahan and Weinberg, 2000).

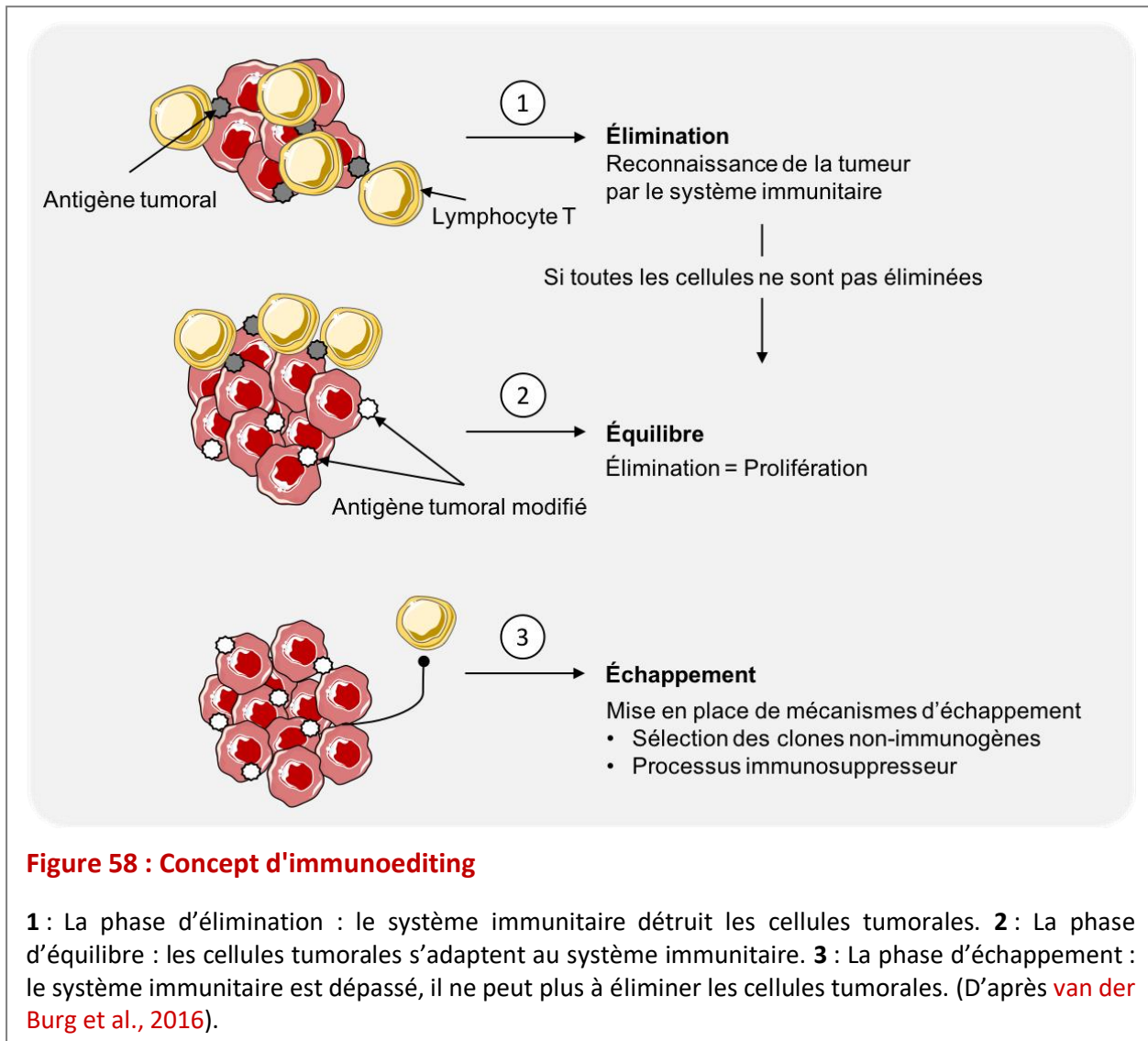


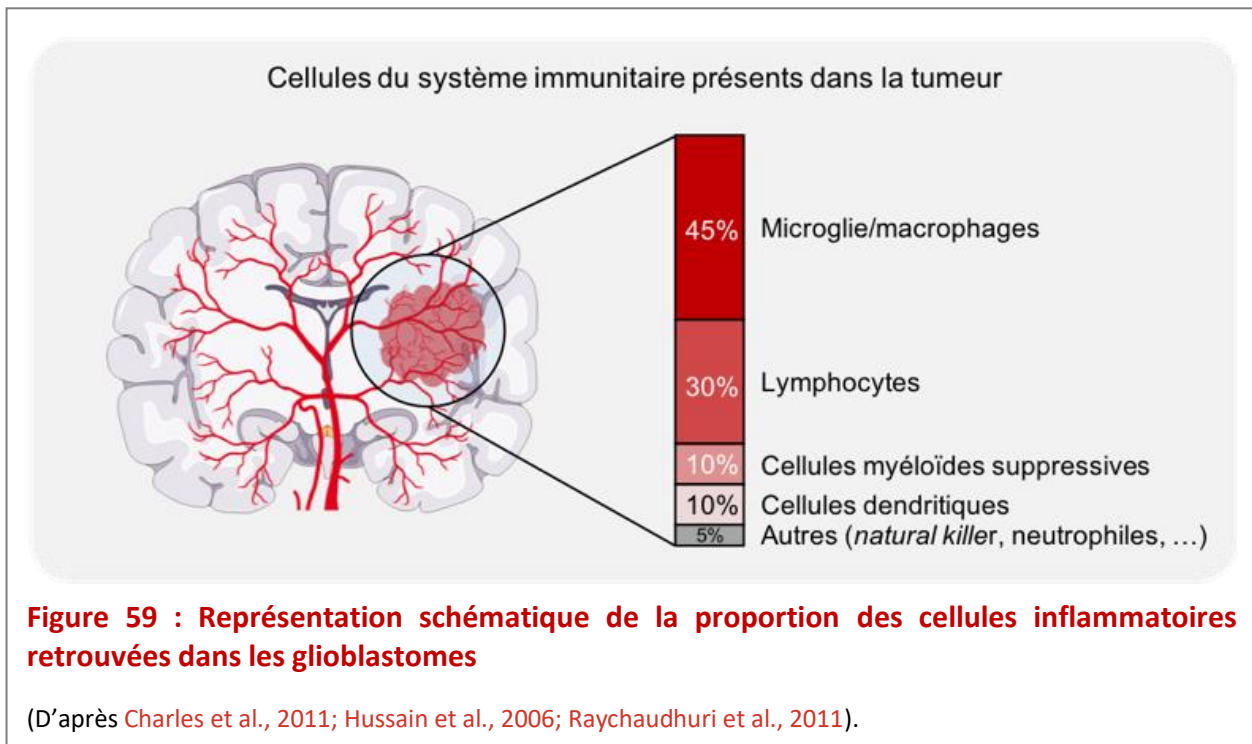
Figure 58 : Concept d'immunoediting

1 : La phase d'élimination : le système immunitaire détruit les cellules tumorales. **2 :** La phase d'équilibre : les cellules tumorales s'adaptent au système immunitaire. **3 :** La phase d'échappement : le système immunitaire est dépassé, il ne peut plus à éliminer les cellules tumorales. (D'après van der Burg et al., 2016).

II. Inflammation et glioblastome

Le cerveau et le SNC de façon générale, possèdent un statut inflammatoire dit « privilégié » grâce à la présence de la BHE. En effet, la BHE est considérée comme une barrière immunitaire en isolant et en limitant les échanges entre le SNC et le reste de l'organisme. Cependant, avec la découverte récente d'un système lymphatique cérébral ainsi que la mise en évidence d'une infiltration leucocytaire dans le cerveau, ce principe d'organe immunoprivilégié est remis en question (Engelhardt, 2006; Louveau et al., 2015).

Dans le contexte du GB, où la BHE est altérée et la vascularisation « réactivée », le statut inflammatoire est grandement modifié. En effet, les GB sont décrits comme des tumeurs très inflammatoires, avec un recrutement et une colonisation massive de cellules du système immunitaire (**Figure 59**). Parmi ces cellules inflammatoires, on retrouve environ 45 % de microglie/macrophages, 30 % de lymphocytes, 10 % de cellules myéloïdes suppressives et 10 % de cellules dendritiques (**Charles et al., 2011; Hussain et al., 2006; Raychaudhuri et al., 2011**).



II.1 Le recrutement des cellules inflammatoires.

II.1.1 Via les cellules tumorales

Le recrutement des cellules inflammatoires dans la tumeur est régulé par de nombreux facteurs comme les chimiokines et les cytokines (**Yeung et al., 2013**).

- Les cytokines sont généralement sécrétées par les cellules inflammatoires. Toutefois, ces cytokines sont également synthétisées et sécrétées par les cellules de GB. Les cellules de GB sécrètent tant des cytokines pro-inflammatoires comme les IL-1, IL-6 et IL-8 que de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 et le TGF- β (**Brat et al., 2005; Qiu et al., 2011; Yeung et al., 2013**).

- Les chimiokines, sont des cytokines qui exercent un effet chimiotactique et permettent par un gradient de concentration, le recrutement des cellules inflammatoires. Plusieurs chimiokines sont sécrétées par les cellules de GB afin de faciliter le recrutement des cellules inflammatoires. On retrouve parmi celles-ci : SDF-1, MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), MCP-3, (ou MIP pour *macrophage inflammatory protein*) et CSF-1 (*colony stimulating factor-1*) (Barbero et al., 2003; Curran et al., 2011; Hattermann et al., 2014; Ishii et al., 1998; Leung et al., 1997). Le VEGF ou encore l'Ang-2, sont également considérées, dans certaines circonstances, comme des chimiokines.

Il faut noter que certaines de ces cytokines et chimiokines, outre leurs actions sur le recrutement des cellules inflammatoires, influencent et activent les cellules endothéliales par l'intermédiaire des IL-1 et IL-6 notamment (Mantovani et al., 1992).

II.1.2 Via la vascularisation

En réponse aux stimuli pro-inflammatoires, les cellules endothéliales présenteront à leurs membranes les molécules d'adhésion indispensables au recrutement leucocytaire.

- Ce processus multi-étapes, nécessite dans un premier temps, **l'activation des cellules endothéliales** par les cytokines (**Figure 60-1**). Ces cellules surexpriment alors à leur surface, les molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1, P-Sélectine et E-Sélectine (Szmitko et al., 2003). De plus, l'activation des cellules endothéliales leur permet de sécréter à leur tour de l'IFN- γ (interféron γ), de l'IL-1 et du TNF α afin d'exercer un rétrocontrôle positif sur l'activation des cellules endothéliales (Huang et al., 2012).
- La seconde étape permet la reconnaissance des leucocytes par les cellules endothéliales (**Figure 60-2**). Durant cette étape, les cellules inflammatoires, se lient aux cellules endothéliales via l'interaction de la PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) située sur les leucocytes, avec les molécules E-Sélectine et P-Sélectine endothéliales (Weninger et al., 2014). Après cette phase de reconnaissance, les leucocytes initient une phase de *rolling* et d'adhésion à la paroi vasculaire via les molécules ICAM-1 et VCAM-1 (Ley et al., 2007).
- Enfin, l'étape d'extravasation ou diapédèse (**Figure 60-3**) est facilitée par une BHE altérée mais aussi par la libération des facteurs perméabilisants que sont le VEGF, l'Ang-2, le TNF- α ou l'IL-6. De plus, l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales modifie la

stabilité de l'endothélium rendant ce dernier plus perméable aux cellules inflammatoires (Goswami and Vestweber, 2016).

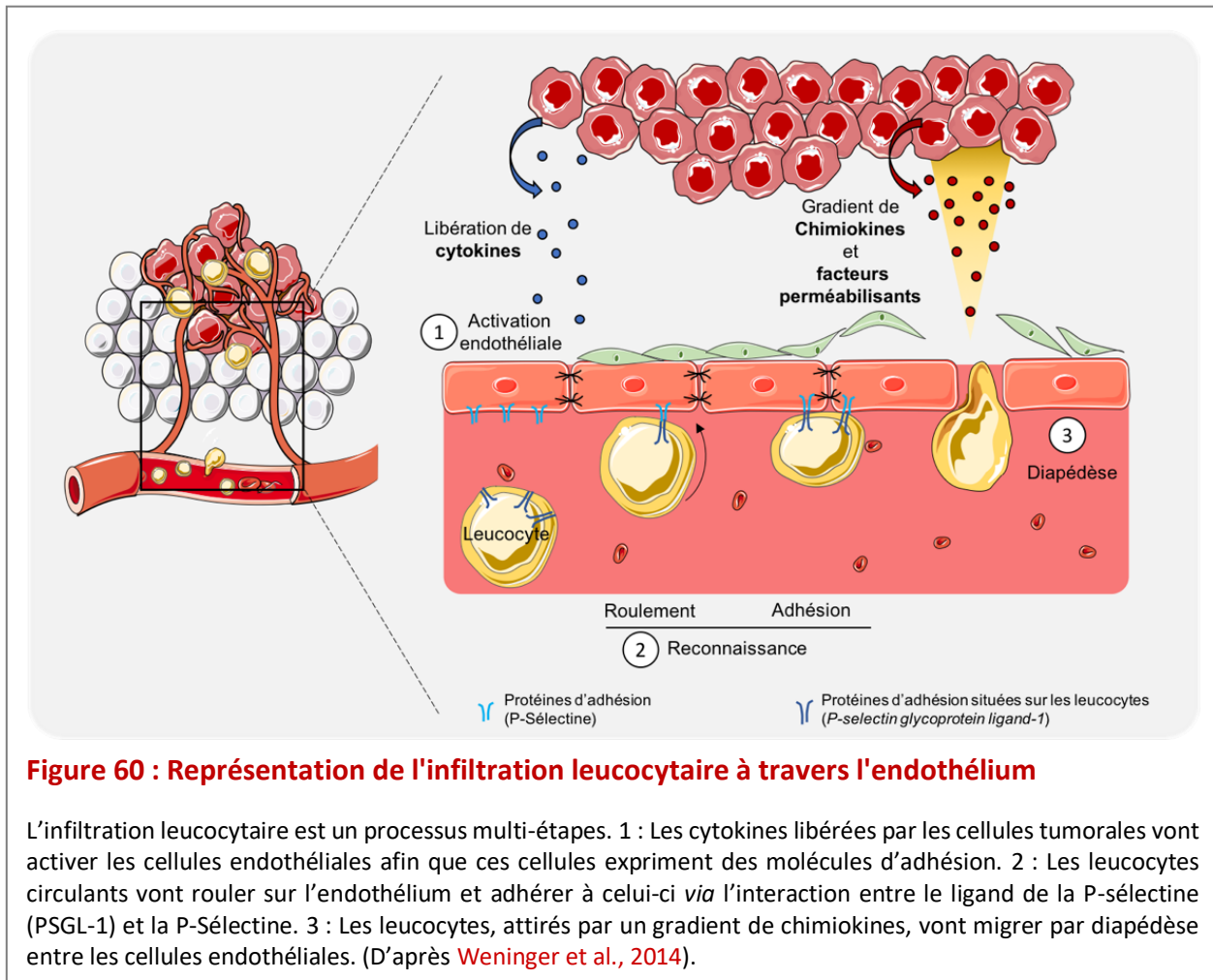


Figure 60 : Représentation de l'infiltration leucocytaire à travers l'endothélium

L'infiltration leucocytaire est un processus multi-étapes. 1 : Les cytokines libérées par les cellules tumorales vont activer les cellules endothéliales afin que ces cellules expriment des molécules d'adhésion. 2 : Les leucocytes circulants vont rouler sur l'endothélium et adhérer à celui-ci *via* l'interaction entre le ligand de la P-sélectine (PSGL-1) et la P-sélectine. 3 : Les leucocytes, attirés par un gradient de chimiokines, vont migrer par diapédèse entre les cellules endothéliales. (D'après Weninger et al., 2014).

II.1.3 *Via l'hypoxie*

Le mécanisme de recrutement des cellules inflammatoires sera potentialisé en réponse à l'hypoxie. D'un point de vue mécanistique, l'hypoxie augmente l'expression des molécules d'adhésion comme ICAM-1 par les cellules endothéliales (Winning et al., 2010). De plus, dans ces conditions, les cellules tumorales et endothéliales surexpriment de nombreuses chimiokines impliquées dans le recrutement des cellules inflammatoires telles que le SDF-1, l'endothéline-2, la sémaphorine-3A, la periostine ainsi que le VEGF et l'Ang-2 (Burger and Kipps, 2006; Chanmee et al., 2014; Murdoch et al., 2004; Zagzag et al., 2008).

Si l'hypoxie est un stimulus majeur du recrutement des macrophages, cette condition environnementale participe également à séquestrer ces cellules dans la tumeur en inhibant

leur motilité. En effet, l'hypoxie active la protéine MKP-1 (*Mitogen-activated protein kinase phosphatase*) qui a son tour inactive les voies de signalisation Erk1/2 et p38/MAPK impliquées dans la migration des macrophages (Chanmee et al., 2014).

Ainsi, la libération de chimiokines par les cellules tumorales et l'activation des cellules endothéliales sont des mécanismes indispensables au recrutement des leucocytes au niveau tumoral.

Différents leucocytes seront recrutés dans les GB, dont certains vont promouvoir la croissance tumorale. Ces leucocytes sont les médiateurs cellulaires de l'immunité innée et adaptative.

III. Les cellules immunitaires au sein des glioblastomes

Les cellules de l'immunité innée interviendront en amont des cellules de l'immunité adaptative. Les cellules dites phagocytaires appartiennent à cette première ligne de défense de l'organisme. Dans un contexte de tumeur ou d'inflammation dite stérile, les signaux de danger DAMPs sont reconnus par les récepteurs PRR (*pattern recognition receptors*) situés sur les cellules de l'immunité innée (Mogensen, 2009; Rubartelli et al., 2013). Ainsi, en réponse à cette reconnaissance, les cellules myéloïdes suppressives, les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages sont recrutés dans le but d'éliminer les corps étrangers par des phénomènes de phagocytose et de lyse cellulaire (Gasteiger et al., 2017). Dans un contexte cérébral, l'immunosurveillance du parenchyme cérébral est renforcée par les cellules microgliales.

III.1 La microglie/Les macrophages

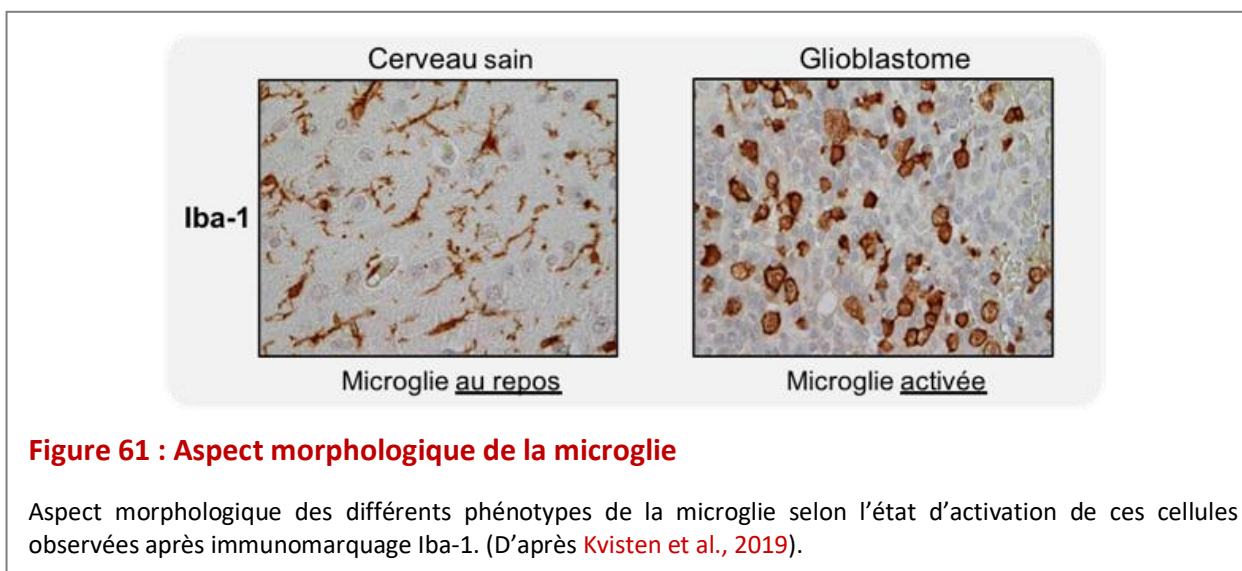
III.1.1 La microglie

La microglie, est considérée comme le macrophage résident du cerveau. Elle a été découverte en 1927 par Pio Del Rio Hortega. Ce chercheur espagnol a émis, quelques années plus tard, l'hypothèse d'une origine embryonnaire de cette microglie. Bien que discutée, cette hypothèse a été confirmée dans les années 2010 (Ginhoux and Merad, 2011). En effet, la microglie provient de l'hématopoïèse primitive, avec la colonisation dans le tube neural de précurseurs microgliaux issus du sac vitellin. Les précurseurs microgliaux se différencieront et

proliféreront pour former la microglie que l'on retrouve chez l'adulte (Ginhoux and Prinz, 2015).

En condition physiologique, la microglie est caractérisée par un petit soma et de nombreux et fins prolongements, permettant de « scanner » l'environnement cérébral (Figure 61). La microglie inactive se caractérise par les marqueurs CD45, Iba-1, CX3CR1 et CD14 (Roesch et al., 2018).

Lors de changements dans leur environnement (lésion, changement de concentration des composants du milieu extracellulaire, entrée de pathogènes...), les cellules microgliales s'activent. L'activation de ces cellules conduit à des modifications rapides de certaines de leurs propriétés. Cette réponse se caractérise généralement par un changement morphologique (Figure 61) (rétraction des prolongements, augmentation de la taille du soma) (Kvisten et al., 2019), l'expression de nouvelles protéines, la sécrétion de facteurs pro- et anti-inflammatoires, une prolifération, la migration de ces cellules vers les sites lésés et une activité de phagocytose pour éliminer des débris cellulaires. Une nomenclature des formes d'activation microgliale a été proposée en se basant sur celle existante pour les macrophages périphériques : à savoir une activation classique ou de type M1 et une activation alternative ou de type M2 (Mantovani et al., 2002).



Ces notions d'activation classique et alternative seront définies plus en détails dans la partie dédiée aux macrophages.

III.1.2 Les macrophages

Historiquement, les macrophages ont été identifiés par Ilya Metchnikoff à la fin du XIXe siècle (1882), qui les a caractérisés comme des cellules capables de phagocyter. Les macrophages sont des cellules du système immunitaire innée, issus de la lignée myéloïde et retrouvés dans tous les tissus de l'organisme avec une dénomination différente selon l'organe dans lequel ils se trouvent.

Ils participent grandement à l'immunité innée mais néanmoins, ils ont un rôle prépondérant dans l'activation de l'immunité adaptative ou acquise en jouant le rôle de cellule présentatrice d'antigène (CPA).

Les macrophages sont caractérisés par leur diversité et leur plasticité. En effet, les macrophages s'adaptent à l'environnement en acquérant un phénotype particulier. Comme pour la microglie, deux grands phénotypes sont décrits pour ces cellules : les macrophages M1 définis comme pro-inflammatoires et les macrophages M2 aux activités anti-inflammatoires. Ces phénotypes résultent de deux modes d'activation :

- L'activation dite classique conduit au phénotype M1 (**Figure 62A**)

Cette polarisation nécessite la présence de LPS (lipopolysaccharide), d'IFN- γ et de GM-CSF. Les macrophages M1 ainsi polarisés, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ le TNF- α ou encore l'IL-1 β . Grâce à la libération de ces facteurs, les macrophages M1 stimulent les *natural killer* et les lymphocytes. Ainsi, les macrophages M1 sont impliqués dans la défense de l'organisme et à ce titre ont un rôle bénéfique. Ils se caractérisent par une forte expression de protéines du CMH-II (complexe majeur d'histocompatibilité); impliqué dans la reconnaissance des lymphocytes CD4), de CD80/CD86 (molécules de co-stimulation qui interviennent lors de l'activation des lymphocytes T) et de iNOS (*inducible nitric oxide synthase*).

- L'activation alternative conduit au phénotype M2 (**Figure 62B**)

La polarisation des macrophages vers le phénotype M2 est obtenue, quant à elle, en réponse au CSF-1, à l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-13 ou encore au TGF- β . Les macrophages M2 se caractérisent par la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs comme l'IL-10, l'IL-1 α et le TGF- β . De plus, ce phénotype anti-inflammatoire, exprime fortement les protéines du CMH-II, le CD206 ou MRC1 (*mannose receptor c-type 1*) ou encore l'Arg-1 (arginase-1). Néanmoins,

d'autres protéines permettent de discriminer les macrophages M2 des macrophages M1. Parmi les rôles attribués aux macrophages M2, on retiendra, qu'ils participent au remodelage tissulaire, et qu'ils sont immunosuppresseurs.

Cette classification M1/M2 n'est toutefois pas figée. En réalité, cette notion de polarisation M1/M2 des macrophages recouvre un continuum d'états fonctionnels. Tout comme la microglie, les macrophages sont doués d'une plasticité importante, il a été montré qu'une repolarisation était possible aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Kalish et al., 2015; Leblond et al., 2015; Pelegrin and Surprenant, 2009). Cette repolarisation est aussi nommée « rééducation » des macrophages et pourrait résulter de modifications de leur microenvironnement.

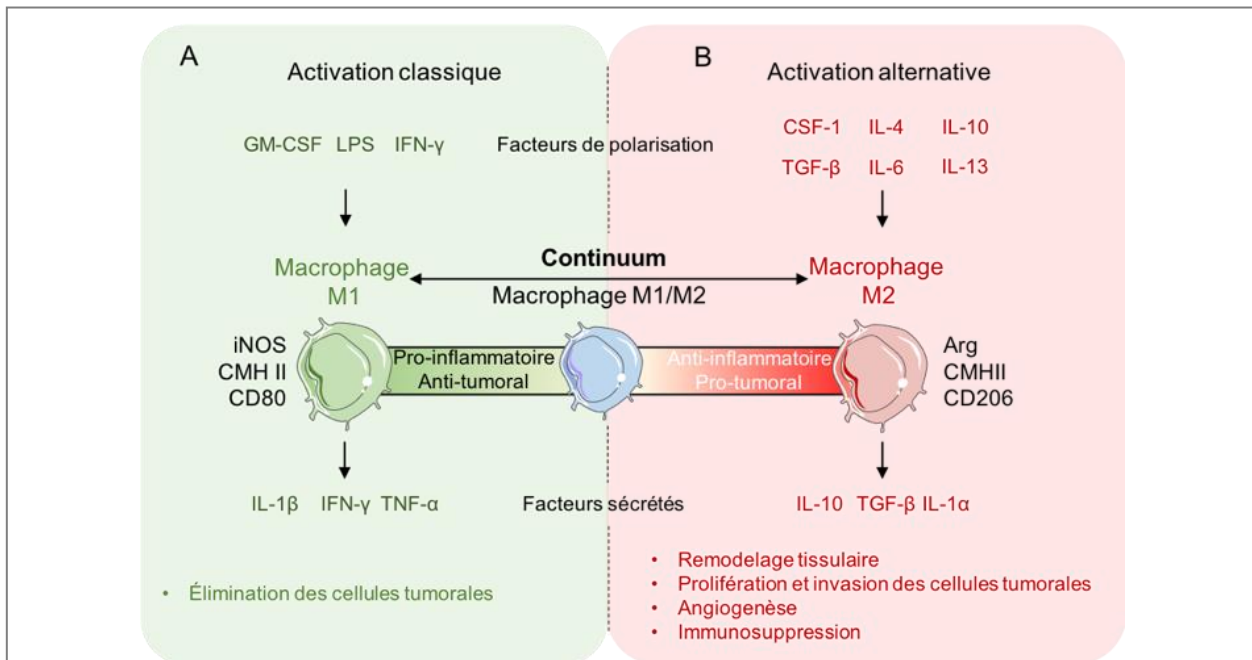


Figure 62 : Représentation du continuum de polarisation des macrophages

A : L'activation classique conduit aux macrophages pro-inflammatoires M1. **B** : L'activation alternative permet la polarisation vers un phénotype anti-inflammatoire dit M2.

Dans un contexte de tumeur cérébrale, la distinction entre les macrophages et la microglie activée reste difficile notamment car sous sa forme active, elle adopte une forme amiboïde similaire à celle des macrophages (**Figure 61**). Ainsi, dans un contexte de GB, le terme TAM (*tumor-associated microglia/macrophages*) permet d'inclure la microglie aux

macrophages. Dans ces tumeurs, les macrophages retrouvés à proximité des vaisseaux ont une origine myéloïde dérivée de la moelle osseuse et constituent 85% des TAMs (Chen et al., 2017; Mathivet et al., 2017). Les 15% restant d'origine microgliale sont, quant à eux, localisés dans la zone péri-tumorale (Chen et al., 2017).

Nous décrivons de façon plus détaillée l'implication des TAMs dans les GB dans le chapitre V.2. de cette partie 4.

La seconde population de cellules inflammatoires quantitativement très présente dans les GB est représentée par les lymphocytes.

III.2 Les lymphocytes

Les lymphocytes appartiennent aux cellules de l'immunité adaptative. Ces cellules retrouvés dans les GB ou *tumor-infiltrating lymphocytes* (TIL) représentent environ 30% des cellules immunitaires recrutées et sont principalement constitués de lymphocytes T. En effet, les lymphocyte B ne sont retrouvés que très rarement dans les GB (Martinez-Lage et al., 2019). Ces lymphocytes T renferment plusieurs sous-populations, toutefois, nous nous intéresserons aux populations les plus impliquées dans les GB, à savoir, les lymphocytes T auxiliaires (CD4) auxquels appartiennent les T régulateurs (Treg), les lymphocytes T cytotoxiques (CD8) et les *natural killer*.

III.2.1 Généralités sur les lymphocytes T

Lors d'une réaction inflammatoire, les lymphocytes T naïfs sont activés par les CPA tels les macrophages qui permettent de présenter les antigènes. Ces antigènes seront reconnus au niveau d'un récepteur membranaire caractéristique des lymphocytes T (dénommé TCR pour *T cell receptor*), toujours accompagné du *cluster* de différenciation CD3, ainsi que du CD4 ou du CD8 suivant le lymphocyte considéré. Le CD4 exprimé par les lymphocytes CD4⁺ leur permet de reconnaître les molécules du CMH-II présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigène. Le CD8 exprimé par les lymphocytes CD8⁺, leur permet de reconnaître les molécules du CMH-I présentes à la surface de cellules cibles. Ainsi, selon la protéine de CMH impliquée, les lymphocytes se différencient en lymphocytes CD4⁺ ou CD8⁺.

L'activation des lymphocytes T nécessite non seulement la reconnaissance par le récepteur T d'une protéine du CMH mais aussi un second signal délivré par différentes molécules de co-stimulation (CD28, OX40, ...) et enfin un signal cytokinique (**Figure 63A**). Afin de réguler cette activation, des molécules de co-stimulation inhibitrices, dont les principales sont le CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) et PD-1 (*programmed cell death protein 1*), sont secondairement induites sur les lymphocytes T. Ces deux protéines CTLA-4 (**Figure 63B**) et PD-1 (**Figure 63C**) vont, après interaction avec leurs ligands, inhiber différentes fonctions lymphocytaires T. A ce titre, elles constituent les points de contrôle ou *checkpoints* de la voie d'activation des lymphocytes T.

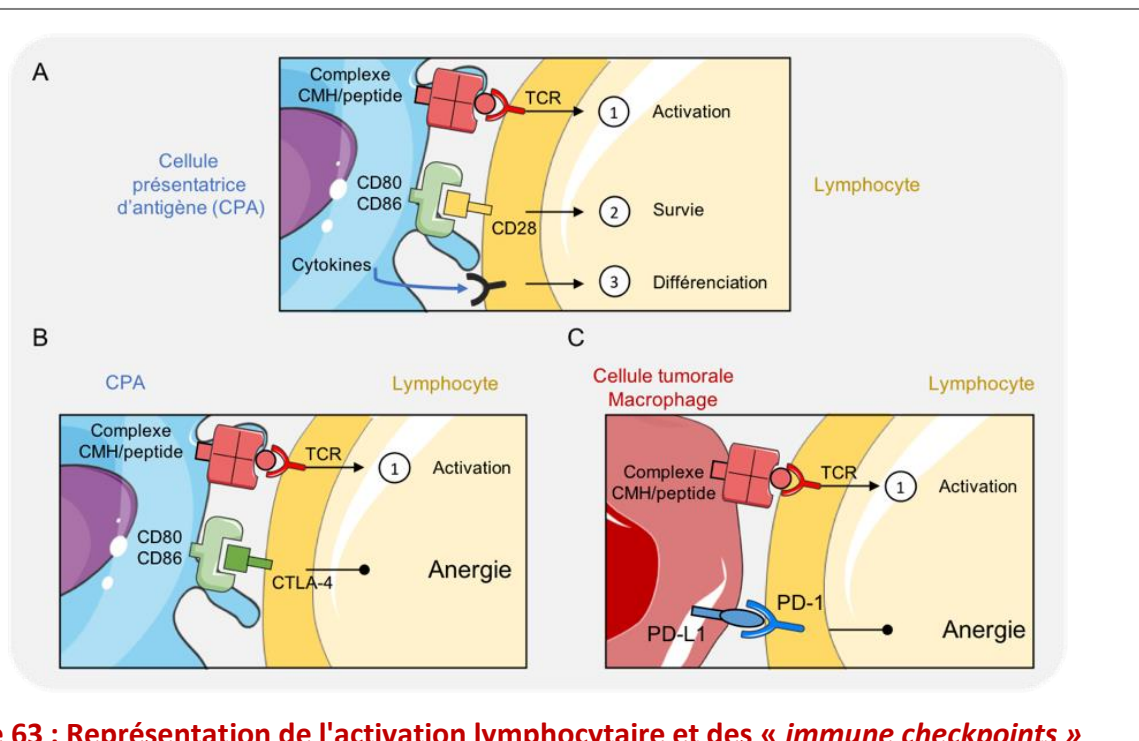


Figure 63 : Représentation de l'activation lymphocytaire et des « immune checkpoints »

A : L'activation d'un lymphocyte par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) nécessite 3 signaux stimulateurs.
B : Le premier *immune checkpoint* : la CPA peut induire l'anergie des lymphocytes via l'interaction du CD80/CD86 avec le CTLA-4 exprimé par le lymphocyte et qui présente une affinité supérieure au CD28 pour le CD80/CD86.
C : Le second *immune checkpoint* : dans la tumeur, le lymphocyte peut être inhibé par les cellules tumorales et/ou les macrophages via l'interaction du PD-L1/PD-1 qui constitue le second *immune checkpoint*.

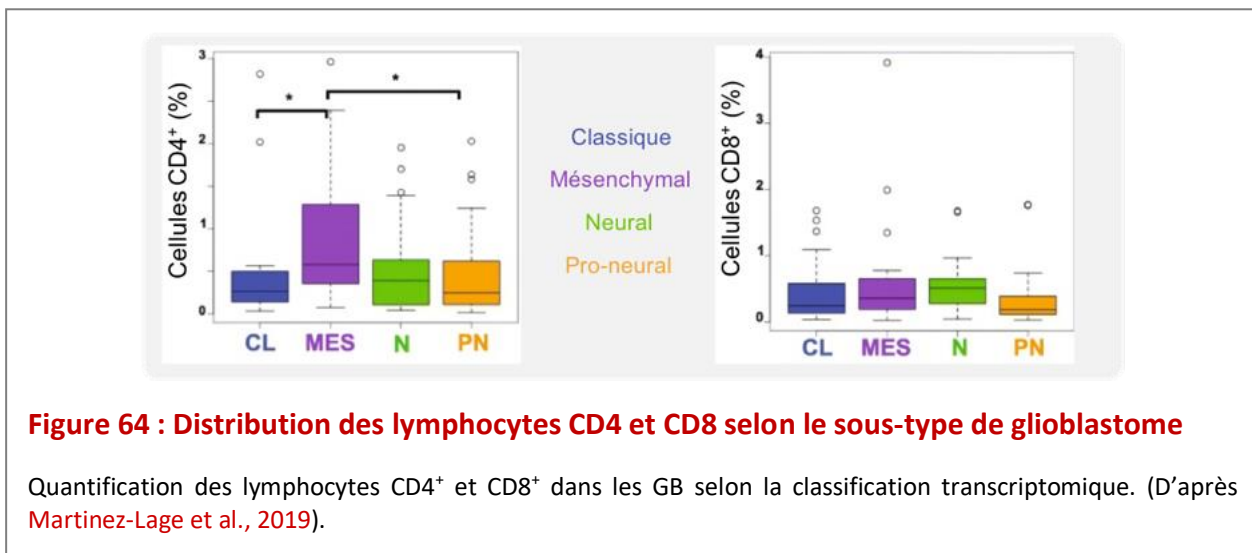
Au cours d'une stimulation antigénique chronique, comme dans le cas des cancers, les lymphocytes T expriment des niveaux élevés de ces molécules de co-stimulation inhibitrices. Il en résulte une perte de la fonctionnalité de ces cellules et un état d'anergie ou d'épuisement (*exhaustion*) (Grabowski et al., 2020).

Chacune des populations CD4⁺ et CD8⁺ exercera des fonctions spécifiques :

- Les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires ou T helper activés, régulent la réponse immunitaire en stimulant la réponse effectrice des lymphocytes CD8⁺ et la réponse humorale des lymphocytes B.
- Les lymphocytes CD8⁺ ou T cytotoxiques, activés par la reconnaissance TCR-Antigène-CMH-I, ont pour but principal l'élimination des cellules cibles par la voie des granzymes/perforines mais aussi par l'activation de l'apoptose dépendante du Fas/Fas ligand.

III.2.2 Lymphocytes T dans les glioblastomes

Le pourcentage de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ présents dans les GB est très variable selon les études. A titre d'exemple, selon Kim et al., la proportion de lymphocytes CD8⁺ est 4 fois supérieure à celle des CD4⁺ alors que d'autres auteurs, décrivent l'inverse (Kim et al., 2012; Martinez-Lage et al., 2019; Orrego et al., 2018). Cette divergence de résultats pourrait être le reflet de l'hétérogénéité des GB selon la classification transcriptomique. Il a été notamment rapporté que le sous-type mésenchymateux est le plus immunogène et le sous-type pro-neural le moins immunogène (Figure 64) (Martinez-Lage et al., 2019).



La présence des lymphocytes T CD8⁺ ou T cytotoxiques, semble associée à une meilleure survie des patients porteurs de GB alors qu'inversement, les lymphocytes T CD4⁺ favoriseraient la progression tumorale (Han et al., 2014). Cet effet négatif des lymphocytes T CD4⁺ pourrait être imputé aux lymphocytes T régulateurs.

III.2.2.1 Les lymphocytes T régulateurs

Dans les GB, la population de lymphocytes CD4⁺ est constituée pour moitié d'une sous-population de lymphocytes dénommés Treg (55 % de CD4⁺) (Andaloussi and Lesniak, 2006). Ces Treg sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription FoxP3⁺.

Au cours de la réponse immunitaire, les Treg ont un rôle majeur car ils assurent le maintien de l'homéostasie : le rôle principal étant de réprimer l'activité des cellules de l'immunité lors d'une réaction auto-immune, soit en fin de réaction immunitaire.

Dans le contexte du GB, ces Treg seront induits suite à la sécrétion d'IL-10 et/ou le TGF- β par les cellules tumorales. Ils auront alors la capacité d'élaborer différentes stratégies pour s'opposer aux effets des lymphocytes effecteurs CD4 et CD8. En effet, ces cellules, sont capables de sécréter des cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- β), de séquestrer l'IL-2 nécessaire à la prolifération des lymphocytes T ou encore d'induire leur cytolyse (Shevach, 2009). En d'autres termes, si l'infiltration des lymphocytes T au sein de la tumeur pourrait présager d'un bon pronostic, la présence non négligeable de lymphocytes immunosuppresseurs, Treg, fait que les lymphocytes CD4⁺ sont de fait associés à un mauvais pronostic (Han et al., 2014; Sayour et al., 2015).

IV. Le glioblastome, un environnement immunosuppresseur

L'environnement tumoral, en particulier les cellules tumorales ainsi que les autres cellules impliquées dans l'immunité innée ou adaptative renforceront ce statut immunosuppresseur du GB. Parmi ces cellules inflammatoires, on retrouvera les MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*), les cellules dendritiques et les *natural killers*. L'hypoxie optimisera également cet effet immunomodulateur négatif.

IV.1 Influence des cellules myéloïdes suppressives

Les cellules myéloïdes suppressives, comme leur nom l'indique sont d'origine myéloïde, comme les monocytes, les macrophages ou les cellules dendritiques mais elles possèdent des propriétés immunosuppressives.

Elles sont absentes en conditions physiologiques, mais sont retrouvées dans les tumeurs et notamment dans les GB (Raychaudhuri et al., 2011). Cette amplification est la conséquence d'une altération de l'hématopoïèse, c'est-à-dire de leur différenciation à partir de cellules précurseurs. En effet, la présence dans l'environnement tumoral des interleukines immunosuppressives, au-delà des effets décrits précédemment, inhibe également la maturation de la lignée myéloïde en favorisant ainsi la « différenciation » des précurseurs myéloïdes en MDSC et dont le recrutement au sein de la tumeur est facilité par le VEGF (Tripathi and Carson, 2014; Yang et al., 2018).

Les études cliniques menées sur les GB ont montré que les tumeurs infiltrées par un nombre élevé de MDSC étaient associées à un pronostic défavorable pour les patients (Alban et al., 2018). Dans ces tumeurs cérébrales, les MDSC exercent de puissants effets immunosuppresseurs en régulant l'activité des lymphocytes. En effet, les MDSC sont non seulement capables d'altérer la prolifération et la survie des lymphocytes T effecteurs mais aussi d'activer les cellules Treg par la sécrétion d'IL-10, de TGF- β , d'Arg-1 et de NO (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Tripathi and Carson, 2014).

IV.2 Influence des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques assurent la connexion entre l'immunité acquise et innée car elles appartiennent aux CPA.

Dans les GB, elles représentent une faible proportion de cellules immunitaires recrutées. Mais, lorsqu'elles sont recrutées, tout comme pour les MDSC, l'environnement tumoral inhibe leur maturation ou favorise leur rôle immunosuppresseur. En effet, la signalisation du VEGF inhibe l'activité de NF- κ B, essentiel à la maturation des cellules dendritiques et induit une surexpression de la protéine PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) sur ces cellules (Curiel et al., 2003; Oyama et al., 1998; Zong et al., 2016).

Ce rôle immunosuppresseur des cellules dendritiques sera, en outre, renforcé par les cellules de GB. En effet, la sécrétion de TGF- β par les cellules tumorales, permettra une libération secondaire d'IL-10 et de TGF- β par les cellules dendritiques dont l'action mitogène sur les Treg contribuera à amplifier cette population cellulaire (Ghiringhelli et al., 2005).

IV.3 Influence des *natural killer*

Les *natural killer*, au regard de leur développement à partir de progéniteurs lymphoïdes, appartiennent à la famille des lymphocytes. Toutefois, ces *natural killer* ne sont pas des lymphocytes car ces cellules n'expriment pas le marqueur de cellule T (CD3). L'objectif des *natural killer* est de lyser les cellules du « non soi » par la libération de granzyme/perforine ou par la présentation du Fas-ligand, impliqué dans la mise en place de l'apoptose des cellules cibles (Caligiuri, 2008). En condition physiologique, la présence des protéines du CMH-I sur les cellules saines « du soi », inhibe l'activité des *natural killer*. Ce mécanisme se nomme « *missing self* » (Kärre, 2008).

Dans un contexte de GB, les cellules *natural killer* seront également inhibées par les cellules tumorales. En effet, les GB ont la particularité, contrairement aux gliomes de grade inférieur, d'exprimer une protéine particulière du CMH-I, dénommée HLA-E (*human leukocyte antigen*), qui inhibe l'activité lytique des *natural killer* (Mittelbronn et al., 2007).

Cet effet d'inhibition des *natural killer* exercé par les cellules tumorales sera renforcé par les conditions environnementales en faveur d'un environnement immunosuppresseur avec la présence de TGF- β , de cyclooxygénase ou encore de prostaglandine E2 (Böttcher et al., 2018).

IV.4 Influence de l'hypoxie

Le statut hypoxique des GB exercera également une pression de sélection sur ces lymphocytes, en réduisant non seulement la prolifération des lymphocytes mais aussi en favorisant la différenciation des lymphocytes CD4⁺ en cellules Treg CD4⁺/FoxP3⁺ (Hasmim et al., 2014). De plus, l'hypoxie et la stabilisation de HIF-1 dans les MDSC entraîneraient la différenciation de ces cellules immatures en macrophages immunosuppresseurs (Corzo et al., 2010).

IV.5 Autres mécanismes immunotolérants

D'autres processus contribueront également à renforcer le dysfonctionnement de la réponse immunitaire adaptative au sein des GB. Notamment, car un statut d'immunotolérance des GB s'instaurera également lors de l'ontogénie des gliomes. En effet,

les macrophages recrutés mais aussi les cellules tumorales, elles-mêmes, surexprimeront les protéines PD-L1, qui en interagissant avec le récepteur PD-1 présent sur les lymphocytes, consolideront l'anergie des lymphocytes effecteurs CD4⁺ et CD8⁺ (Gabrusiewicz et al., 2018; Nduom et al., 2016).

De plus, une lymphopénie des cellules T est également rapportée chez des patients porteurs de GB. Cette lymphopénie, bien souvent attribuée aux effets des traitements, est aussi le fait des cellules tumorales. Les lymphocytes T seraient séquestrés dans la moelle osseuse suite à une perte d'expression de S1P1 (*sphingosine-1-receptor 1*) au niveau des lymphocytes. Cette séquestration des lymphocytes T dans la moelle osseuse serait imposée par la tumeur et contribuerait au dysfonctionnement de la réponse immunitaire dans ce contexte pathologique (Chongsathidkiet et al., 2018).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la croissance des GB s'accompagne d'un recrutement et une colonisation massive de lymphocytes et de macrophages. Ces macrophages, dénommés TAMs, prendront une part prépondérante à la croissance des GB (Hambardzumyan et al., 2016).

V. Les TAMs dans les glioblastomes

Les TAMs sont retrouvés en grande quantité dans les GB (Carvalho da Fonseca and Badie, 2013). En effet, il a été démontré que la proportion de TAMs augmente avec le grade des gliomes (Figure 65A) et que la présence de ces TAMs était associée à un mauvais pronostic et à une survie plus courte des patients porteurs de GB (Lu-Emerson et al., 2013; Prosnik et al., 2013; Vidyarthi et al., 2019). Cette observation clinique pourrait s'expliquer par une présence plus importante de macrophages de phénotype M2. En effet, ces macrophages immunosuppresseurs sont considérés comme pro-tumoraux et ont été associés à un mauvais pronostic (Figure 65B) (Prosnik et al., 2013; Vidyarthi et al., 2019). Au contraire, les macrophages M1 en tant qu'immunostimulateurs sont considérés, quant à eux, comme bénéfiques et anti-tumoraux et leur présence atteste d'un meilleur pronostic pour ces patients (Zeiner et al., 2015).

L'environnement des GB serait donc propice à une polarisation des macrophages en phénotype M2.

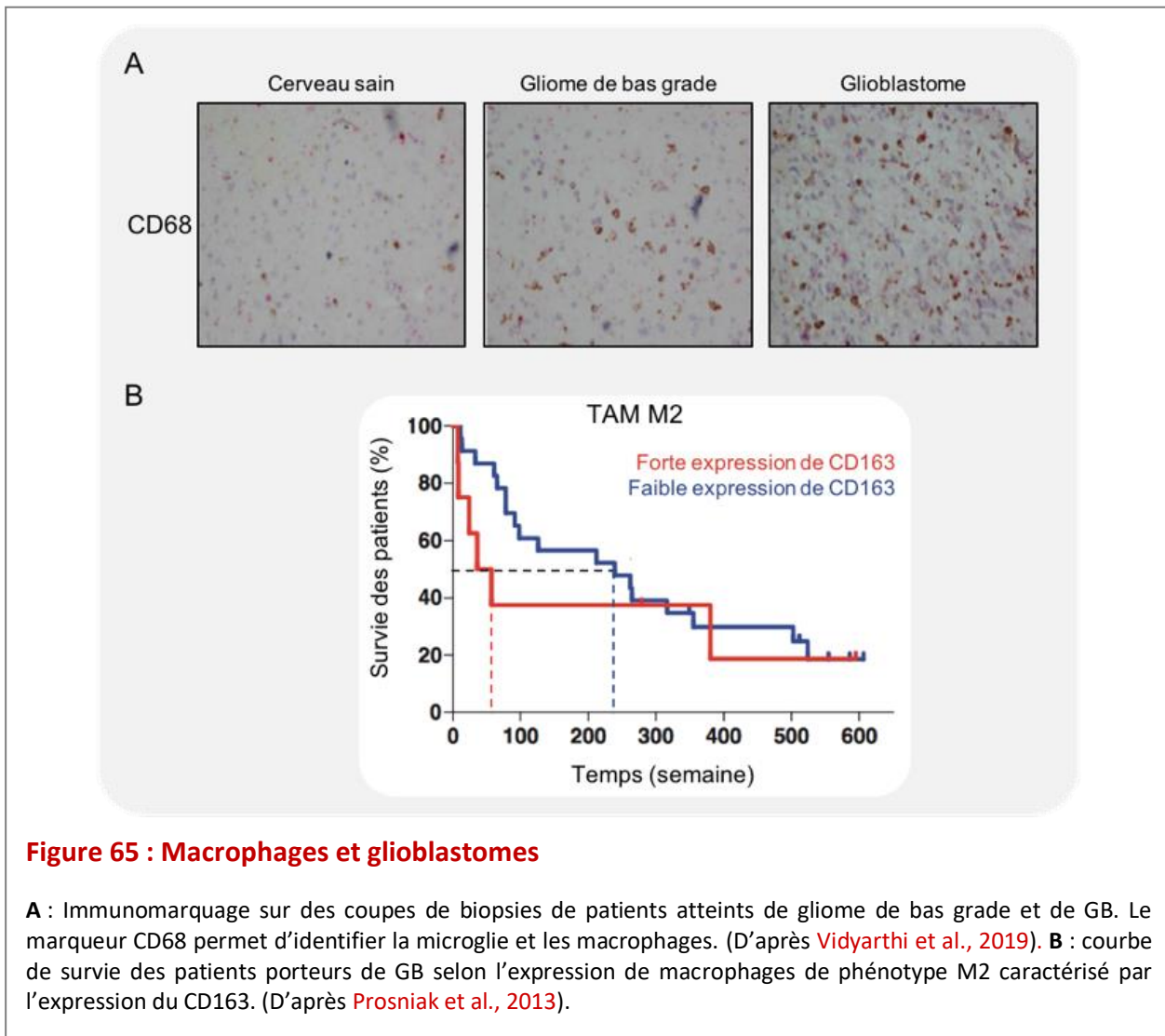


Figure 65 : Macrophages et glioblastomes

A : Immunomarquage sur des coupes de biopsies de patients atteints de gliome de bas grade et de GB. Le marqueur CD68 permet d'identifier la microglie et les macrophages. (D'après [Vidyarthi et al., 2019](#)). **B** : courbe de survie des patients porteurs de GB selon l'expression de macrophages de phénotype M2 caractérisé par l'expression du CD163. (D'après [Prosniak et al., 2013](#)).

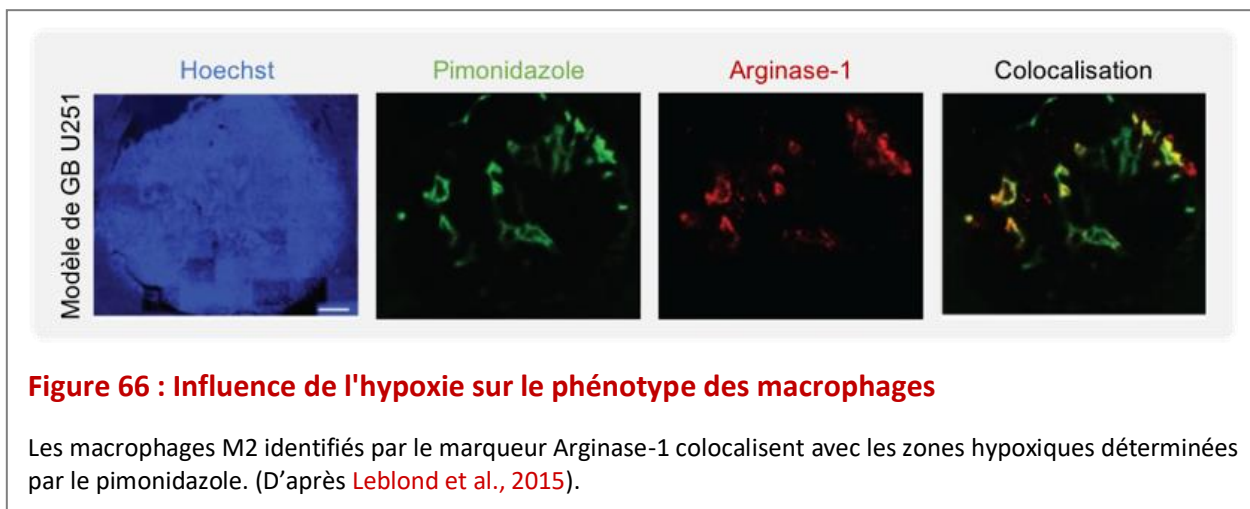
V.1 Polarisation des TAMs : les glioblastomes, un environnement favorable au phénotype M2

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la polarisation des macrophages peut résulter de modifications de leur microenvironnement.

Les cellules tumorales en sécrétant certains facteurs, sont les principaux acteurs de cette polarisation (**Figure 67-1**). Dans les GB, l'implication du CSF-1 et du TGF- β 1 dans ce processus de polarisation a été confirmée ([Cui et al., 2018](#); [Komohara et al., 2008](#)). D'autres facteurs solubles tels que le MCP-1, le SDF-1, l'EGF ou encore le VEGF, ont également montré

un rôle dans la polarisation des TAMs vers un phénotype M2 (Hambardzumyan et al., 2016; Roesch et al., 2018; Sielska et al., 2013; Wheeler et al., 2018). Récemment, il a été proposé que les cellules de GB mais aussi les CSG pouvaient utiliser la voie des exosomes afin de véhiculer ces différentes molécules à destination des TAMs (Gabusiewicz et al., 2018; Vrij et al., 2015).

L'hypoxie, indissociable du GB, contribuera non seulement au recrutement des cellules inflammatoires mais également à la rééducation des macrophages en phénotype M2 (Figure 67-2). En faveur de cette hypothèse, il a en effet été montré sur des modèles précliniques de GB, une co-localisation des TAMs M2 dans les régions hypoxiques de ces tumeurs, identifiées par des marqueurs de l'hypoxie comme le pimonidazole (Figure 66) (Chiang et al., 2012; Leblond et al., 2015). Par ailleurs, l'implication de l'hypoxie dans la rééducation des macrophages de phénotype M1 vers un phénotype M2 a été clairement démontré *in vitro* ; celle-ci ferait intervenir le facteur de transcription HIF-2 α (Leblond et al., 2015; Wang et al., 2018).



V.2 Contribution des TAMs dans la croissance des glioblastomes

Les TAMs, suivant le phénotype acquis, exercent des effets divergents sur le développement tumoral. Les macrophages M1, anti-tumoraux, inhibent la croissance tumorale. À l'inverse, les macrophages M2, qualifiés de pro-tumoraux et retrouvés en grande quantité dans les GB, favorisent la croissance de ces tumeurs. Outre les effets d'immunosuppresseurs, décrits précédemment, les macrophages M2 pourront agir sur la prolifération et la migration des cellules tumorales mais aussi l'angiogénèse.

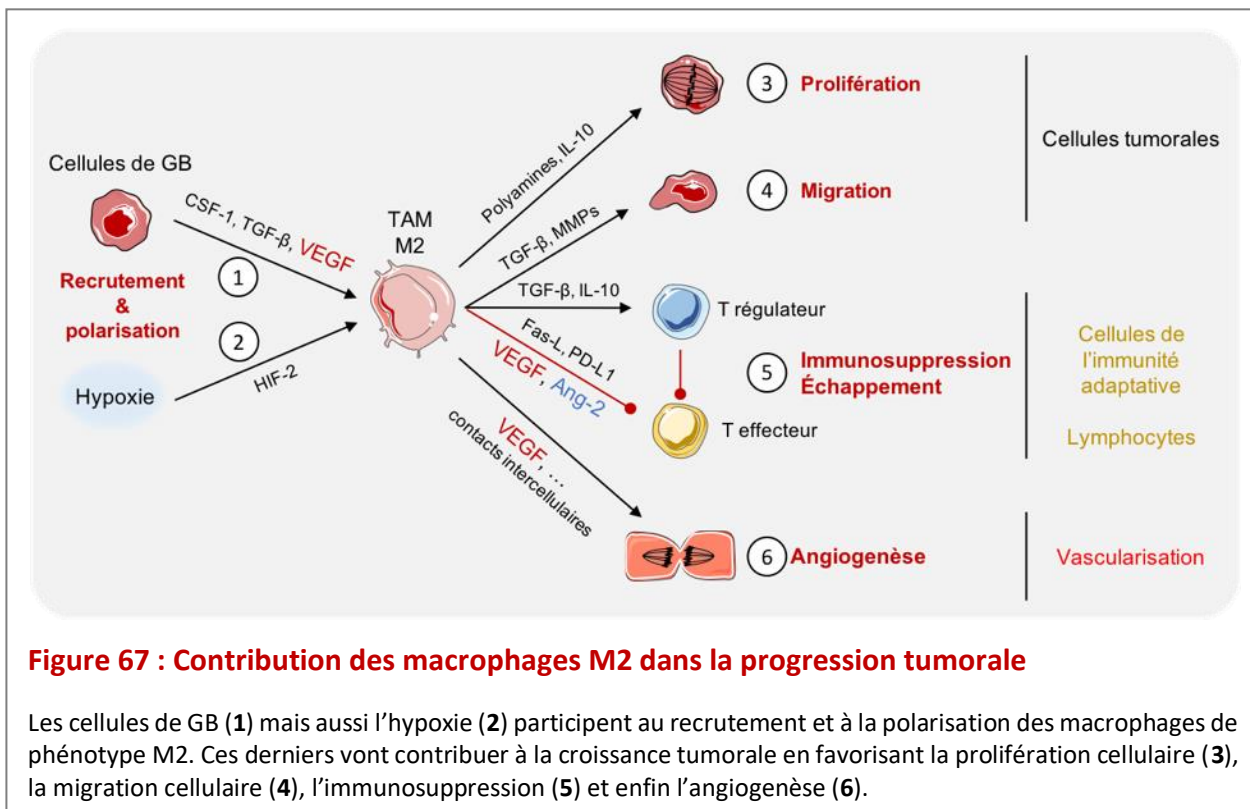
- Les macrophages M2 contribuent à la croissance tumorale :
 - Le phénotype M2 soutient la **prolifération (Figure 67-3)** des cellules de GB par la sécrétion d'IL-10 et *via* la voie JAK2/STAT3 (Qi et al., 2016). De plus, ces macrophages ont également la capacité d'induire une forte production de polyamines impliqués dans la prolifération des cellules tumorales (Wang et al., 2018).
 - Les macrophages M2 facilitent aussi la **migration (Figure 67-4)** des cellules tumorales par la sécrétion de TGF- β , MMP-2 et MMP-9 (Gjorgjevski et al., 2019; Liu et al., 2018b).
 - Enfin, les TAMs M2 renforcent l'**échappement (Figure 67-5)** de la tumeur au système immunitaire, par la sécrétion de TGF- β et d'IL-10, impliqués dans le recrutement et l'activation des Treg et dans l'anergie des lymphocytes T effecteurs (Komohara et al., 2008; Wu et al., 2010). De plus, les macrophages M2 surexpriment à leur surface la protéine Fas-Ligand et provoquent ainsi la mort des lymphocytes CD8⁺ suite à l'interaction Fas/Fas-L respectivement sur le lymphocyte et le macrophage M2 (Badie et al., 2001).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, tout comme les cellules tumorales, les macrophages et en particulier les macrophages M2 présentent à leur surface la protéine PD-L1 contribuant ainsi à maintenir un environnement immunosuppresseur. De façon intéressante, il est à noter que l'expression de PD-L1 sur les macrophages est régulée positivement par une boucle de régulation autocrine du VEGF (Lai et al., 2019). L'Ang-2 présent dans l'environnement augmente également l'expression de PD-L1 sur les macrophages M2 et facilite ainsi un échappement de la surveillance immunitaire (Wu et al., 2017).

- Les macrophages M2 contribuent à la vascularisation :
 - Les **TAMs** retrouvés dans les zones périvasculaires assurent un dialogue avec les cellules endothéliales afin de **stimuler la formation de nouveaux vaisseaux (Figure 67-6)**. Les TAMs M2 sécrètent de nombreux facteurs pro-angiogéniques dont l'IL-6, l'IL-1 β , le TGF- β , le FGF, le PlGF, mais aussi le VEGF (Cui et al., 2018; Jetten et al., 2014; Zhu et al., 2017). Ce VEGF dérivé des macrophages prend une part importante dans l'angiogenèse tumorale. En effet, plusieurs études ont montré que l'inhibition du VEGF dans la lignée myéloïde se traduit par une diminution de la densité vasculaire au sein de la tumeur (Mathivet et al., 2017; Osterberg et al., 2016).

Par ailleurs, les macrophages participent indirectement à l'angiogenèse en favorisant la vasculogenèse, le mimétisme vasculaire ou encore la transdifférenciation des macrophages en cellules endothéliales, dépendante du VEGF (Fan et al., 2008; Hong et al., 2009; Scavelli et al., 2008; Yan et al., 2011).

Renforçant ces données et illustrant le lien étroit entre cellules inflammatoires et cellules vasculaires, d'autres études ont mis en évidence des mécanismes pro-angiogéniques nécessitant des contacts intercellulaires entre macrophages M2 et cellules endothéliales par l'intermédiaire des voies Jagged-1/Notch-1, VEGF-R2/NRP-1 ou encore par l'activation des intégrines $\alpha 5\beta 3$ (Cui et al., 2018; Fantin et al., 2010, 2013; Jetten et al., 2014).



Au regard de toutes ces propriétés, les macrophages M2 sont considérés comme des macrophages immunosuppresseurs, pro-angiogéniques et pro-tumoraux.

Ainsi, dans un contexte tumoral, un certain nombre d'études illustre l'existence d'un lien étroit entre l'inflammation et le compartiment vasculaire et leur régulation réciproque. Dans les GB, ce lien a été établi non seulement par la mise en évidence d'une régulation autocrine VEGF/VEGF-R2 sur les TAMs mais aussi par l'identification d'une sous-population de monocytes/macrophages caractérisée par la présence du récepteur aux Angiopoïétines, Tie-2.

○ Les **TEMs** (*Tie-2 expressing monocyte/macrophage*), identifiés dans les années 2000 comme sous population de TAM surexprimant le récepteur Tie-2, ont été mis en évidence dans les GB, à proximité des vaisseaux tumoraux (De Palma et al., 2005; Murdoch et al., 2007; Venneri et al., 2007). Il a été notamment montré que ces TEMs étaient activés par l'Ang-2 présente dans l'environnement tumoral et que cette stimulation s'accompagnait d'une augmentation de l'expression du marqueur CD206, un des marqueurs caractéristiques des macrophages M2 (Coffelt et al., 2010). Au vu de leurs caractéristiques moléculaires et cellulaires, les macrophages TEMs sont considérés comme de phénotype « M2 like ». A ce titre, tout comme les TAMs, les TEMs contrôlent l'environnement tumoral pour favoriser la croissance tumorale, notamment en agissant sur la vascularisation tumorale.

Les TEMs participent grandement à l'**angiogenèse** tumorale. De fait, une étude de Venneri et al., a montré sur un modèle préclinique de GB humain, que la co-implantation de cellules de GB et de monocytes Tie-2⁺ induit une vascularisation tumorale plus riche que celle observée chez les animaux implantés avec un mélange de cellules tumorales/monocytes Tie-2⁻ (Venneri et al., 2007).

L'implication des TEMs dans l'angiogenèse a également été démontrée *in vitro*. A titre d'exemple, Coffelt et al, ont montré que le milieu conditionné issu de cultures de TEMs déposé sur des cellules HUVEC, favorise à la fois la prolifération et la migration des cellules endothéliales, par comparaison au milieu conditionné issu de macrophages Tie-2⁻. La caractérisation du sécrétome de ces TEMs montrent que ces macrophages sont non seulement source de facteurs pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, and IL-10) mais également de facteurs angiogéniques (MMP-9, VEGF, FGF2, COX-2, Wnt5a) par comparaison aux macrophages Tie-2⁻ (Coffelt et al., 2010).

Par ailleurs, en accord avec l'effet d'Ang-2 sur la polarisation des TEMs vers un phénotype M2 pro-angiogénique, la pré-incubation des TEMs en présence d'Ang-2, renforce la capacité du milieu conditionné issu de ces cultures à stimuler la prolifération et la migration des cellules HUVEC. Ces effets seraient dus à une surexpression préférentielle de deux facteurs angiogéniques que sont la thymidine phosphorylase et la cathepsine-B, consécutive à la stimulation par Ang-2 (Coffelt et al., 2010).

Les TEMs, tout comme les TAMs, participent également à maintenir un statut d'immunosuppression dans la tumeur. Cet état d'immunosuppression résulte d'une diminution de la prolifération des lymphocytes T effecteurs associée à une expansion des Treg suite à une surexpression de l'IL-10 dans l'environnement tumoral ; cette surexpression d'IL-10 étant stimulée par un effet autocrine de l'Ang-2 (présente dans l'environnement tumoral), sur les TEMs (Coffelt et al., 2010, 2011). Ainsi, l'ensemble des données préalablement exposées témoignent de l'implication du microenvironnement des GB dans le recrutement de cellules inflammatoires puis secondairement dans l'instauration d'une immunosuppression consécutive aux interactions entre ces différentes cellules.

L'hypoxie, la vascularisation tumorale, caractéristiques des GB, sont des éléments clés du recrutement des cellules inflammatoires. Bien qu'un certain nombre de cytokines et de chimiokines participent à ce recrutement, les données précédemment décrites attestent d'une contribution non négligeable du VEGF et l'Ang-2. En effet, ces molécules, sécrétées par les cellules tumorales, les cellules endothéliales mais aussi les macrophages, participent non seulement à l'évolution de la vascularisation tumorale mais aussi à l'évolution du statut inflammatoire des GB. Le VEGF et l'Ang-2, en activant les cellules endothéliales seront responsables du recrutement des cellules inflammatoires dont les macrophages. Ces deux cytokines favoriseront également leur polarisation en phénotype M2. L'enrichissement du microenvironnement en ces deux populations de TAM M2 et de TEM M2 *like* contribuera à instaurer un environnement immunosuppresseur dans les GB.

En résumé, le VEGF et l'Ang-2, dont l'expression est modulée par l'hypoxie, sont des médiateurs moléculaires majeurs de l'intercommunication entre le compartiment tumoral, vasculaire et inflammatoire au cours de la croissance des GB (**Figure 68**). Toutefois, le compartiment inflammatoire, tout comme le compartiment vasculaire fait partie intégrante de la tumeur, et sera atteint par les traitements de CT et RT. Nous nous focaliserons dans la prochaine partie sur les macrophages et les lymphocytes, qui sont les cellules inflammatoires les plus représentées au sein des GB.

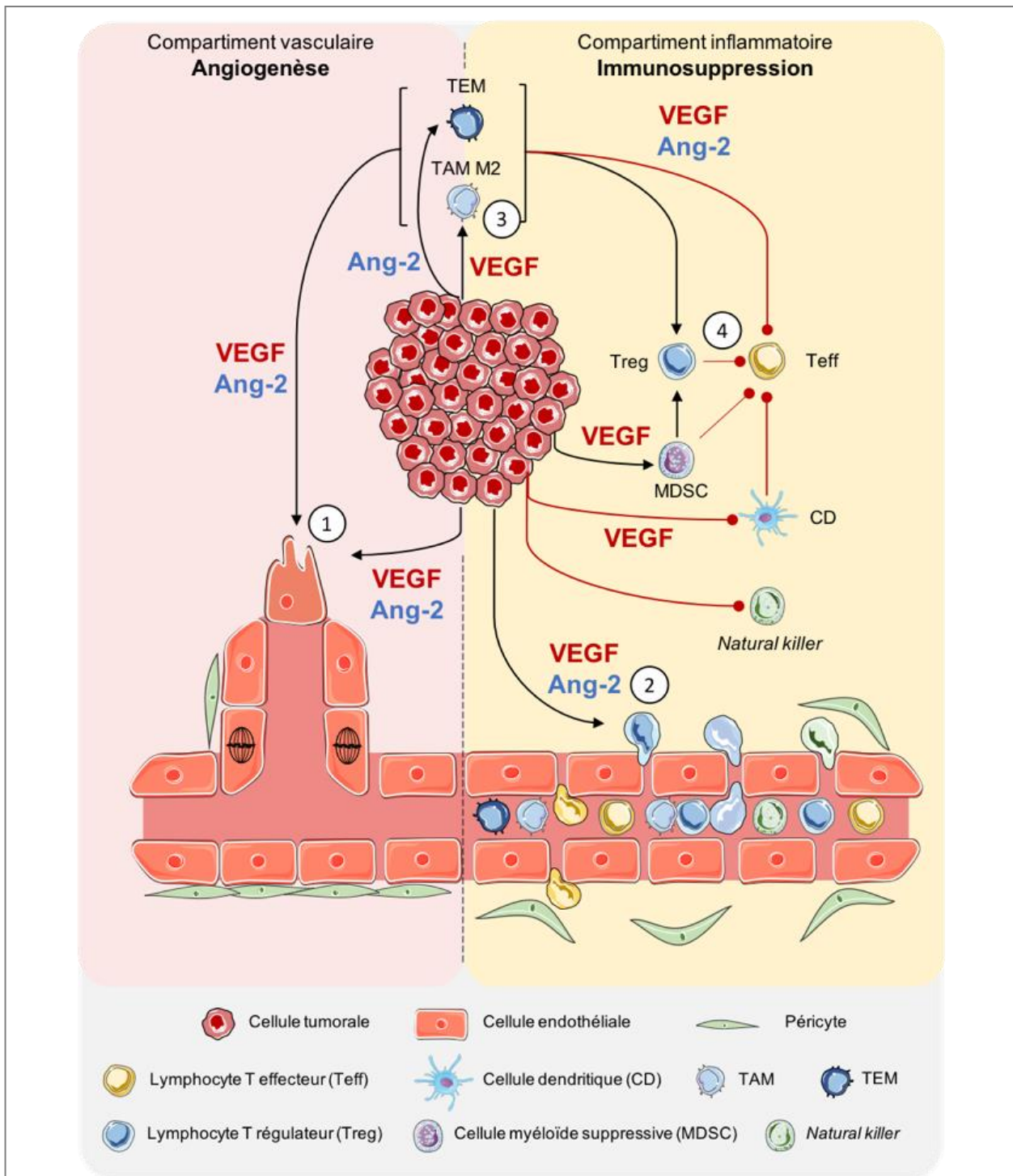


Figure 68 : Le VEGF et l'Ang-2, des modulateurs clés dans la croissance tumorale

Le VEGF et l'Ang-2, produit par les cellules tumorales mais aussi les macrophages, vont agir sur le compartiment vasculaire en favorisant l'angiogenèse (1) et l'activation endothéliale qui facilite le recrutement des cellules inflammatoires (2). De plus, le VEGF et l'Ang-2 vont influencer sur le compartiment inflammatoire et favoriser l'immunosuppression aussi bien sur les cellules de l'immunité innée (3) et l'immunité adaptative (4).

VI. Le compartiment inflammatoire des glioblastomes : effet de la radiochimiothérapie

VI.1 Effet de la radiothérapie sur le compartiment inflammatoire

VI.1.1 Macrophages et radiothérapie

Bien que chez les patients, l'inflammation soit un des événements indésirables et secondaires à une irradiation cérébrale, les effets de la RT sur les macrophages n'ont été étudiés que très récemment à l'échelle préclinique. Il a ainsi été confirmé qu'une irradiation du tissu tumoral favorise le recrutement de monocytes/macrophages, y compris dans les GB et que ce recrutement était la conséquence de la libération des chimiokines MCP-1 et SDF-1 mais également de l'augmentation de la perméabilité vasculaire au niveau tumoral (Cho et al., 2019; Kioi et al., 2010; Kozin et al., 2010; Stafford et al., 2016; Ungvari et al., 2013).

Toutefois, ces cellules inflammatoires ne seront que peu sensibles à la RT. Les monocytes et les macrophages sont effectivement considérés comme des cellules radorésistantes. Cette radorésistance intrinsèque est en partie due à la présence de nombreux systèmes anti-oxydants qui, en s'opposant aux ROS générés par les RI, limitent les dommages à l'ADN au sein de ces cellules (Falcke et al., 2018; Hachiya et al., 1997). De plus, ces cellules qui prolifèrent peu, seront peu sensibles à la RT plus efficace sur les cellules à prolifération rapide.

Bien que ces cellules soient décrites comme radorésistantes, une diminution de la population des TAMs présents dans les GB a été rapportée après traitement par RT (Leblond et al., 2017). Toutefois, Leblond et al., ont montré sur un modèle de GB exposé à une irradiation de 12 Gy, que les macrophages de phénotype M2 seraient plus radorésistants que les macrophages M1 (Leblond et al., 2017). Cet enrichissement en macrophages M2 pourrait être dépendant de la dose d'irradiation utilisée.

- En effet, en réponse à de **fortes doses** (dose totale délivrée > 10 Gy) fractionnées ou non, l'irradiation favorise la présence de macrophages de phénotype M2 dans différents modèles de tumeurs, y compris les GB (Leblond et al., 2017; Okubo et al., 2016; Seifert et al., 2016). Deux processus pourraient être à l'origine de cette observation :

- La radiorésistance du phénotype M2 comme le suggère l'étude de Leblond et al., (Leblond et al., 2017).
- La rééducation des macrophages. En effet, des études *in vitro* ont mis en évidence une rééducation des macrophages du phénotype M1 vers un phénotype M2 après une irradiation à 20 Gy (Crittenden et al., 2012).
- En réponse à de **faibles doses** (dose totale délivrée < 10 Gy), à l'inverse, les macrophages M1 seraient les plus représentés au sein du tissu tumoral irradié, y compris dans les GB (Klug et al., 2013; Stessin et al., 2020). Ces résultats ont été confirmés *in vitro* puisqu'une augmentation d'expression des marqueurs M1 (iNOS, TNF α , HLA-DR, CD86) a été observée après irradiation de macrophages non différenciés (Hildebrandt et al., 2003; Teresa Pinto et al., 2016).

Ces données suggèrent que suite à de faibles doses de RT, l'inflammation intratumorale soit « bénéfique » puisque le phénotype M1 serait le plus représenté au sein des TAMs. A l'inverse, une irradiation à fortes doses induirait un environnement inflammatoire pro-tumoral en favorisant la présence des macrophages M2, immunosuppresseurs.

Cette inflammation post-RT pourrait également, par la présence de ces macrophages M2, contribuer à restaurer un environnement pro-angiogénique notamment *via* un processus de vasculogénèse. En effet, comme nous l'avons décrit précédemment dans le manuscrit, les cellules progénitrices endothéliales mais aussi les cellules MDSC, les monocytes Tie-2⁺ et les TAMs, sont souvent observés dans les régions périvasculaires ou co-localisés avec des cellules endothéliales. Ces cellules se sont avérées être des éléments clés de la stabilisation du réseau vasculaire dans le GB après irradiation. En effet, Kioi et al., ont montré que l'inhibition pharmacologique de la voie SDF-1/CXCR4 limite principalement le recrutement des monocytes CD11b⁺ ainsi que le développement post-irradiation d'une vascularisation tumorale fonctionnelle empêchant ainsi la récurrence tumorale (Kioi et al., 2010).

VI.1.2 Lymphocytes et radiothérapie

Les lymphocytes, comme les macrophages, sont recrutés en réponse à la RT. Ce recrutement est facilité par le remodelage vasculaire induit par la RT. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, l'activation des cellules endothéliales post-RT a pour conséquence la surexpression des protéines d'adhésion telles que VCAM-1, ICAM-1 et la E-Sélectine (Lugade et al., 2008; Ungvari et al., 2013). De plus, la sénescence SASP radio-induite des cellules tumorales et/ou endothéliales peut contribuer également au recrutement de lymphocytes *via* la sécrétion de CXCL1 et CXCL2 (Gonzalez-Meljem et al., 2018).

Contrairement aux macrophages, les lymphocytes sont des cellules très sensibles à la RT comme en témoigne la lymphopénie observée chez les patients traités par RT (Kleinberg et al., 2019). Cependant malgré la radiosensibilité des lymphocytes T, la population de cellules Treg présente une certaine radorésistance permettant le maintien d'un environnement immunosuppresseur après RT (Kachikwu et al., 2011).

VI.2 Effet de la chimiothérapie sur le compartiment inflammatoire

VI.2.1 Macrophages et témozolomide

Très peu d'études se sont intéressées aux effets de la CT sur les macrophages. Il a toutefois été montré que les macrophages mais aussi les cellules dendritiques étaient résistantes au TMZ, contrairement aux monocytes circulants, dont les systèmes de réparations à l'ADN sont altérés (Bauer et al., 2012; Briegert and Kaina, 2007). En revanche, et de façon intéressante, les macrophages acquièrent un phénotype immunosuppresseur M2-like dès lors qu'ils sont en présence de cellules tumorales résistantes au TMZ (Azambuja et al., 2017). Ces effets pourraient être qualifiés d'effets *bystander* exercés par les cellules tumorales et potentiellement à l'origine d'une récurrence de la tumeur post-traitement.

VI.2.2 Lymphocytes et témozolomide

Les observations pré-cliniques révèlent une lymphodéplétion chez les animaux porteurs de GB et traités par TMZ. Cette lymphodéplétion affecte aussi bien les lymphocytes T effecteurs que les lymphocytes Treg (Banissi et al., 2009). Toutefois, chez les patients

porteurs de GB, bien qu'une lymphopénie soit observée, la proportion de cellule Treg se trouve, quant à elle, augmentée après le traitement conventionnel de CT et RT (Fadul et al., 2011).

VII. L'inflammation tumorale : une nouvelle cible de traitement

Les traitements des cancers ont considérablement évolué ces dernières années. Initialement dédiés à éradiquer les cellules cancéreuses par CT et/ou RT, l'arsenal thérapeutique s'est depuis enrichi en thérapies ciblées auxquelles appartiennent l'immunothérapie. Pour les GB, les anti-angiogéniques associés aux traitements conventionnels n'ayant pas été à la hauteur des attentes, les recherches se sont récemment tournées vers l'immunothérapie. En effet, comme nous venons de le décrire, la croissance de ces tumeurs bien que cérébrale, s'accompagne d'une réaction inflammatoire. Toutefois, celle-ci est soit insuffisante, soit inadaptée, laissant penser qu'il pourrait être utile de la modifier afin de la rendre efficace.

Les stratégies d'immunothérapie les plus répandues reposent sur des approches dites « passives ou actives ».

VII.1 L'immunothérapie passive

L'immunothérapie passive consiste à injecter des cellules ou des molécules du système immunitaire qui ont été produites en laboratoire et qui ont une action directe sur les cellules tumorales.

- Parmi les immunothérapies passives, on retrouve les anticorps thérapeutiques dirigés contre les cellules tumorales. Idéalement, l'expression de l'antigène reconnu par l'anticorps devrait être restreinte aux cellules tumorales. Toutefois, comme mentionné précédemment, la difficulté est d'identifier des antigènes tumoraux. C'est pourquoi, peu d'anticorps anti-tumoraux sont évalués actuellement dans un contexte de GB.
- Les cellules CAR-T (*chimeric antigen receptor T cell*) constituent une nouvelle forme d'immunothérapie passive en plein développement. Cette thérapie repose sur la modification des lymphocytes T du patient afin que ceux-ci puissent exprimer un récepteur chimérique spécifique d'antigènes tumoraux. Depuis que leur efficacité a été démontrée pour traiter des

patients leucémiques, le bénéfice thérapeutique de ces cellules est évalué dans de nombreux autres cancers (Maus and Levine, 2016). Dans le contexte du GB, différentes cellules CAR-T ont été développés avec pour cible l'EGF-RvIII, l'IL-13-R2 α ou encore l'HER-2 (Migliorini et al., 2018). Les études précliniques sur le modèle de GB immunocompétent GL261 ont montré effectivement des résultats prometteurs avec une amélioration de la survie en réponse à une injection de cellules CAR-T-IL-13R2 α et même une régression totale de la tumeur après l'inoculation de cellules CAR-T-EGF-RvIII (Chen et al., 2019; Pituch et al., 2018). Les premiers résultats des essais cliniques en cours se montrent intéressants avec une diminution de volume tumoral suite à l'administration de cellules CAR-T-IL-13-R2 α (Brown et al., 2016).

Récemment, ce type de stratégies a également été appliquée aux cellules *natural killer* (Burger et al., 2019).

VII.2 L'immunothérapie active

L'immunothérapie active a pour objectif d'activer le système immunitaire du patient. Plusieurs modalités de traitement ont été proposées afin de réactiver la réponse inflammatoire dans les GB.

- Parmi les immunothérapies actives, on retrouve la vaccination. Le but de cette vaccination est d'inoculer aux patients des antigènes spécifiques de la tumeur afin de stimuler la réponse immunitaire contre les cellules tumorales qui présentent ces antigènes. Dans le contexte des GB, plusieurs essais cliniques ont été développés dans ce sens. Toutefois, ces vaccins, malgré un large ciblage d'antigènes tumoraux, n'ont pas montré de bénéfice sur la survie des patients (Rampling et al., 2016).
- Une approche alternative à la vaccination a consisté à inoculer des cellules dendritiques autologues générées à partir d'un lysat tumoral du patient (Bregy et al., 2013; Prins et al., 2011). Cette approche semble prometteuse puisqu'elle a permis d'augmenter la médiane de survie des patients atteints de GB, associée à une augmentation de LT CD8⁺ dans la tumeur (Prins et al., 2011).

Bien qu'encourageants, les résultats de ces études cliniques suggèrent cependant que pour optimiser l'efficacité de ces immunothérapies dans le contexte des GB, il pourrait être

envisager de développer des approches personnalisées afin de prendre en compte la variabilité interindividuelle de l'expression des antigènes tumoraux.

- L'administration de cytokines immunostimulatrices a été également testée dans les GB. Par comparaison aux approches décrites précédemment, cette modalité d'immunothérapie est dite non spécifique dans le sens où elle s'appuie sur la stimulation générale du système immunitaire sans être capable de cibler spécifiquement la tumeur. L'injection de cytokines telles que l'IL-2 ou encore l'IL-12 dans un modèle préclinique de GB induit une diminution du volume tumoral associée à une augmentation des lymphocytes dans le cœur tumoral (Qiao et al., 2018; Vetter et al., 2009). Les premiers essais cliniques, bien que réalisés sur une faible cohorte de patients, se sont montrés efficaces avec l'IL-2 (Colombo et al., 2005; Kruse et al., 1997). Toutefois, des effets secondaires sont souvent rapportés en raison du large spectre d'action de ces cytokines sur le système immunitaire (Dillman, 2011)
- Plus récemment, le bénéfice thérapeutique obtenu dans certains cancers avec des nouvelles approches ciblant les points de contrôle immunitaires que sont PD-1/PD-L1 et CTLA-4, ont redonné de l'espoir pour les GB.

Cette approche d'immunothérapie est basée sur l'administration d'anticorps immunomodulateurs ciblant les interactions CTLA-4/CD80-86 ou PD-1/PD-L1. Le blocage de ces interactions doit lever l'anergie des lymphocytes présents dans ces tumeurs, et ainsi réactiver les lymphocytes effecteurs.

Pour les GB, plusieurs études précliniques utilisant ces stratégies d'inhibition de *checkpoint* ont obtenu des résultats encourageants puisque la survie des animaux est augmentée en présence d'anti-PD-1 ou d'anti-CTLA-4 (Saha et al., 2017; Stessin et al., 2020; Tacchio et al., 2019). Ces résultats prometteurs ont permis d'envisager différents essais cliniques de façon à évaluer l'efficacité de ces anticorps anti-*checkpoint* administrés soit en monothérapie soit en combinaison avec d'autres traitements (Weller et al., 2017). En effet, les études précliniques ont montré l'intérêt d'associer les immunothérapies aux thérapies conventionnelles ou encore aux thérapies anti-angiogéniques. Par exemple, l'utilisation d'anti-angiogéniques (ciblant le VEGF et l'Ang-2) permet de normaliser la vascularisation et améliore ainsi la biodistribution de l'immunothérapie (Taccio et al., 2019). De façon intéressante et encourageante, l'association de l'anti-PD-1 à la RT et/ou à la CT (TMZ)

augmente considérablement la survie des animaux porteurs de GB (Dai et al., 2018; Stessin et al., 2020).

Si un certain nombre d'approches d'immunothérapie ciblent les lymphocytes, d'autres s'intéressent aux macrophages. Rappelons que ces cellules représentent la population de cellules inflammatoires qui quantitativement est la plus présente dans l'environnement tumoral. Par ailleurs, comme nous l'avons décrit précédemment, lorsque ces TAMs adoptent un phénotype M2 ceux-ci sont non seulement immunosuppresseurs mais aussi pro-angiogéniques et considérés comme pro-tumoraux.

VII.2.1 Immunothérapies ciblant les macrophages

Les stratégies ciblant les macrophages sont basées sur 3 approches différentes : la déplétion de ces macrophages, l'inhibition de leur recrutement ou la rééducation (Anfray et al., 2019; Grégoire et al., 2020). Bien que les stratégies d'inhibition du recrutement des TAMs aient montré un effet dans les modèles de GB murins, en ciblant par exemple les récepteurs aux chimiokines (SDF-1, MCP-3, CSF-1), leur utilisation en clinique s'est avérée décevante puisqu'aucun bénéfice n'a été observé chez les patients ayant reçu un inhibiteur du CSF-1 (Butowski et al., 2016; Coniglio et al., 2012; Stafford et al., 2016).

- La déplétion des macrophages a montré un intérêt dans des modèles pré-cliniques de GB et permet de ralentir le développement de la tumeur (Gabusiewicz et al., 2015). Ainsi, la déplétion de macrophage, par utilisation de clodronate, a montré un effet bénéfique avec une diminution du volume tumoral mais également une diminution de l'angiogenèse tumorale (Fulci et al., 2007). Cependant, cette stratégie est aspécifique et touche également les macrophages M1, anti-tumoraux. C'est pourquoi les études s'orientent vers des stratégies de rééducation des macrophages (Garris and Pittet, 2013).
- Les stratégies de rééducation des macrophages ont ainsi été employées pour faciliter la reprogrammation des macrophages M2 vers un phénotype M1, anti-tumoral. Dans les GB, de nombreuses stratégies ont été testées dans les modèles murins avec des effets bénéfiques sur la survie des animaux. On peut citer par exemple, le ciblage du facteur de transcription NF- κ B, ou encore l'utilisation de dopamine qui a montré un intérêt aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Hagemann et al., 2008; Qin et al., 2015).

Bien que l'immunothérapie n'ait pas encore fait totalement la preuve d'une efficacité pour le traitement des GB en clinique, les études précliniques suggèrent qu'il serait opportun de l'associer aux traitements conventionnels en combinaison avec un traitement anti-angiogénique. Ces traitements combinés auraient l'intérêt 1/ d'améliorer l'efficacité de RT et CT suite à une normalisation des vaisseaux de la tumeur. 2/ de bloquer certains acteurs de l'immunosuppression tumorale (Treg, cytokines immunosuppressives, expression de *checkpoints*, maturation des cellules dendritiques ...) ou favoriser des conditions immunostimulatrices (rééducation des macrophages).

A l'heure actuelle, le trinôme RCT/anti-angiogénique/immunothérapie pourrait être une opportunité pour améliorer les thérapeutiques conventionnelles des GB, comme suggéré pour d'autres tumeurs solides.

Objectifs

Objectifs

Le glioblastome (GB) est la tumeur primaire cérébrale maligne la plus agressive. L'approche multidisciplinaire de base pour les patients comporte une résection chirurgicale, aussi complète que possible suivie d'une radiochimiothérapie (RCT) concomitante. Cependant, malgré le développement des techniques chirurgicales de la radiothérapie (RT) et des chimiothérapies (CT), le traitement des GB reste encore décevant. En effet, la médiane de survie des patients atteints de GB reste désespérément faible, et ce compte tenu des caractéristiques spécifiques à ces tumeurs. Ainsi, l'échec de ces traitements s'explique par le caractère très infiltrant de ces tumeurs, excluant toute exérèse totale et une relative résistance à la RT et aux CT actuelles, en raison notamment de leur caractère hypoxique.

Depuis quelques années, de nouvelles approches thérapeutiques sont apparues, directement issues des recherches fondamentales menées sur ces tumeurs permettant d'avoir une meilleure compréhension de la physiopathologie des GB. Notamment, l'étude du microenvironnement tumoral a pris ces dernières années une place importante dans le domaine de la recherche sur le cancer. En effet, il est désormais admis que le développement d'une tumeur est déterminé non seulement par le génotype des cellules tumorales, mais aussi par leurs interactions avec leur environnement qui module les capacités de développement de la tumeur. C'est ainsi qu'il a été proposé d'optimiser l'efficacité des traitements conventionnels en leur associant des traitements ciblant la vascularisation tumorale. Les GB étant très vascularisées, ces tumeurs semblaient propices pour répondre à ce type de thérapie.

L'idée selon laquelle s'opposer à la vascularisation d'une tumeur pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique anti-cancéreuse a émergé dès 1971, avec le concept d'angiogenèse tumorale formulé par Judah Folkman ([Folkman, 1971](#)). Mais c'est surtout depuis le début des années 1990 que les données expérimentales ont conforté ce concept et ont engendré un véritable engouement, au point de faire naître l'espoir que les molécules anti-angiogéniques allaient devenir les nouveaux traitements anti-cancéreux y compris pour les GB. Au regard du rôle majeur du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) dans le processus angiogénique, les stratégies thérapeutiques adoptées ont majoritairement cherché à bloquer ce facteur angiogénique. Toutefois, pour les GB, les résultats cliniques obtenus avec les anti-VEGF n'ont pas été à la hauteur des attentes, notamment car certains patients échappaient au traitement par un effet rebond impliquant d'autres facteurs angiogéniques dont l'Angiopoïétine-2 (Ang-2).

Les GB sont également des tumeurs très inflammatoires en faveur d'un statut immunosuppresseur pouvant contribuer à la progression tumorale. L'inflammation étant en partie dépendante du compartiment vasculaire, il a été proposé qu'une même molécule puisse participer à la régulation de ces deux processus. Tel est le cas du VEGF mais aussi de l'Ang-2. En revanche, contrairement au VEGF, les données concernant l'Ang-2 sont plus fragmentaires ou controversées, en raison de son effet contexte-dépendant (Kim et al., 2000a; Korhonen et al., 2016; Maisonpierre et al., 1997; Souma et al., 2018). Par ailleurs aucune étude n'a permis d'établir l'effet paracrine de l'Ang-2 dans un contexte de traitement conventionnel de GB associant la RT et la CT.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse ont été d'évaluer, à l'échelle préclinique, les effets de l'Ang-2 sur la progression du GB et sa réponse au traitement de RCT. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux compartiments vasculaire et inflammatoire, qui au demeurant seront remodelés par la RCT.

Afin de répondre à ces objectifs, la première partie des résultats a été consacrée à identifier à l'échelle préclinique, l'impact d'une surexpression d'Ang-2 sur la croissance du GB. Cette étude a été menée sur un modèle syngénique de GB de souris immunocompétente. Afin de mimer la surexpression d'Ang-2 observée chez les patients les cellules de GB ont été modifiées génétiquement de façon à exprimer l'Ang-2 de souris. Une étude longitudinale par IRM complétée par une étude immunohistologique a permis d'évaluer les effets de l'Ang-2 sur la progression tumorale en relation avec sa vascularisation et son inflammation.

Dans une seconde partie, souhaitant nous rapprocher au mieux des conditions thérapeutiques du patient porteur de GB, nous avons mis en place et caractérisé un modèle de récurrence suite à une administration de RCT fractionnée.

Dans la dernière partie des résultats, l'impact de ce traitement a été évalué sur les tumeurs obtenues après implantation orthotopique des cellules GL261-wt et GL261-Ang-2 chez la souris.

L'ensemble de ces travaux ont été menés afin de contribuer à élucider le rôle de l'Ang-2 en tant que facteur angiogénique immunomodulateur dans les GB.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

I. Méthodologie *in vitro*

I.1 Culture cellulaire

I.1.1 Culture de la lignée cellulaire de glioblastome murin GL261

La lignée cellulaire GL261 [*repository, division of cancer treatment and diagnosis* (NCI-DCTD)] issue de glioblastome (GB) induit chez la souris C57BL/6, est maintenue en culture dans du milieu RPMI (*roswell park memorial institute medium*, Sigma Aldrich) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (dSVF, Eurobio), 2 mM de glutamine (Gln, Sigma Aldrich) et 1 µg/ml de pénicilline/streptomycine (P/S, Sigma Aldrich) à 37°C dans une atmosphère humide composée de 95 % d'air et 5 % de CO₂. Une fois à confluence, le tapis cellulaire est rincé avec une solution de *phosphate buffer saline* (PBS, Sigma Aldrich) et les cellules sont ensuite décollées sous l'action d'une solution de trypsine 0,25 %-EDTA (Sigma Aldrich) pendant 5 min à 37°C. L'action de la trypsine est ensuite inhibée par l'ajout de dSVF présent dans le milieu de culture. Les cellules sont centrifugées à 300g pendant 5 min puisensemencées aux densités nécessaires aux expérimentations.

I.1.2 Transfection stable des cellules tumorales GL261 exprimant l'Ang-2

Afin d'obtenir des cellules GL261 surexprimant de façon chronique l'Ang-2, les cellules GL261 ont été préalablement transfectées, avec le plasmide pCMV-6-Kanamycine/Neomycine (pCMV-6-K/N) contenant le gène de l'ANG-2 murin (pCMV-6-K/N-Ang2), construit préalablement au sein du laboratoire. La transfection a été réalisée par la méthode de lipofection à la lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) et selon la procédure du fournisseur. Brièvement, les cellules sontensemencées à forte densité puis sevrées de P/S quelques heures avant la transfection. Par la suite, les cellules sont mises en contact avec un mélange de 2 µg de plasmide pCMV-6-K/N-Ang2, 1 µl de lipofectamine 2000, et 100 µl d'Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific). Le milieu est changé 6 h plus tard avec l'ajout d'un milieu frais contenant de la P/S. Les cellules sont ensuite sélectionnées avec 400 µg/ml de généticine G-418 (Sigma Aldrich), afin de ne conserver que les cellules qui ont incorporé le plasmide pCMV-6-K/N-Ang2. Les cellules GL261-Ang2 ainsi obtenues sont maintenues en culture comme les cellules GL261 contrôles (GL261-wt), à l'exception d'une sélection à la généticine de façon périodique. L'expression des ARNm de l'Ang-2 est régulièrement vérifiée

afin de s'assurer de la bonne stabilité de la transfection des cellules GL261-Ang2.

Afin d'avoir un contrôle de transfection, une lignée contrôle « *scrambled* » (GL261-Scr) a été obtenue par la transfection d'un vecteur vide pCMV-6-K/N.

I.1.3 Culture de la lignée cellulaire endothéliale bEnd.3

La lignée cellulaire bEnd.3 [*european collection of authenticated cell cultures* (ECACC)], cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de souris BALB/c, a été immortalisée par le *polyoma virus middle T antigen*. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (*dulbecco's modified eagle's medium*)-4,5 g/l de glucose (Sigma Aldrich) supplémenté avec 10 % de dSVF, 4 mM de Gln et 1 µg/ml de P/S à 37°C dans une atmosphère humide. Une fois à confluence, les cellules sont décollées et ensemencées comme décrit pour la lignée tumorale.

I.1.4 Culture de la lignée cellulaire de macrophages RAW 264.7

La lignée cellulaire de macrophages RAW 264.7 [*american type culture collection* (ATCC)] est maintenue en culture dans du milieu DMEM-4,5 g/l de glucose supplémenté avec 10 % de dSVF, 4 mM de Gln et 1 µg/ml de P/S à 37°C dans une atmosphère humide. Une fois à confluence, les cellules sont décollées et ensemencées comme décrit précédemment.

I.2 Traitements des cellules

I.2.1 Irradiation par rayons X

Les cellules sont irradiées avec un irradiateur X-Rad 225Cx (Precision X-Ray, obtenu dans le cadre du projet Rec-Hadron, ANR-10-EQPX-1401, Equipex 2012 inclus dans le projet Archade, plateforme CYCERON). Lors de l'irradiation, l'énergie délivrée par le faisceau de rayon X (RX) est de 225 keV avec une intensité de 10,7 mA et un débit de dose de 2 Gy/min. À l'issue de l'irradiation, les cellules sont remises en culture sans changement de milieu afin de conserver les produits radio-induits tels que les ROS (*reactive oxygen species*).

I.2.2 Traitement de chimiothérapie au témozolomide

Le témozolomide (TMZ, Sigma Aldrich), commercialisé sous forme de poudre, est dans un premier temps resuspendu dans du DMSO (*dimethyl sulfoxide*, Sigma Aldrich) à une concentration de 160 mM. Les cellules sont traitées avec du TMZ à la dose de 100 µM, où

celui-ci est apporté dans du milieu frais afin de maintenir une meilleure stabilité du composé qui est dépendante du pH. Les cellules contrôles reçoivent un volume identique de DMSO.

1.2.3 Protocole de radiochimiothérapie

Deux protocoles de radiochimiothérapie (RCT) ont été utilisés dans cette étude (Figure 69).

- Un protocole de dose unique où le traitement de TMZ à la concentration de 100 μM est appliqué sur les cellules 2 h avant irradiation des cellules à 8 Gy.
- Un second protocole, plus proche de celui utilisé *in vivo*, a été utilisé et celui-ci consiste à fractionner le traitement. Dans cet objectif, les cellules ont été irradiées 3 fois à la dose de 4 Gy et à 48 h d'intervalle. Le TMZ (100 μM) est ajouté 2 h avant chaque irradiation.

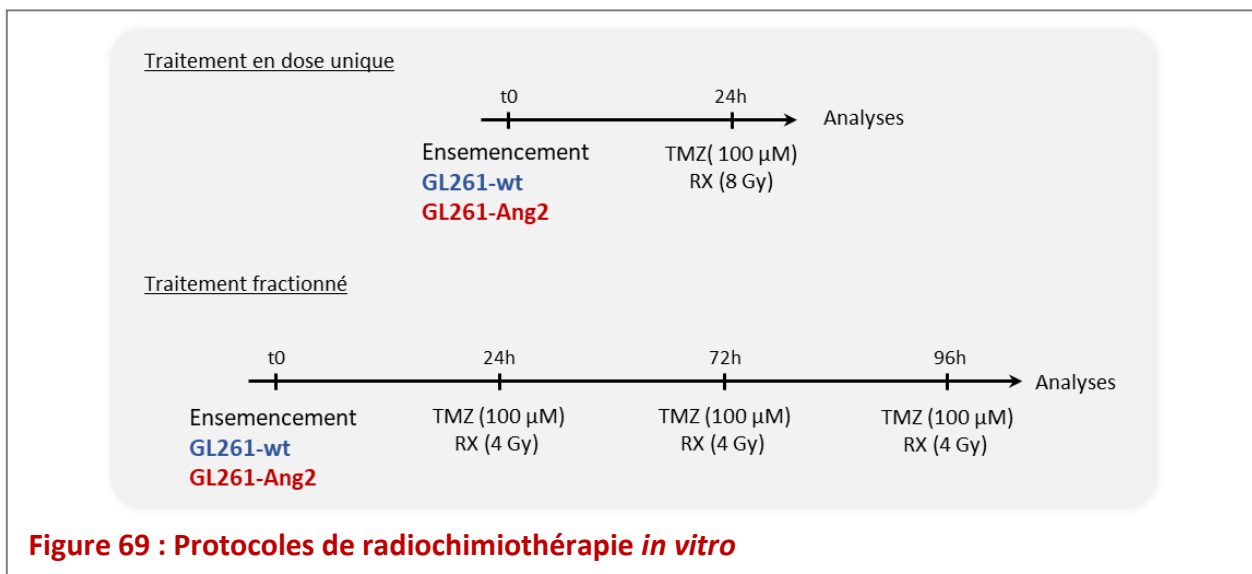


Figure 69 : Protocoles de radiochimiothérapie *in vitro*

1.3 Étude de la réponse aux traitements

1.3.1 Test de clonogénicité

Le test de clonogénicité est le test de référence en radiobiologie. Il permet, en effet, d'évaluer la radiosensibilité des cellules. Les cellules, ensemencées à faible densité, ayant résisté au traitement ou réparé leurs dommages à l'ADN vont former des colonies après plusieurs jours de culture.

Les cellules bEnd.3 et GL261 génétiquement modifiées ou non sont ensemencées respectivement à une densité de 1250 cellules/ml et 500 cellules/ml dans des plaques 6 puits, puis irradiées 24 h plus tard à différentes doses : 0, 1, 2, 4 et 6 Gy. À la fin de l'expérience, soit

7 jours après irradiation pour les cellules endothéliales bEnd.3 et 10 jours pour les cellules tumorales GL261-wt et GL261-Ang2, les cellules sont rincées avec une solution de PBS puis fixées et colorées pendant 30 min à température ambiante avec une solution contenant 20 % d'éthanol et 2,3 % de cristal violet (Sigma Aldrich). Les cellules sont ensuite rincées à l'eau courante, séchées puis la plaque de culture est numérisée afin d'analyser manuellement le nombre de colonies formées. Seules les colonies comprenant un minimum de 50 cellules sont dénombrées.

Le test de clonogénicité a également été réalisé en combinant le TMZ à la radiothérapie (RT). Pour ce protocole de RCT, le TMZ (100 μM) est appliqué sur les cellules 2 h avant l'irradiation aux RX et ce pour des doses croissantes (0, 1, 2, 4, 6 Gy).

Ce test normalement utilisé en radiobiologie a été adapté pour évaluer la chimiosensibilité des cellules au TMZ avec des doses croissantes (0, 12.5, 25, 50, 100 μM). Les densités d'ensemencement sont identiques à celles décrites précédemment.

1.3.2 Analyse de la courbe de survie

À partir du nombre de colonies comptées dans chaque puits, on peut déterminer un *plating efficiency* (PE) = $\frac{\text{nombre de colonies formées à 0 Gy}}{\text{nombre de cellulesensemencées}}$ qui permet par la suite de calculer, pour chaque dose, la fraction de survie (SF) = $\frac{\text{nombre de colonies formées après irradiation}}{\text{nombre de celluleensemencées} \times \text{PE}}$.

Les données obtenues nous permettent ainsi d'établir une courbe de survie avec en abscisse la dose d'irradiation en Gy et en ordonnée les valeurs de la SF selon une échelle logarithmique (**Figure 70**). Ces courbes de survie obtenues après une irradiation aux RX, se réfèrent au modèle linéaire quadratique et traduisent l'événement létal subit par la cellule :

$$SF = e^{-\alpha D + \beta D^2}.$$

On distingue deux coefficients, α et β , chacun reflétant la nature de l'événement ayant induit la mort cellulaire. Le coefficient α est la pente de la partie linéaire de la courbe. Il correspond à la probabilité que la cellule rencontre un événement létal de façon direct. Le coefficient β représente la pente de la partie quadratique de la courbe. Il correspond à la probabilité que la cellule rencontre un événement subléta. Ainsi à partir de cette courbe, et

de son équation, il est possible d'extraire les paramètres radiobiologiques suivants :

- La SF2 correspond à la SF observée après une irradiation à 2 Gy.
- La D₃₇ ou dose létale moyenne, est la dose pour laquelle la SF est de 37 %.

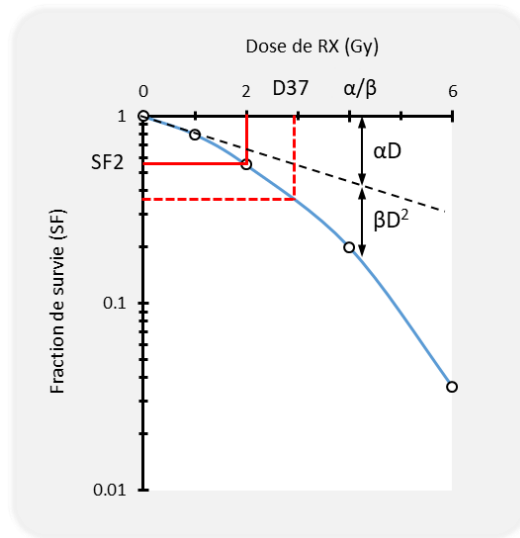


Figure 70 : Courbe de survie attendue après irradiation aux rayons X suivant l'équation linéaire quadratique

SF2 : fraction de survie à 2 Gy. D37 : Dose d'irradiation pour laquelle la SF est de 37 %.

1.3.3 Étude de la viabilité cellulaire

1.3.3.1 Comptage cellulaire

Les cellules sont ensemencées en triplicat et incubées en normoxie pendant 4 jours. Pour chaque temps d'étude, les cellules sont décollées, centrifugées et reprises dans une solution de bleu trypan 0,4 % (Sigma Aldrich) à volume identique. Le mélange a ensuite été compté avec un hématimètre en triplicat selon la méthodologie standard

1.3.3.2 Mesure de confluence

La confluence peut être également utilisée comme le reflet du nombre de cellules. Ainsi, pour évaluer cette confluence, les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits et la confluence est mesurée à différents temps à l'aide du module *measure confluency* du lecteur de plaque SPARCK® (Tecan Group Ltd). Les résultats obtenus représentent le pourcentage de recouvrement du puits par les cellules. Chaque puit peut ainsi être analysé de façon longitudinale.

I.3.4 Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux

L'étude du cycle cellulaire a été réalisée sur le cytomètre en flux Gallios™ (Beckman Coulter) localisé sur la plateforme caennaise SFR ICORE (interaction cellules-organismes-environnement). Les données ont été analysées avec le logiciel Kaluza® (Beckman Coulter).

Brièvement, les surnageants, contenant les cellules mortes, sont récupérés et après rinçage dans une solution de PBS, le tapis cellulaire est décollé par l'action de la trypsine. Le mélange est ensuite centrifugé à 300g pendant 5 min. Après deux rinçages avec une solution de PBS, le culot cellulaire est fixé avec une solution d'éthanol froid à 70 % avant un stockage à 4°C. Préalablement à l'analyse au cytomètre, l'éthanol est éliminé et les cellules sont rincées avec une solution de PBS avant un marquage à l'iodure de propidium (IP, Beckman Coulter) selon les instructions du fournisseur.

L'IP est un intercalant de l'ADN fluorescent ($\lambda_{ex} = 540 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 620 \text{ nm}$). Ainsi, l'analyse des cellules au cytomètre en flux permet de distinguer les phases du cycle en fonction de la fluorescence mesurée qui est elle-même proportionnelle à la quantité d'ADN contenu dans la cellule (**Figure 71**). En effet, les cellules qui sont dans la phase du cycle G0/G1 ont une quantité d'ADN de $2n$, les cellules en G2/M qui ont dupliqué leur ADN possèdent $4n$ ADN. Les cellules en phase S, en cours de réplication, ont une quantité d'ADN comprise en $2n$ et $4n$. Enfin, les cellules polyploïdes (EndoR) se caractérisent par une quantité d'ADN supérieure à $4n$ alors que les cellules en mort cellulaire (SubG1) contiennent moins de $2n$ d'ADN. L'ensemble des analyses est effectué sur un minimum de 10 000 événements.

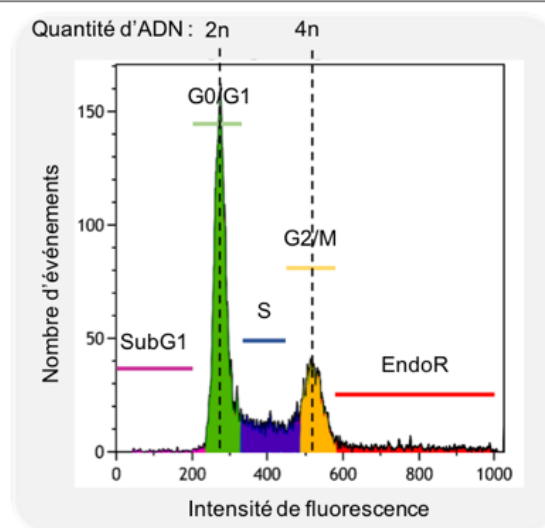


Figure 71 : Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux

I.3.5 Test de la sénescence SA- β -Galactosidase

Les cellules sénescents sont associées à des changements morphologiques et biochimiques. Parmi ces modifications, on retrouve une augmentation de l'activité de l'enzyme β -galactosidase (Dimri et al., 1995), sur laquelle repose ce test. Ainsi, seules les cellules sénescents peuvent transformer le substrat X-Gal à pH 6, qui se manifeste alors par l'obtention d'une coloration bleue, observable au microscope. Dans notre étude, la sénescence est évaluée avec le kit *senescence- β -galactosidase staining* (Cell Signaling) selon le protocole du fournisseur.

I.3.6 Étude de la migration des macrophages

Ce test permet d'étudier la capacité de migration des macrophages. Les macrophages RAW 264.7 sont ensemencées dans des inserts constitués d'une membrane poreuse (\varnothing : 5 μ m, Sarsted), avec du milieu supplémenté de 0,5 % de dSVF. Les inserts sont ensuite placés dans les puits de culture (plaque 24 puits) contenant les cellules tumorales, GL261-wt ou GL261-Ang2, traitées ou non 24 h auparavant. Pour les conditions où seule l'Ang-2 est présente dans le puit de culture, des doses croissantes (0, 200, 400, 800 ng/ml) de cytokine recombinante Ang-2 (R&D Systems) sont ajoutée dans le puits 30 min avant d'ajouter l'insert contenant les macrophages RAW 264.7. Dans certaines expériences, le récepteur soluble Fc Tie-2 (R&D Systems) est ajouté, à la dose de 8 μ g/ml de façon concomitante à l'Ang-2, afin de pouvoir lier et inhiber l'action de l'Ang-2. Après 24 h de migration, les cellules RAW 264.7 présentes sur la face supérieure de la membrane, sont retirées à l'aide un coton-tige, et les cellules présentes sur la face inférieure (cellules ayant migré) sont incubées pendant 5 min dans une solution de PBS-Hoechst 33342 (10 μ g/ml, Sigma Aldrich) afin de colorer les noyaux cellulaires. Les images ont été acquises sur un microscope Leica Aristoplan (Leitz Leica) avec un objectif 25x. La migration cellulaire est ensuite mesurée en dénombrant les cellules par microscopie à épifluorescence (5 photos par membrane).

II. Méthodologie *in vivo*.

II.1 Bien être animal

L'ensemble des expériences menées *in vivo* ont fait l'objet d'une demande d'autorisation de projet (APAFIS#12496) validée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation et ont été exécutées dans le respect du bien-être de l'animal

et en accord avec la réglementation. Ainsi, tout animal qui atteint un des point limite est mis à mort, c'est à dire pour un volume tumoral excédent 80 mm³, une perte de poids de 15% par rapport au poids lors de l'implantation. De plus, le comportement général de l'animal a été surveillé en se basant sur le *mouse grimace scale* proposé par le *national center for the replacement, refinement and reduction of animals in research* (NC3Rs).

II.2 Modèle orthotopique de glioblastome murin

Les cellules de GB ont été implantées dans le striatum droit des souris mâles immunocompétentes C57BL/6 (20-23 g, Laboratoire Janvier).

Les cellules GL261-wt et GL261-Ang2 sont décollées comme mentionné précédemment, puis resuspendues dans une solution de PBS-Gln 2 mM à une concentration de $3,33 \times 10^7$ cellule/ml.

L'induction des souris à l'anesthésie a été réalisée avec 5 % d'isoflurane dans un mélange 70 % de protoxyde d'azote et 30 % d'O₂. L'anesthésie est ensuite maintenue à 2 % dans ce même mélange pendant la chirurgie. La profondeur de l'anesthésie est préalablement évaluée par le reflexe podal. Les souris sont ensuite placées dans un cadre stéréotaxique après une application de xylocaïne en gel sur les barres d'oreilles. Une craniotomie est réalisée à l'aide d'une aiguille dentaire 30G (Medibase) selon les repères suivant : 2 mm en latéral par rapport à la scissure inter-hémisphérique, 0 mm en antéro-postérieur par rapport au bregma et 4 mm en profondeur par rapport au bregma (**Figure 72**).

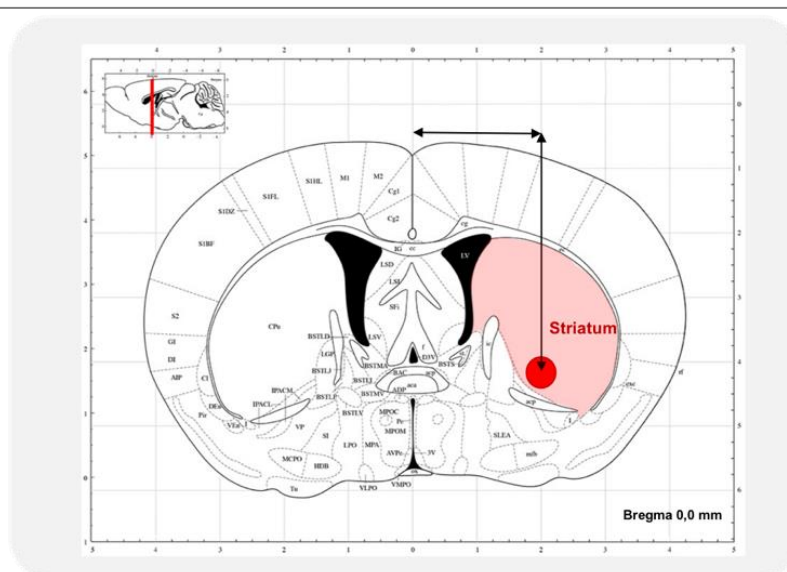


Figure 72 : Coordonnées d'injection des cellules tumorales chez la souris C57BL/6

Les cellules tumorales (1.10^6) sont injectées dans un volume de 3 μ l avec un débit d'injection standardisé avec un pousse seringue (Havard Apparatus) à 0,6 μ l/min pendant 5 min. Avant le retrait de l'aiguille, un temps d'attente de 5 min est nécessaire pour éviter tout reflux de cellules. La peau de l'animal est ensuite suturée avec du fil Silkam® 5.0 (B-Braun) et une anesthésie locale est appliquée avec de la xylocaïne 2 %. Une administration d'analgésie est réalisée en péri-opératoire avec de la buprénorphine (Buprecare® ; 0,05 mg/kg en sous-cutanée).

II.3 Étude longitudinale de la croissance tumorale par IRM

Les souris sont anesthésiées pendant l'acquisition en IRM selon la même procédure que décrite précédemment. L'animal est placé en position ventrale dans un berceau chauffé à 37°C, la respiration de l'animal est également surveillée à l'aide d'un capteur placé sous l'abdomen de la souris. Les images sont acquises sur la plateforme d'imagerie CYCERON avec un système Pharmascan® (Bruker) de haut champ magnétique (7 Tesla) spécialement conçu pour les petits animaux. L'acquisition des données est réalisée à l'aide du logiciel Paravision 6.0.1 (Bruker).

Une séquence *fast low angle shot* (FLASH, TR (temps de répétition)/TE (temps d'écho) = 100/3,1 msec) est tout d'abord effectuée afin d'avoir tous les pré-réglages requis. De plus, cette séquence permet d'avoir le positionnement de l'animal et permet ainsi de délimiter la zone d'acquisition située entre les bulbes olfactifs et le cervelet.

L'imagerie anatomique est ensuite obtenue avec une séquence T2w *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement* (RARE) dont les paramètres sont : facteur d'accélération de 8 ; TR/TE_{effectif} = 5000/60 msec ; nombre d'expériences (NEX) = 1 ; 20 coupes de 0,5 mm d'épaisseur ; résolution spatiale = 0,07x0,07 mm ; temps d'acquisition : 2 min. Le volume tumoral est ensuite délimité manuellement grâce au logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

II.4 Mesure du volume sanguin cérébral

L'étude du volume sanguin cérébral nécessite préalablement la pose d'un cathéter dans la veine caudale de la souris afin d'injecter l'agent de contraste. Comme précédemment, une séquence FLASH est effectuée afin de positionner la zone d'acquisition. À l'issue de celle-ci

et avant l'injection de l'agent de contraste, une imagerie anatomique T2w RARE est réalisée suivie d'une imagerie T2* à multi échos de gradient avec 7 échos de gradient (TE = 2,98 ; 6,62 ; 10,26 ; 13,90 ; 17,54 ; 21,18 et 21,82 msec). Les paramètres de l'imagerie T2* sont les suivants : TR = 1500 ms ; NEX=1 ; 40 coupes de 0,25 mm d'épaisseur ; résolution spatiale = 0,14 x 0,14 mm ; temps d'acquisition = 3 min 12 sec. L'agent de contraste P904® (200 µmol/kg, Guerbet) est ensuite injecté et une nouvelle imagerie T2* selon les mêmes modalités est réalisée. Les cartes de volumes sanguins cérébrales (images après injection de P904® - images avant injection de P904®) sont obtenues à partir du temps d'écho 10,26 msec grâce au logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) avec une macro développée au sein du laboratoire (Chakhoyan et al., 2017).

II.5 Traitements des animaux

Les différents traitements utilisés dans ces études sont basés comme chez l'Homme, sur un fractionnement thérapeutique, avec 3 fractions délivrées aux jours 7, 9 et 11 post-implantation des cellules de GB.

II.5.1 Administration de témozolomide

La solution de TMZ est préparée avec du DMSO à une concentration de 10 mg/ml et administrée aux animaux par voie intra-péritonéale à une dose de 10 mg/kg. Les souris contrôles reçoivent un volume de solution saline identique aux animaux traités.

II.5.2 Irradiation cérébrale des animaux par rayons-X

Pour le protocole d'irradiation, les souris sont anesthésiées selon la même procédure que précédemment. L'animal est positionné en position ventrale dans un berceau (Minerve) et une caméra permet d'avoir un visuel sur la respiration de la souris.

Les animaux sont irradiés avec l'irradiateur X-Rad 225Cx. Une première imagerie scanner est réalisée afin de positionner correctement l'animal sous le faisceau de RX, pour ne cibler que l'hémisphère porteur de la tumeur (**Figure 73**). Puis, l'irradiation est réalisée avec un collimateur de 5 mm. Les animaux sont irradiés à la dose de 4 Gy avec une énergie délivrée de 225 keV, une intensité de 13,0 mA à un débit de dose de 3,3 Gy/min

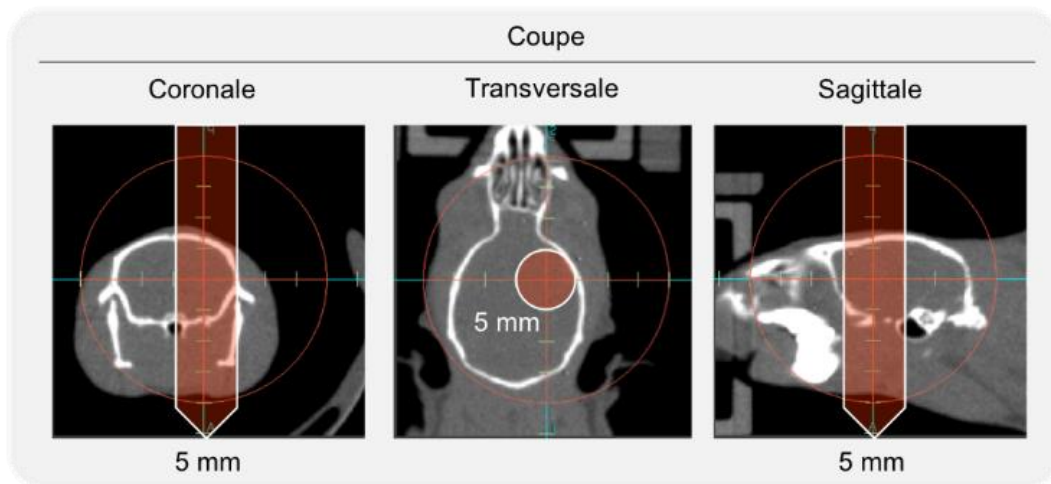


Figure 73 : Détermination de la zone d'irradiation ciblant la tumeur cérébrale suite à un scanner chez la souris.

II.5.3 Protocole de radiochimiothérapie

Le protocole de RCT consiste à délivrer, dans un premier temps, la CT à la dose de 10 mg/kg, suivies 2 h plus tard d'une irradiation ciblée à 4 Gy.

II.6 Prélèvement des cerveaux

Les animaux reçoivent 2 h avant la mise à mort, une injection intra-péritonéale de pimonidazole (Hypoxyprobe Incorporation) à une dose de 80 mg/kg. Les animaux sont ensuite mis à mort par une anesthésie profonde sous létale, suivi d'une thoracotomie et d'une perfusion intracardiaque de sérum physiologique froid et hépariné. Le cerveau est ensuite extrait de la boîte crânienne puis plongé brièvement (5 sec) dans du *n*-pentane (Sigma Aldrich) avant une congélation à -80°C.

III. Expérimentation *ex vivo*

III.1 Coupes histologiques

Les cerveaux sont coupés au cryostat afin de réaliser des coupes coronales de 30 µm d'épaisseur. Les coupes sont montées sur des lames *superfrost* (Thermo Fisher Scientific), de façon sériée, et ensuite stockées à -80°C avant les analyses immunohistologiques (**Figure 74**).

III.2 Isolation des leucocytes pour une analyse au cytomètre de flux

III.2.1 Isolation des cellules à partir du sang périphérique

Les cellules mononuclées du sang périphérique ou PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) sont prélevées par une ponction dans le ventricule juste avant la procédure de perfusion intracardiaque. Le sang est récupéré (~400 µl) à l'aide d'une seringue héparinée, puis une lyse des hématies avec 2 ml de tampon de lyse *red blood cell* (RBC, Thermo Fisher Scientific) est réalisée pendant 2 min à température ambiante avant l'immunomarquage des PBMCs.

III.2.2 Isolation des cellules de la rate

Après avoir récupéré la rate, celle-ci est broyée sur un tamis de 70 µm (Sarsted) afin de récupérer les lymphocytes et monocytes contenus dans cet organe lymphoïde. Le tamis est ensuite rincé avec une solution de HBSS (hank's balanced salt solution, Sigma Aldrich). Les cellules sont centrifugées à 300 g pendant 5 min puis resuspendues dans 2 ml de tampon de lyse RBC pendant 2 min à température ambiante.

III.2.3 Immunomarquage et acquisition

Les PBMCs et les splénocytes sont dans un premier temps incubées 15 min à 4°C en présence d'un anticorps anti-CD16/CD32 (1 µg/10⁶ cellules, BD Biosciences) afin d'éviter toute liaison aspécifique puis les anticorps primaires couplés à des fluorochromes sont ajoutés pendant 15 min à 4°C avant que les cellules ne soient fixées 10 min avec 100 µl d'une solution de PBS-PFA 2 % (paraformaldéhyde, Sigma Aldrich). Les cellules sont stockées à 4°C avant l'analyse au cytomètre de flux CytoFLEX S (Beckman Coulter SAS) localisé sur la plateforme ICORE de l'université de Caen. Les données de cytométrie ont été analysées avec le logiciel CytExpert (Beckman Coulter). Les anticorps utilisés sont listés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Anticorps utilisés en cytométrie de flux

Panels	Anticorps	Fluorochromes	Clones	Concentrations	Fournisseur	Références
Lymphocyte Monocyte	CD16/CD32	∅	2.4G2	10 µg/ml	BD Biosciences	553142
	CD3e	V450	500A2	1 µg/ml	BD Biosciences	560801
	CD4	PE	H129.19	1 µg/ml	BD Biosciences	553653
	CD8	PE-Cy™7	53-6.7	1 µg/ml	BD Biosciences	552877
	CD45	FITC	30-F11	1 µg/ml	BD Biosciences	553080
	CD11b	PE	M1/70	1 µg/ml	BD Biosciences	553311

IV. Méthodologie générale

IV.1 Analyse transcriptomique par qRT-PCR

IV.1.1 Extraction d'ARN cellulaire

Les ARN totaux des cellules sont extraits avec le kit Nucleospin RNA Plus (Macherey-Nagel) suivant les instructions du fournisseur. À l'issue de l'extraction, la concentration en ARN des échantillons est déterminée par la mesure de la densité optique (DO) à 260 nm (une unité de DO correspond à 40 µg/ml d'ARN) et la pureté est estimée par le rapport DO_{260}/DO_{280} qui doit être supérieur à 2. Ces mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop (Nanophotometer Implen).

IV.1.2 Transcription inverse

Les ARNs sont ensuite convertis en ADNc (ADN complémentaire) avant l'étape d'amplification par *polymerase chain reaction* (PCR). L'ARN (1 µg) est repris dans 10 µl d'eau puis dénaturé 10 min à 65°C pour rompre d'éventuelles liaisons doubles brins d'ARN. Ces 10 µl sont ensuite incubés 1 h à 42°C en présence d'un mélange réactionnel (Promega) contenant du tampon 5X, 10 mM de MgCl₂, 2mM de désoxyribonucléotides (dNTP), 0,05 mg/ml d'oligodT, 20 unités de RNAsin (inhibiteur de RNases) et 12,5 unités d'AMV-RT (transcriptase inverse). Les ARNs sont rétrotranscrits à l'aide d'un *thermocycler* Bio-Rad T100 (Bio-Rad).

IV.1.3 PCR quantitative en temps réel

Les ADNc obtenus sont ensuite amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne quantitative et en temps réel, *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR). L'amplification est réalisée à l'aide du QuantStudio™ 3 *Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific) en utilisant 25 ng d'ADNc (sous 2,5 µl) dans un mélange contenant un couple d'amorces spécifiques (Eurogentec), dont les séquences sont présentées dans le **Tableau 3**, et une solution de Takyon (Eurogentec). Le profil d'amplification est le suivant : 3 min à 95°C suivi de 40 cycles de 3 sec à 95°C et 30 sec à 60°C. L'expression relative des gènes étudiés a été obtenue en utilisant la méthode du ΔCt (*Cycle threshold* ; Ct gène cible - Ct gène référence) avec comme gène de référence la cyclophiline A.

Tableau 3 : Amorces utilisées en RT-qPCR

Gènes	Amorces sens	Amorces anti-sens
ANG-1	5'-CATTCTTCGCTGCCATTCTG-3'	5'-TTATATCTTCTCCCTCCGTTTTCTG-3'
ANG-2	5'-TTAGCACAAAGGATTCGGACAAT-3'	5'-GGACCACATGCGTCAAACC-3'
CD68	5'-GCTTATAGCCCAAGGAACAGAG-3'	5'-CTGTAGGTGTCATCGTGAAGGA-3'
CYCLOPHILINE	5'-CAGACGCCACTGTGGCTTT-3'	5'-TGTGTTTGGAACTTTGTCT-3'
IL-1	5'-CTGAAGAAGAGACGGCTGAGTT-3'	5'-TCTGGTAGGGTGTGA-3'
IL-6	5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAGT-3'	5'-ACAGGTCTGTTGGGAGTGGTAT-3'
INTEGRINE- β 1	5'-AGTGCTCCCACTTCAATCTCACCA-3'	5'-TCTCCTTGCAATGGGTACAGGAT-3'
MCP-1	5'-TGATCCCAATGAGTAGGCTGGAG-3'	5'-ATGTCTGGACCCATTCTTCTTG-3'
P16	5'-GAACTCTTTCGGTCGTACCC-3'	5'-CGAATCTGCACCGTAGTTGA
P21	5'-CGAGAACGGTGGAACCTTACTT-3'	5'-GTAGACCTTGGGCAGCCCTAG-3'
TGF- β 1	5'-TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT-3'	5'-CACAAAGAGCAGTGAGCGCTGAA-3'
TIE-2	5'-GCCGCGGACTGACTACGAGC-3'	5'-GGAGGAGGGAGTCCGATAGACGC-3'
VEGF-A	5'-GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT-3'	5'-TGGCGATTTAGCAGCAGATATAAG-3'

IV.2 Analyse protéique

IV.2.1 Test ELISA

Pour évaluer la surexpression de l'Ang-2 au niveau protéique, les cellules tumorales GL261-wt et GL261-Ang2 ont été incubées pendant 48 h avec 250 µl de milieu RPMI. La concentration d'Ang-2 dans le surnageant cellulaire a été mesurée avec un kit de dosage immuno-enzymatique (ELISA) dirigé contre la protéine Ang-2 de souris (R&D Systems) selon

les instructions du fournisseur. La DO obtenue a été mesurée à l'aide du lecteur de plaques SPARCK® (Tecan Group Ltd).

IV.3 Immunocytofluorescence

Pour ces études, les cellules sontensemencées sur des lamelles de verre préalablement stérilisées. L'expérience terminée, les cellules sont rincées avec une solution de PBS puis fixées 20 min dans une solution de PFA 4 %. Après rinçages avec une solution de PBS, les cellules sont incubées 30 min dans une solution de saturation constituée de PBS-0,5 % de triton 100X (Sigma Aldrich)-0,1 % de tween (Sigma Aldrich)-3 % de *bovine serum albumin* (BSA, Sigma Aldrich). Les cellules sont ensuite placées à 4°C toute la nuit en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS-0,5 % triton 100X-0,1 % de tween-1 % de BSA. Après plusieurs rinçages, les cellules sont incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome en présence de Hoechst 33342 (10 µg/ml) dans une solution de PBS-0,5 % triton 100X-0,1 % de tween-1 % de BSA. Les cellules sont ensuite montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage Aqua-Poly/Mount (Tebu-Bio). Les anticorps utilisés sont listés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Anticorps primaires utilisés en immunocytofluorescence

Anticorps	Clones	Concentration	Fournisseurs	Références
CD68	FA-11	1 µg/ml	Abcam	Ab53444
Tie-2	Polyclonal	1 µg/ml	Santa cruz	sc-324
γH2AX (Ser139)	Polyclonal	0,5 µg/ml	Cell signaling	2577

IV.4 Immunohistofluorescence

Après décongélation, les lames supportant les coupes histologiques sont post-fixées pendant 20 min dans une solution de PFA 4 % à l'exception des lames destinées à la détection de l'hypoxie, où dans ce cas, les lames sont post-fixées pendant 10 min dans une solution d'acétone froid. Les lames sont ensuite rincées au PBS puis incubées pendant 2 h à température ambiante avec une solution de blocage composée de PBS-0,5 % de triton 100X-0,1 % de tween-3 % de BSA. Les coupes sont ensuite incubées à 4°C sur la nuit dans une solution de PBS-0,5 % de triton 100X-0,1 % de tween-1 % de BSA. Après rinçages au PBS-0,5 % de triton 100X-0,1 % de tween, les coupes sont incubées à température pendant 1h, en

présence de l'anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome et de Hoechst 33342 (10 µg/ml) dans une solution de PBS-0,5% de triton 100X-0,1% de tween-1% de BSA. Les lamelles sont ensuite montées sur les lames avec du milieu de montage Aqua-Poly/Mount. Les anticorps utilisés sont présentés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Anticorps primaires utilisés en immunohistofluorescence

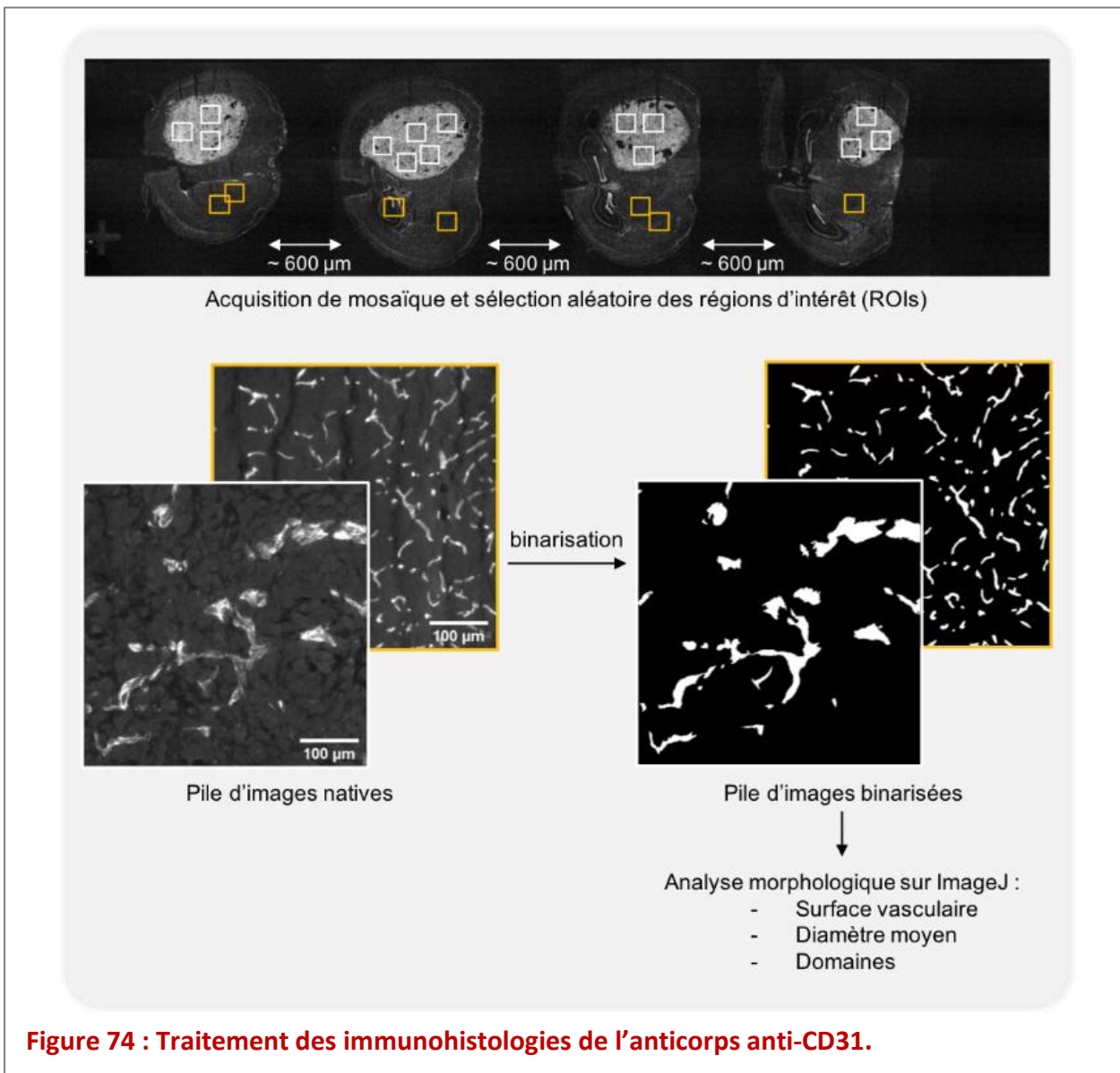
Anticorps	Clones	Concentration	Fournisseurs	Références
CD4	H129.19	1 µg/ml	BD Biosciences	550278
CD8	EPR21769	5 µg/ml	Abcam	Ab217344
CD31	MEC 13.3	5 µg/ml	BD Biosciences	553370
CD68	FA-11	1 µg/ml	Abcam	ab53444
Dylight™ 549 pimnidazole	4.3.11.1	60 µg/ml	Hypoxyprobe incorporation	HP7
Iba-1	Polyclonal	0,5 µg/ml	Abcam	ab5076
Tie-2 (vasculaire)	Polyclonal	1 µg/ml	R&D Systems	AF762
Tie-2 (non vasculaire)	Polyclonal	1 µg/ml	Santa Cruz	sc-324

V. Traitement de données

V.1 Acquisition et analyses d'images

Les photographies à différents grossissements ainsi que les mosaïques ont été réalisées sur un microscope à fluorescence DMI8S (Leica microsystems) avec le logiciel MetaMorph® et analysées avec le logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Concernant la quantification des immunomarquages CD4, CD8, CD68 et Iba-1, l'analyse des images a été réalisée à partir de régions d'intérêt (ROI) de 736 x 736 pixels soit 468 x 468 µm. Ainsi, plusieurs ROIs ont été choisies aléatoirement dans le tissu sain controlatérale et sur l'ensemble de la tumeur tout en excluant les zones de nécrose afin de ne quantifier que le tissu tumoral (**Figure 74**). Les images extraites sont ensuite binarisées sous ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) après l'application d'un seuil de détection du marquage. Les données obtenues représentent le pourcentage d'immunomarquage dans la ROI.

Concernant la quantification des vaisseaux, à partir des immunohistofluorescence CD31, celle-ci est réalisée à partir des ROIs, de façon automatique avec une macro développée sous ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) par l'équipe CERVOxy (Valable et al., 2009). L'analyse permet ainsi d'obtenir la densité vasculaire, le diamètre moyen des vaisseaux, ainsi que les domaines, qui représentent la distance au plus proche vaisseau.



V.2 Analyses statistiques

Toutes les données sont représentées sous forme de moyenne \pm écart type. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statistica® 13.5.0.17 (Tibco Software Inc). Les tests statistiques utilisés sont indiqués dans la légende des figures illustrant les résultats.

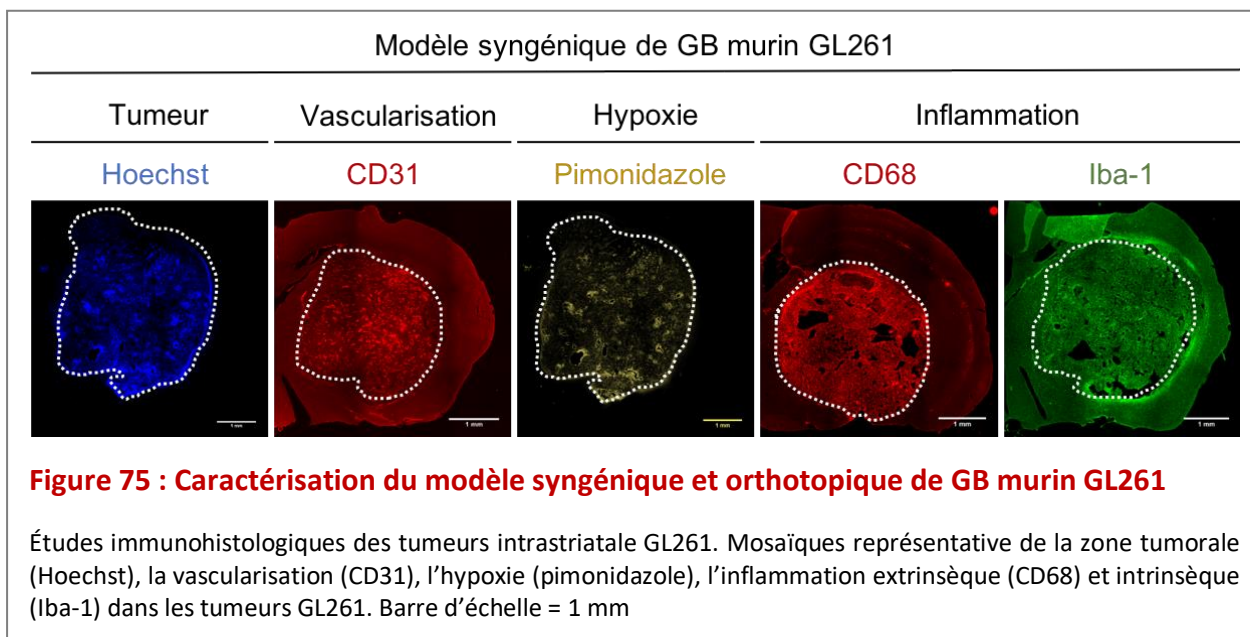
Résultats

Résultats

I. Étude de l'effet d'une surexpression d'Ang-2 sur le modèle syngénique de glioblastome murin, GL261

I.1 Caractérisation du modèle syngénique de glioblastome murin, GL261

L'objectif général de ce travail étant d'évaluer l'effet de l'Angiopoïétine-2 (Ang-2) sur les compartiments vasculaire et inflammatoire lors de la progression du glioblastome (GB) et en réponse au traitement de radiochimiothérapie (RCT), nous avons utilisé un modèle orthotopique de GB obtenu par injection intrastriatale de cellules GL261-wt chez la souris C57BL/6. Ce modèle préclinique est caractérisé dans la littérature et fréquemment utilisé du fait de son immunocompétence (Newcomb and Zagzag, 2009; Szatmári et al., 2006). Nous avons, dans un premier temps, vérifié que dans les conditions expérimentales utilisées lors de nos études, ce modèle de tumeur cérébrale récapitulait les principales caractéristiques des GB à savoir que ces tumeurs bien que très vascularisées, étaient hypoxiques, et que leur croissance s'accompagnait d'une réaction inflammatoire (Figure 75).



En clinique, les principales modalités d'imagerie utilisées pour le diagnostic des GB reposent sur l'utilisation d'une séquence FLAIR (*fluid attenuated inversion recovery*) mettant en évidence l'œdème tumoral, ainsi qu'une séquence T1 avec injection d'un agent de contraste à base de gadolinium (T1wGd) pour évaluer la perméabilité de la BHE, reflet de la présence d'une angiogenèse tumorale. A l'échelle préclinique, d'autres séquences d'IRM

peuvent être utilisées afin d'évaluer l'évolution de la croissance tumorale ainsi que certaines de ses caractéristiques, dont la vascularisation. Nous avons notamment choisi de suivre la progression tumorale en imagerie pondérée T2 (T2w), séquence d'imagerie qui permet d'appréhender des paramètres comparables à l'imagerie FLAIR utilisée en clinique. Grâce à cette séquence T2w, on peut ainsi déterminer le volume tumoral et selon les caractéristiques des modèles de tumeurs étudiés, il peut être mis en évidence l'œdème tumoral et la présence de nécrose. Ainsi, comme illustré sur la **Figure 76**, comparé au modèle de GB humain U251 (**Figure 76A**), les tumeurs issues de l'implantation des cellules GL261 ne présentent aucun œdème tumoral (**Figure 76A, flèche jaune**), mais tout comme les tumeurs U251, ces tumeurs présentent des zones de nécrose (**Figures 76A, B, flèches blanches**). Par ailleurs, grâce aux développements méthodologiques récents de l'IRM utilisant des nanoparticules d'oxydes de fer (P904), il est également possible d'appréhender la vascularisation tumorale et d'accéder ainsi à des données fonctionnelles des vaisseaux, comme le volume sanguin cérébral (VSC) et les hémorragies (**Figure 76C**) en utilisant une séquence T2* comparable à l'imagerie T1wGd pratiquée en clinique.

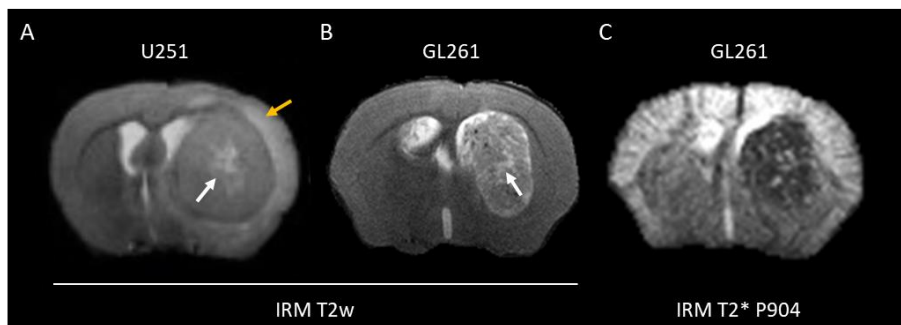


Figure 76 : Caractérisation des tumeurs par IRM

A et B : Aspects des tumeurs cérébrales U251 et GL261 en IRM pondérée en T2 (T2w). Sont indiqués les zones de nécrose (flèche blanche) et l'œdème tumorale (flèche jaune). **C** : Imagerie T2* de la vascularisation après injection d'agent de contraste (P904) dans le modèle de GB GL261.

Ces différentes séquences d'imagerie ont donc été utilisées au cours de cette étude afin d'analyser la progression des tumeurs GL261 ainsi que leur vascularisation.

Ces approches méthodologiques nous ont permis d'avoir une caractérisation du modèle de GB GL261, et de confirmer que ce modèle animal présente l'ensemble des caractéristiques des GB observées chez l'Homme. De plus, cette caractérisation de ce modèle de GB montre la pertinence du modèle d'étude choisi pour répondre à l'objectif de notre

première étude qui vise à évaluer l'effet d'un apport chronique d'Ang-2 sur la progression de la tumeur GL261 et sur son microenvironnement.

I.2 Validation et caractérisation de la surexpression de l'Ang-2 dans les cellules GL261

Afin d'étudier l'effet d'une surexpression d'Ang-2 sur la croissance des GB et de façon à se placer dans des conditions optimales d'apport de cette cytokine au niveau cérébral, nous avons choisi de faire surexprimer le gène de l'ANG-2 par les cellules tumorales elles-mêmes. Une transfection stable des cellules GL261 avec un plasmide contenant le gène de l'ANG-2 de souris a été réalisée. Ces cellules ont été dénommées GL261-Ang2 et l'effet biologique de l'Ang-2 sécrétée par les cellules tumorales sera comparé à celui observé avec les cellules GL261 contrôles (GL261-wt).

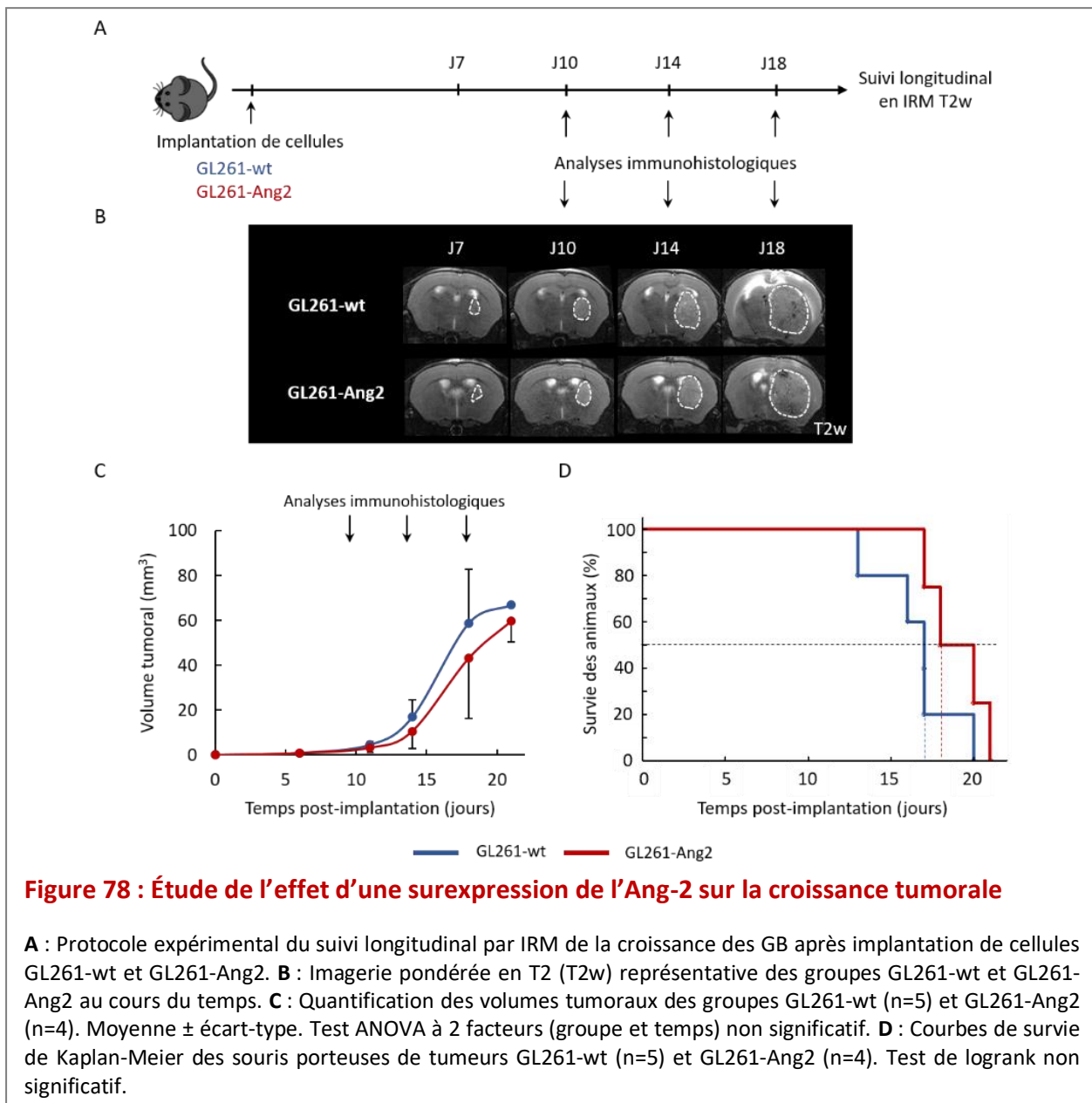
La bonne intégration de l'ADNc de l'Ang-2 dans le vecteur d'expression pCMV6-K/N-Ang2 a été préalablement vérifiée après séquençage de ce dernier par la société GenoScreen. Les résultats de ce séquençage Sanger indiquent une homologie de 95 % entre la séquence intégrée dans le plasmide et le gène murin de l'ANG-2 (**Figure 77A**).

Le plasmide pCMV6-K/N-Ang2 étant couplé au gène de résistance à la néomycine (G-418), les cellules ayant incorporé le plasmide ont été sélectionnées par la concentration efficace de cet antibiotique (400 µg/ml) préalablement établie.

L'analyse transcriptomique de l'Ang-2 pour les cellules GL261 a permis d'établir qu'après transfection, les cellules GL261-Ang2 expriment environ 200 fois plus d'ARNm d'Ang-2 que les cellules GL261-wt, pour lesquelles de façon attendue, l'expression constitutive de l'Ang-2 est très faible (**Figure 77B**). Ces résultats ont également été retrouvés au niveau protéique en dosant par un test ELISA la quantité d'Ang-2 dans le surnageant des cellules (**Figure 77C**). En effet, les cellules modifiées génétiquement sécrètent la protéine Ang-2 dans le milieu de culture à une concentration de $1,185 \pm 30$ ng/ml après 48 h de culture alors que la sensibilité du dosage ELISA n'a pas permis de détecter d'Ang-2 dans le milieu de culture des cellules contrôles, confirmant les résultats de transcriptomique (**Figure 77C**).

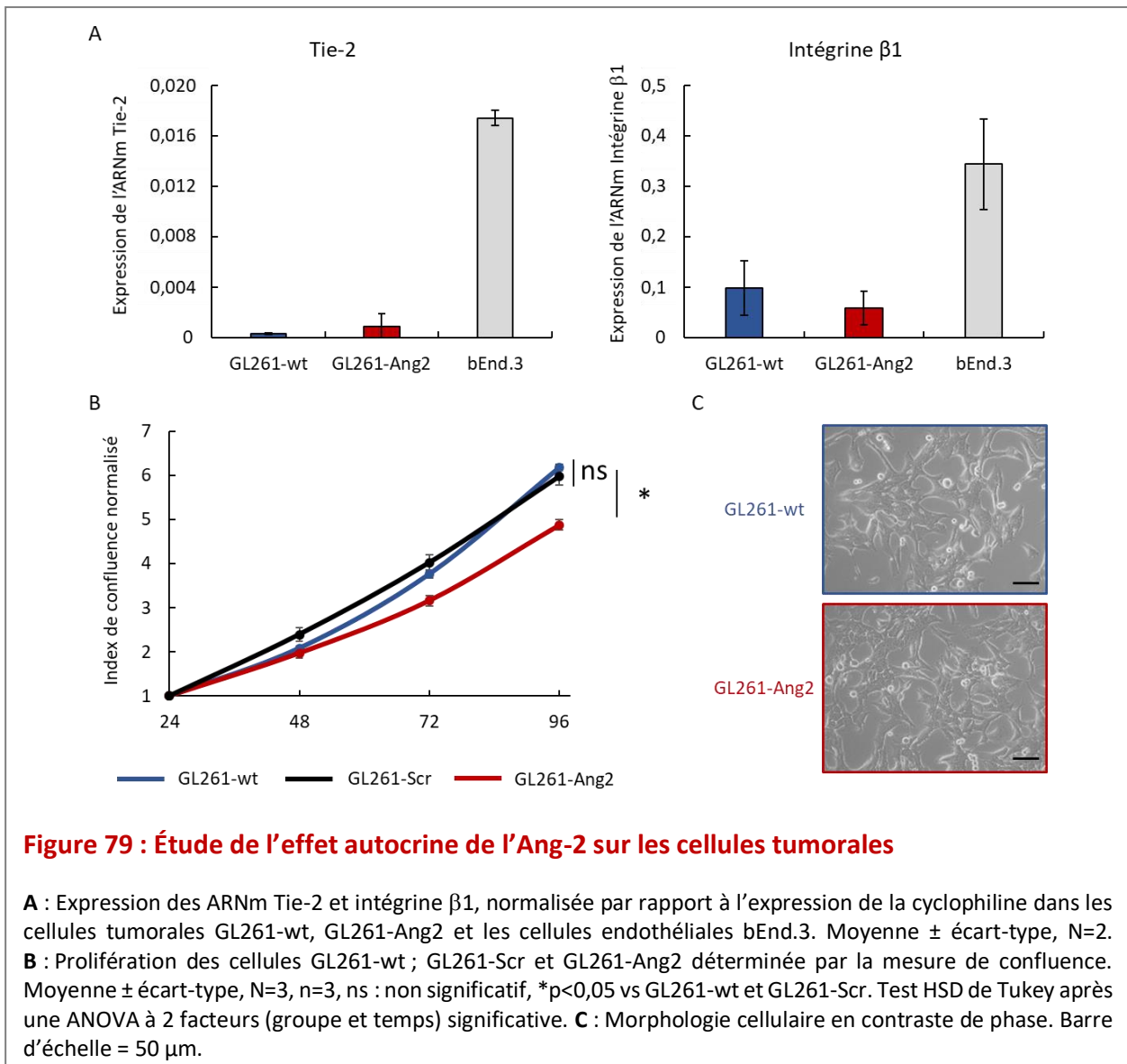
A partir des données d'imagerie (**Figure 78B**), l'analyse quantitative du volume tumoral confirme que la surexpression de l'Ang-2 ne modifie pas la croissance de la tumeur ($p=0,11$) (**Figure 78C**). Par ailleurs, aucune différence en termes de plages de nécrose et d'œdème tumoral n'est observée entre ces deux types de tumeurs (**Figure 78B**)

En accord avec les données de volume tumoral (**Figure 78C**), les deux groupes d'animaux présentent une médiane de survie quasi identique, puisque celle-ci est de 17 jours pour les tumeurs GL261-wt et de 18 jours pour le groupe GL261-Ang2 ($p=0,19$) (**Figure 78D**). Cette médiane de survie correspond à celle habituellement décrite dans la littérature pour ce modèle (Klopper et al., 2016; Peterson et al., 2016).



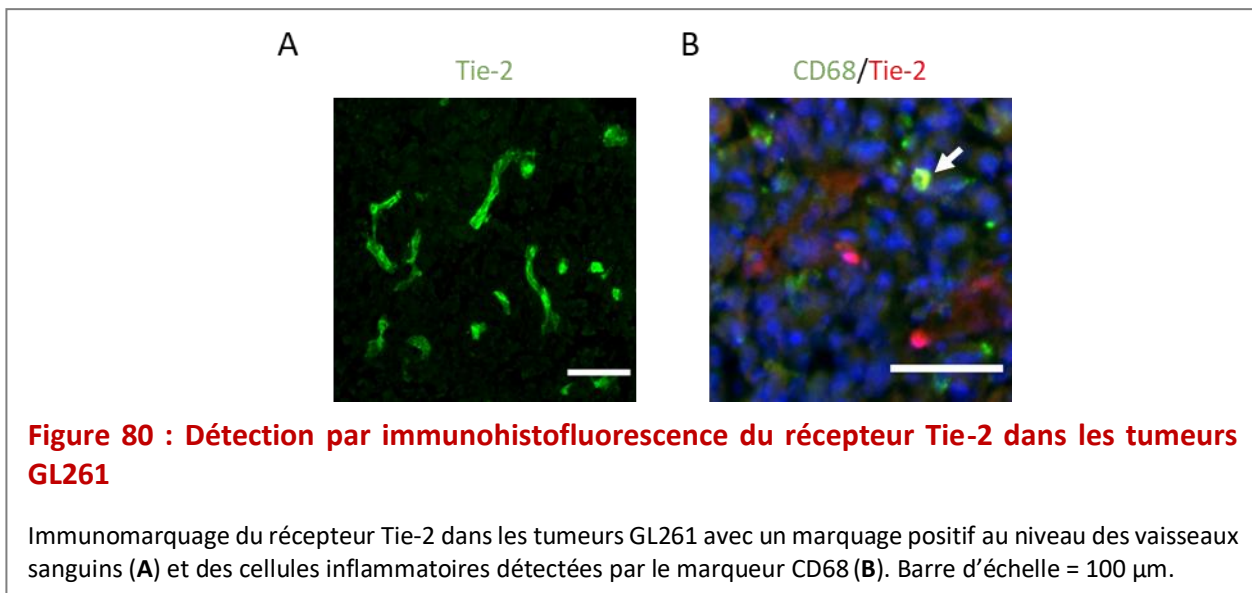
I.3.2 Étude *in vitro*

Historiquement, l'effet biologique de l'Ang-2 était, dans les premières années suivant la découverte de ce facteur, attribué strictement au compartiment vasculaire. Depuis, d'autres études ont élargi son spectre d'action, montrant que l'Ang-2 pouvait exercer des effets autocrines et paracrines ; ces effets étant relayés par le récepteur Tie-2 ou l'intégrine $\beta 1$ (Kawashima et al., 2019; Marteau et al., 2013). Dans un contexte tumoral, l'équipe CERVOxy a notamment montré que les cellules de GB de rat 9L possédaient le récepteur Tie-2 (Valable et al., 2009). Pour les cellules de GB GL261-wt et GL261-Ang2, nous avons retrouvé, au niveau transcriptomique, une expression des ARNm du récepteur Tie-2 et de l'intégrine $\beta 1$. Toutefois ces récepteurs sont plus faiblement exprimés que sur les cellules de la lignée endothéliale bEnd.3 (Figure 79A).



La présence de ces récepteurs sur les cellules tumorales permet donc d'envisager un effet autocrine de l'Ang-2. Dans ce but, nous avons comparé les courbes de prolifération des cellules GL261-Ang2 à celles des cellules GL261-wt ou GL261-Scr (**Figure 79B**). Les résultats présentés sur la **Figure 79**, suggèrent que l'Ang-2 pourrait exercer un léger ralentissement de la prolifération de ces cellules tumorales ($p < 0,05$) alors qu'aucune différence de prolifération n'est détectée entre les cellules GL261-wt et GL261-Scr ($p = 0,24$). Par ailleurs, la surexpression de l'Ang-2 par les cellules tumorales GL261 n'induit pas de perturbations morphologiques des cellules de GB (**Figure 79C**)

Les résultats de la prolifération cellulaire observé *in vitro*, n'étant pas retrouvé *in vivo* (croissance tumorale et survie), il peut être suggéré que l'Ang-2 exerce un effet sur la tumeur qui « contrecarre » l'effet autocrine observé sur les cellules GL261. Dans ce sens, nous avons vérifié l'expression du récepteur Tie-2 sur le compartiments vasculaire (**Figure 80A**) et inflammatoire (**Figure 80B**). En effet, comme illustré sur la **Figure 80A**, l'immunomarquage Tie-2⁺ révèle un aspect tubulaire semblable au vaisseaux tumoraux alors que la **Figure 80B** indique la présence dans la tumeur de cellules inflammatoires CD68⁺/Tie-2⁺.



Ainsi, la mise en évidence du récepteur Tie-2 sur les vaisseaux sanguins et sur les cellules CD68⁺, nous a amené à évaluer les effets paracrines de l'Ang-2 qui pourrait s'exercer sur les compartiments vasculaire et inflammatoire.

I.4 Étude de la surexpression de l'Ang-2 sur le compartiment vasculaire

I.4.1 Analyse de vascularisation tumorale par immunohistologie

L'effet paracrine de l'Ang-2 sur le compartiment vasculaire a été étudiée par immunohistologie pour les deux groupes d'animaux (GL261-wt et GL261-Ang2) aux temps J10, J14 et J18 qui correspondent aux différentes phases de croissance tumorale : respectivement l'initiation, la phase exponentielle et la phase terminale (**Figure 78C**).

I.4.1.1 Étude descriptive de la vascularisation tumorale

Pour les tumeurs GL261-wt (**Figure 81A**), sur le plan morphologique, nous retrouvons la présence de vaisseaux dont les caractéristiques correspondent à celles décrites dans la littérature (**Fukumura et al., 2010**). En effet, comparativement aux vaisseaux du tissu sain, les vaisseaux de ces tumeurs présentent une organisation anarchique, avec des structures vasculaires désorganisées, tortueuses et de diamètre important et ce de la phase précoce de la croissance tumorale (J10) à la phase terminale (J18). Par comparaison à ces tumeurs contrôles, aucune différence de morphologie des vaisseaux n'a été observée dans les tumeurs GL261-Ang2 lors de la progression tumorale. Toutefois, l'examen de l'immunomarquage CD31 révèle à J10 et J14 que les tumeurs GL261-Ang2 semblent plus vascularisées que les tumeurs contrôles. En revanche à J18, on observe un effet inverse avec des tumeurs GL261-Ang2 qui s'avèrent moins dense en vaisseaux tumoraux par comparaison au groupe contrôles.

Afin de mieux appréhender certains paramètres de la vascularisation tumorale, cette étude descriptive a été complétée par des analyses quantitatives permettant d'évaluer le diamètre moyen des vaisseaux (**Figure 81B**), la surface vasculaire (qui peut être extrapolée à la densité vasculaire) (**Figure 81C**), ainsi que les domaines vasculaires (**Figure 81D**).

I.4.1.2 Étude quantitative de la vascularisation tumorale

- ***Diamètre des vaisseaux***

Les vaisseaux tumoraux sont souvent décrits comme des structures lâches et plus larges que ceux d'un tissu sain (**Fukumura et al., 2010**). En accord avec les données de la littérature, les mesures obtenues pour les deux groupes de tumeurs montrent que le diamètre moyen des vaisseaux est environ 2,5 fois plus important que celui des vaisseaux de l'hémisphère controlatéral sain ; ces vaisseaux possédant un diamètre de l'ordre de 6 µm

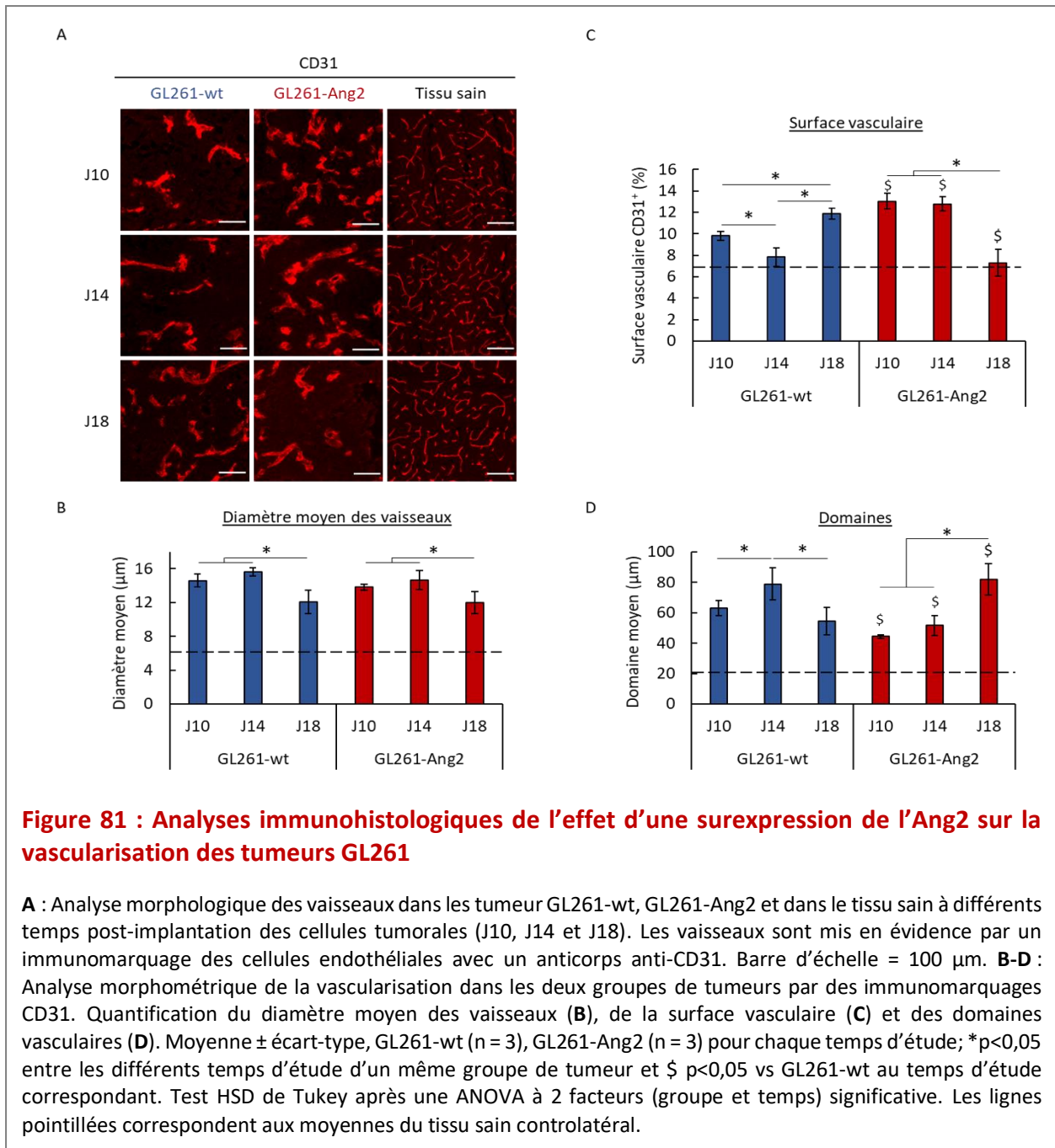
correspondant à un diamètre de capillaires (**Figure 81B**). Le diamètre moyen des vaisseaux reste sensiblement équivalent lors du développement tumoral avec toutefois une légère diminution au temps J18 ($p < 0,05$), remarquée dans les 2 groupes de tumeur (**Figure 81B**).

- **Surface vasculaire**

Si le diamètre des vaisseaux tumoraux demeure relativement constant au cours de la croissance tumorale, la densité vasculaire en revanche évolue. Pour les tumeurs GL261-wt, l'augmentation de la densité vasculaire est détectable dès 10 jours de croissance tumorale ($9,80 \pm 0,43$ %) et celle-ci est d'autant plus importante au temps terminal J18 ($11,86 \pm 0,16$ %) ($p < 0,05$) par rapport au tissu sain ($6,71 \pm 0,43$ %) (**Figure 81C**). Comme décrit dans l'étude descriptive, la densité vasculaire des tumeurs GL261-Ang2 semble évoluer en sens inverse de celle des tumeurs contrôles. En effet, la surface vasculaire des tumeurs GL261-Ang2 est plus importante au temps J10 et J14 ($13,02 \pm 0,72$ % et $12,79 \pm 0,68$ %) par comparaison au groupe GL261-wt ($9,80 \pm 0,43$ % et $7,83 \pm 0,86$ %) ($p < 0,05$) (**Figure 81C**). En revanche, une régression vasculaire est observée au temps terminal. Ainsi, à J18, les deux tumeurs se différencient par leur densité vasculaire avec pour les GL261-Ang2 une valeur de $7,29 \pm 0,70$ % versus $11,86 \pm 0,16$ % pour les tumeurs contrôles ($p < 0,05$).

- **Les domaines vasculaires**

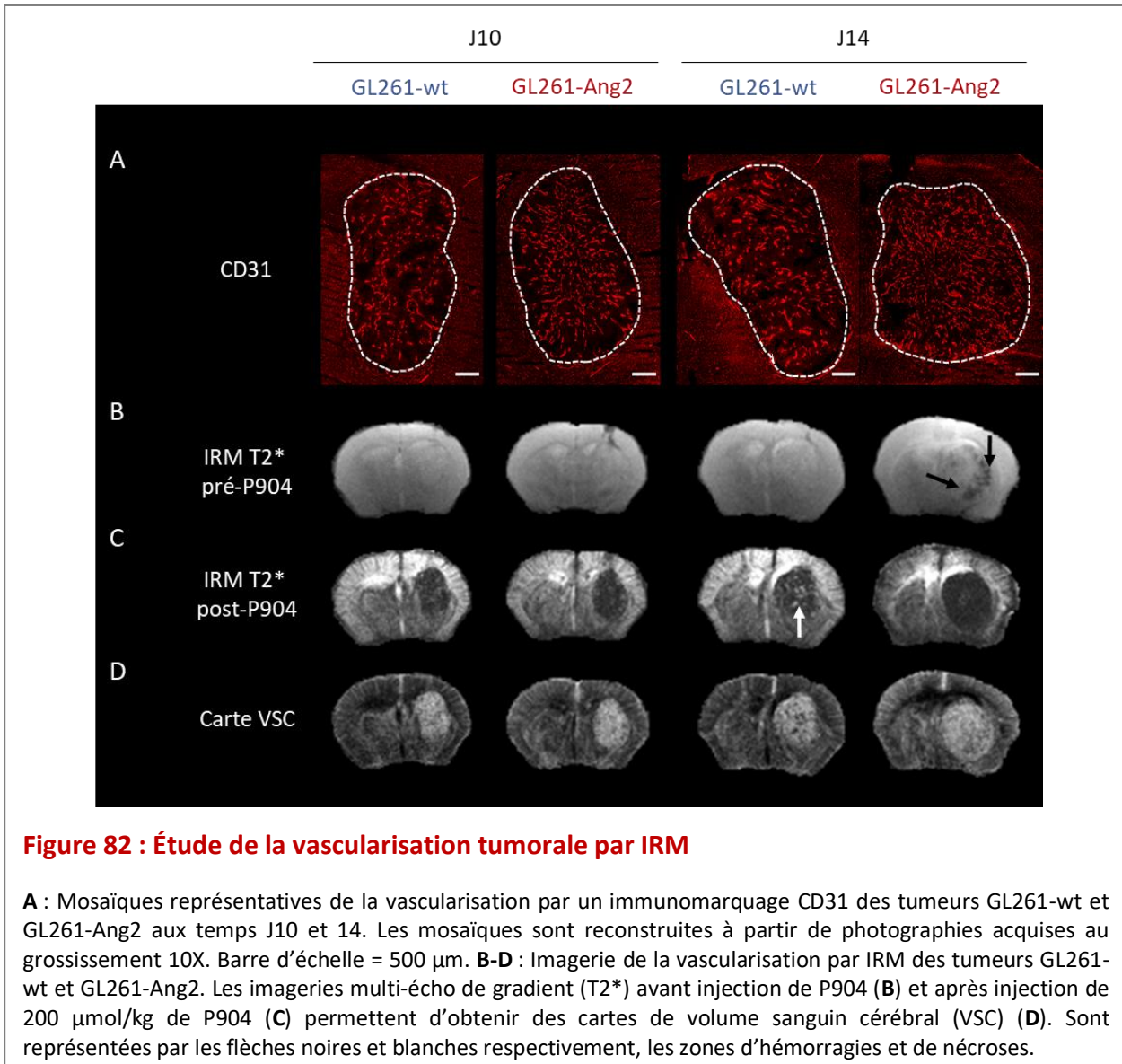
Les domaines correspondent à la distance au plus proche vaisseau. Les données obtenues montrent que dans l'hémisphère sain, les vaisseaux sont très proches les uns des autres avec une distance moyenne de $21,32 \pm 1,19$ μm (**Figure 81C**). En revanche, dans le tissu tumoral, à J10 et J14, cette distance augmente de 2 à 4 fois par rapport au tissu sain et ce pour les 2 groupes d'animaux, avec un effet plus marqué pour les tumeurs GL261-wt ($62,92 \pm 4,82$ μm et $78,95 \pm 10,76$ μm) par rapport aux tumeurs GL261-Ang2 ($44,40 \pm 1,26$ μm et $51,64 \pm 6,51$ μm) ($p < 0,05$) (**Figure 81D**). Toutefois, au temps terminal J18, en accord avec la régression vasculaire observée (**Figures 81A, C**), la distance au plus proche vaisseau est plus importante dans le groupe GL261-Ang2 ($81,81 \pm 10,30$ μm) par comparaison au groupe GL261-wt ($54,58 \pm 8,94$ μm) ($p < 0,05$) (**Figure 81D**).



I.4.2 Analyse de la vascularisation tumorale par IRM

De façon à renforcer ces résultats obtenus avec les analyses immunohistologiques, nous avons réalisé une expérience complémentaire en IRM afin de caractériser les propriétés hémodynamiques de cette vascularisation (**Figure 82**). L'IRM vasculaire consiste à administrer en bolus intraveineux, un agent de contraste, dans cette étude le P904, dont l'effet est de modifier les propriétés magnétiques des molécules d'eau présentes à proximité des vaisseaux. Cet agent de contraste (composé de particules de fer) a un poids moléculaire et une

rémanence vasculaire élevés. Sur ces propriétés, il est possible d’obtenir une mesure du volume sanguin cérébral (VSC), à partir des modifications du contraste, obtenues entre l’image réalisée avant (**Figure 82B**) et après (**Figure 82C**) injection du P904 en imagerie T2* (séquence d’imagerie rapide en multi écho de gradient).



Les mosaïques issues de l’étude immunohistologique (**Figure 82A**) illustrent le statut de la vascularisation pour chacun des groupes de tumeurs aux temps J10 et J14 de la croissance tumorale. L’imagerie IRM T2* pré-P904 montre dans le groupe GL261-Ang2 à J14, des zones en hyposignal qui reflètent la présence de fer, et cela en absence de produit de contraste. Cette présence de fer endogène traduit l’existence d’une hémorragie au sein de la

tumeur (**Figure 82B**, flèches noir). Toutefois, comme le révèlent les imageries T2* post-P904 réalisées aux temps J10 et J14 (**Figure 82C**), quel que soit le groupe considéré, les vaisseaux tumoraux semblent perfusés puisqu'un hyposignal T2* est observé dans la tumeur suite à l'injection de l'agent de contraste, à l'exception des zones de nécroses, apparaissant en blanc sur l'image (**Figure 82C**, flèche blanche). Bien que les cartes de VSC puissent être générées en comparant les cartes T2* avant et après injection de P904 (**Figure 82D**), les résultats sont difficilement interprétables notamment pour les tumeurs GL261-Ang2 pour lesquelles la croissance tumorale est accompagnée d'une hémorragie intratumorale.

Collectivement, ces données montrent que l'Ang-2 exerce un effet sur le compartiment vasculaire au cours de la progression tumorale se traduisant lors des phases initiales de la croissance tumorale, par une augmentation de la densité vasculaire. Toutefois ces vaisseaux présentent des structures élargies (J10, J14) et peuvent s'accompagner d'une hémorragie (J14) ; cette phase est ensuite suivie d'une régression vasculaire au temps terminal comme en témoignent la diminution de la surface vasculaire et l'augmentation des domaines vasculaires. Une conséquence physiologique de cette modification pourrait être une limitation des échanges gazeux avec les cellules tumorales. C'est pourquoi, nous avons par la suite étudié si ces modifications vasculaires pouvaient entraîner l'apparition de régions tumorales hypoxiques. Pour répondre à cette question, les animaux ont été injectés par voie intrapéritonéale avec une solution de pimonidazole, marqueur exogène de l'hypoxie, qui sera séquestré uniquement dans les cellules en hypoxie. Comme le montre la **Figure 83**, au temps J18, une hypoxie tumorale est retrouvée pour les deux groupes d'animaux mais plus présente encore au sein de la tumeur GL261-Ang2 pour laquelle les zones d'hypoxie se répartissent de façon homogène dans la tumeur. En accord avec les résultats pour la vascularisation, on retrouve une relation entre la diminution de la surface vasculaire (**Figure 81C**), l'augmentation des domaines vasculaires (**Figures 81D**) et l'apparition de zones d'hypoxie tumorale (**Figure 83**) est observée.

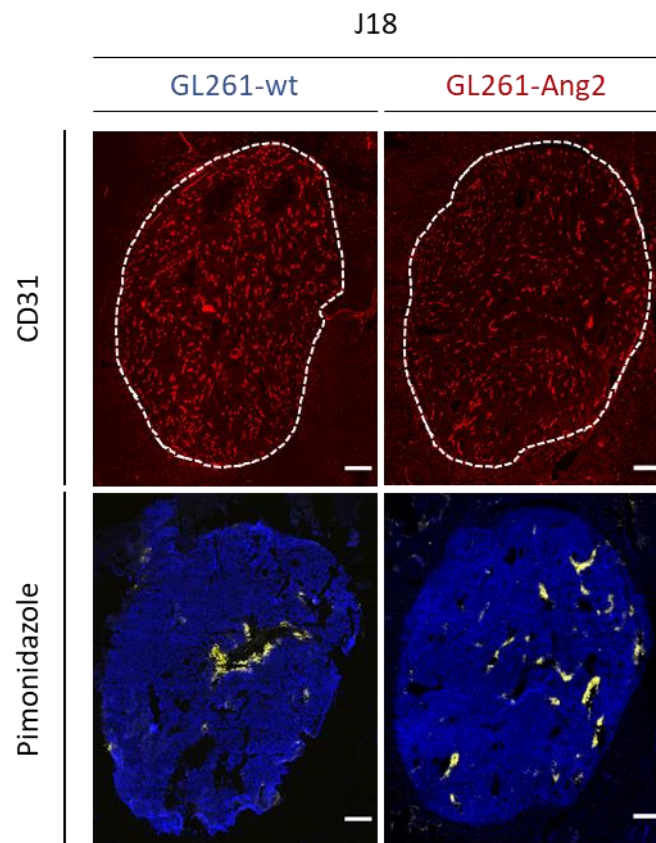


Figure 83 : Détection par immunohistologie des régions tumorales hypoxiques, 18 jours après l'implantation des cellules tumorales

Mosaïques représentative de la vascularisation (CD31) et de l'hypoxie (pimonidazole) pour les groupes de tumeurs GL261-wt et GL261-Ang2 au temps J18. Les mosaïques sont reconstruites à partir de photographies acquises au grossissement 10X. Barre d'échelle = 500 μ m

En résumé, ces résultats suggèrent un effet paracrine de l'Ang-2 sécrétée par les cellules tumorales sur le compartiment vasculaire conduisant dans les premiers temps à une augmentation de la densité vasculaire alors qu'aucune différence de croissance tumorale n'est observée entre les deux groupes d'animaux.

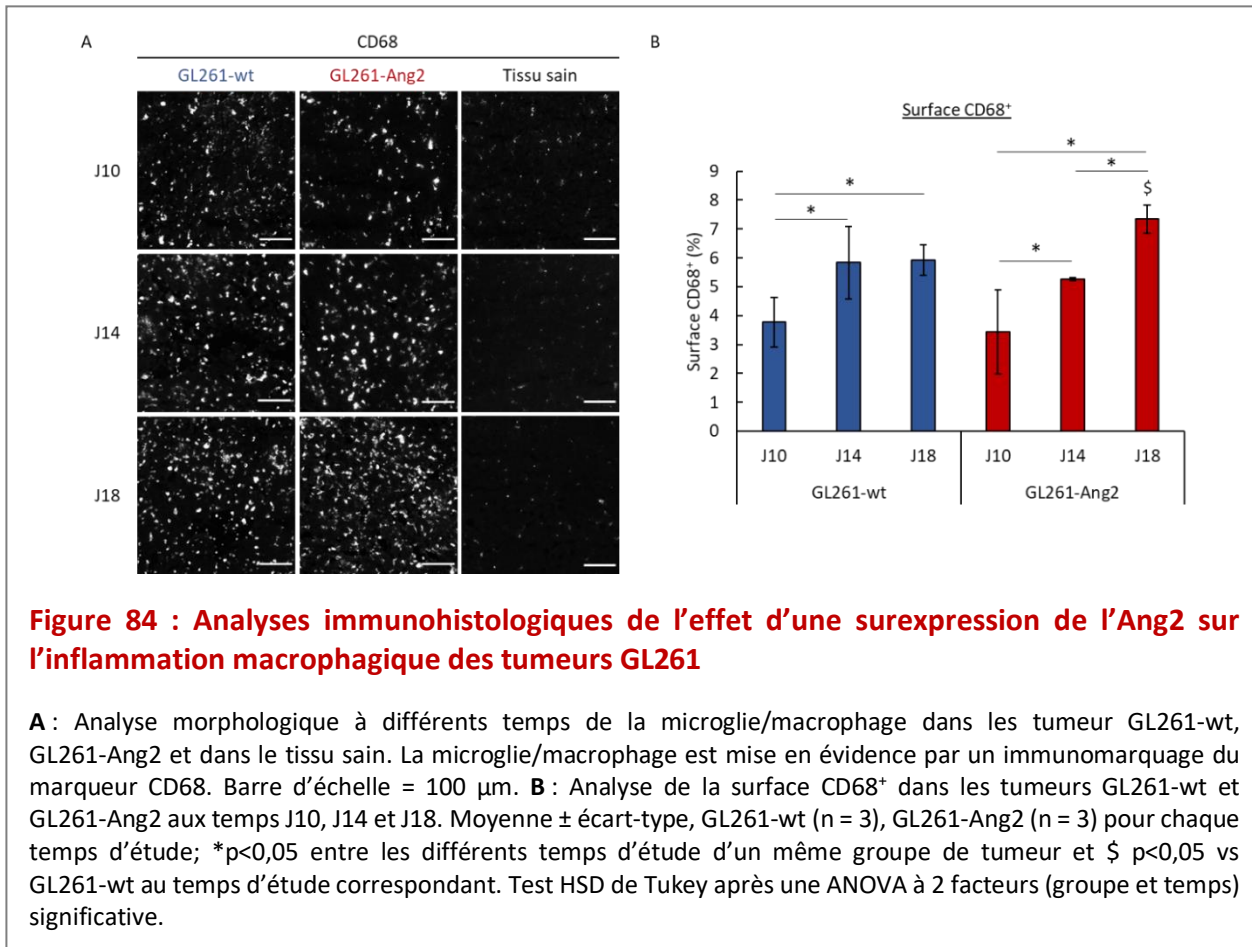
Nous nous sommes ensuite attachés à déterminer si l'Ang-2 pouvait exercer un effet paracrine sur l'inflammation tumorale comme pourrait le suggérer la présence du récepteur Tie-2 sur les cellules de l'inflammation CD68⁺ (**Figure 80B**).

I.5 Étude de la surexpression de l'Ang-2 sur le compartiment inflammatoire

Dans les GB, les macrophages représentent une part importante du compartiment inflammatoire au sein du microenvironnement tumoral et ces cellules exercent un rôle non

négligeable dans la progression de ces tumeurs (Carvalho da Fonseca and Badie, 2013; Hambardzumyan et al., 2016). C'est pourquoi, dans cette étude, nous nous sommes focalisés particulièrement sur les macrophages. L'inflammation tumorale a donc été étudiée par un immunomarquage des cellules CD68⁺ sur les coupes histologiques de cerveau des animaux GL261-wt et GL261-Ang2, et ce pour les temps préalablement définis lors de l'étude du compartiment vasculaire, à savoir J10, J14 et J18 post-implantation des cellules tumorales (**Figure 79**). Ce marquage CD68 permet de détecter non seulement la présence de macrophages issus de la circulation mais aussi la microglie.

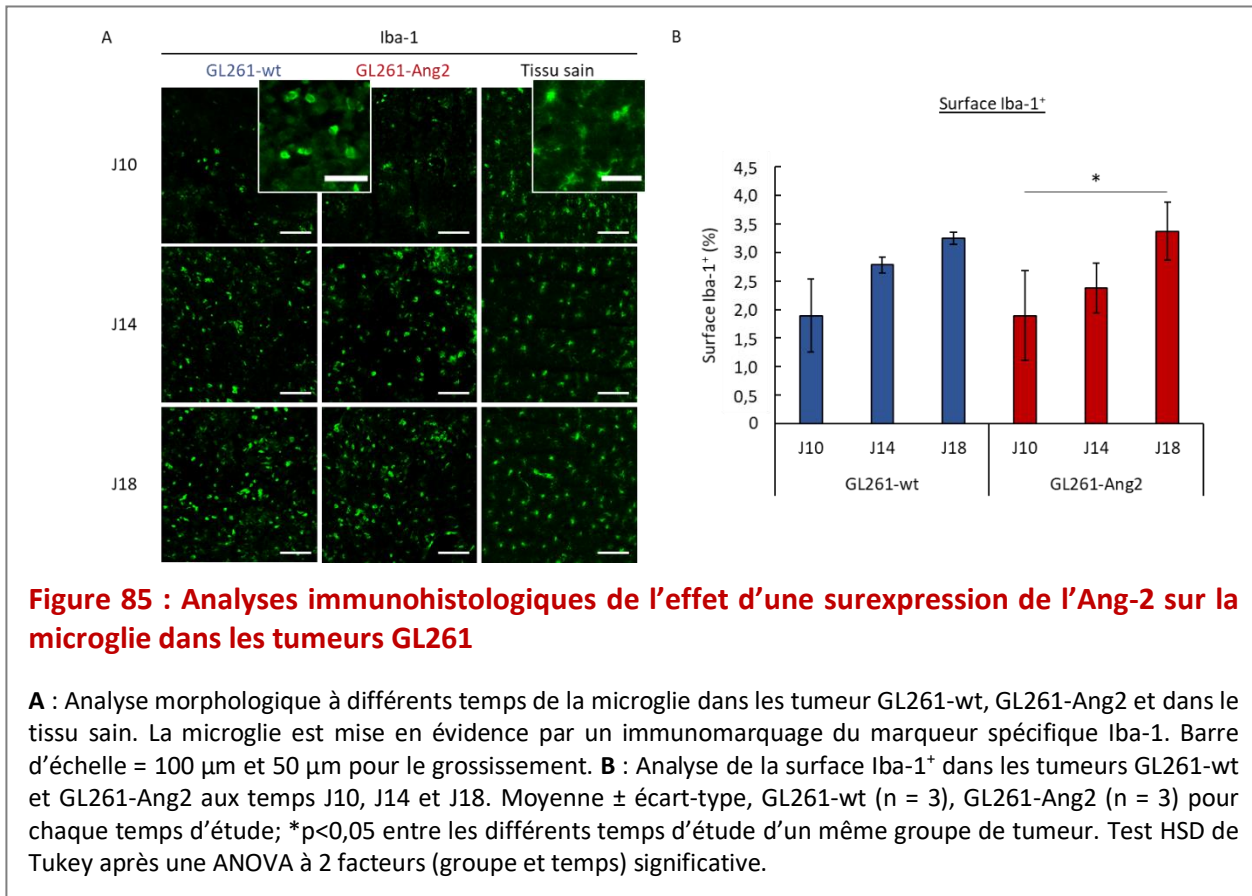
Comme le montre la **Figure 84A**, la présence de cellules CD68⁺, de morphologie ronde et amiboïde, est détectable dès J10 et ce pour les deux groupes de tumeurs alors qu'aucun marquage n'est observé dans le tissu sain. L'immunomarquage est d'autant plus présent que la tumeur se développe. Ces observations sont confirmées par l'analyse quantitative de l'immunomarquage CD68 (**Figure 84B**). Pour les tumeurs GL261-wt, une augmentation significative du marquage CD68 est observée entre le temps J10 et J14 avec une proportion de marquage représentant à J10 : $3,77 \pm 0,85$ % et à J14 : $5,83 \pm 1,25$ % ($p < 0,05$). Puis, cette inflammation ne semble plus évoluer au temps J18 : $5,92 \pm 0,53$ %. En ce qui concerne le groupe GL261-Ang2, des résultats similaires aux tumeurs contrôles sont observés à J10 et J14 avec respectivement $3,42 \pm 0,47$ % et $5,26 \pm 0,36$ % d'immunomarquage CD68⁺ dans la tumeur. Cependant, contrairement au groupe GL261-wt, au temps J18, la surface CD68⁺ continue d'évoluer avec $7,34 \pm 0,49$ % versus $5,92 \pm 0,53$ % au temps J14 ($p < 0,05$) (**Figure 84B**).



Nous avons, en parallèle, recherché quelle était la contribution de la microglie dans cette réponse inflammatoire en réalisant un immunomarquage du marqueur Iba-1, considéré comme spécifique de ces cellules microgliales. Dans la tumeur, les cellules Iba-1⁺ adoptent une morphologie amiboïde, typique de l'activation microgliale et distincte de la microglie Iba-1⁺ présente dans le tissu sain cérébral, laquelle apparaît sous une forme ramifiée caractéristique de la microglie au repos (**Figure 85A**).

D'un point de vue quantitatif, l'immunomarquage Iba-1 dans le groupe GL261-wt révèle, tout comme pour le marqueur CD68, une augmentation du marquage lors de la croissance tumorale. En effet, nous observons aux temps J10, J14 et J18 une proportion de cellules Iba-1⁺ dans la tumeur allant respectivement de 1,89 \pm 0,64 %, 2,78 \pm 0,13 % à 3,25 \pm 0,10 % dans les tumeurs GL261-wt (**Figure 85B**). Pour le groupe GL261-Ang2, les résultats obtenus ne témoignent d'aucune différence significative ($p=0,71$) avec le groupe contrôle comme en témoigne la proportion de cellules Iba-1⁺ quantifiées dans les tumeurs

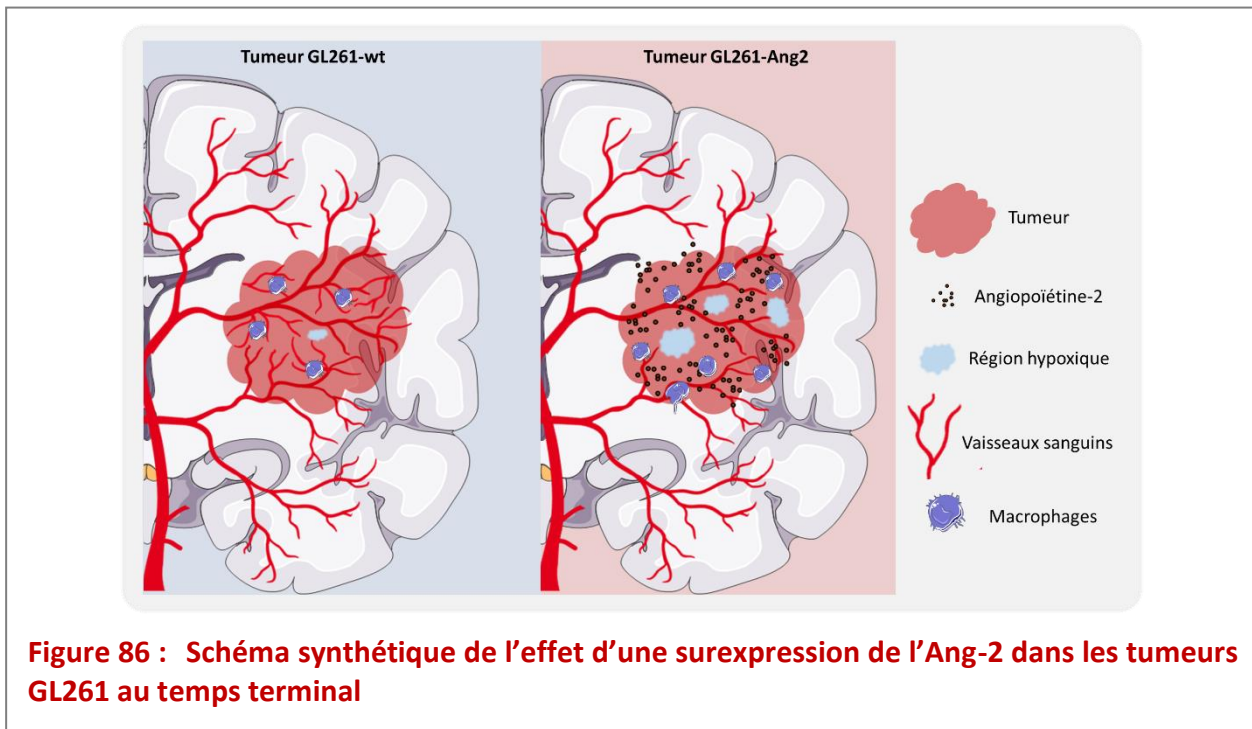
surexprimant l'Ang-2, à savoir $1,89 \pm 0,78 \%$, $2,37 \pm 0,44 \%$ et $3,37 \pm 0,51 \%$ respectivement aux temps J10, J14 et J18 respectivement (**Figure 85B**).



Ainsi, la population de cellules microgliales Iba-1⁺ présente dans la masse tumorale évolue de façon similaire entre les tumeurs issues des cellules GL261-Ang2 et GL261-wt, alors que les cellules CD68⁺ sont plus nombreuses au temps terminal de la croissance des tumeurs GL261-Ang2 (augmentation de 24 % par comparaison au groupe GL261-wt). Il existe donc une population plus importante de cellules CD68⁺ et Iba-1⁺, qui peut être considérée comme des macrophages, dans le groupe de tumeur GL261-Ang2, suggérant que ces tumeurs ont facilité le recrutement de ces cellules inflammatoires.

I.6 Conclusion/Discussion

Cette première partie réalisée sur le modèle de GB murin GL261, avait pour objectif d'étudier l'impact de l'Ang-2 sur la croissance tumorale. Les principaux résultats résumés sur le schéma présenté sur la **Figure 86** montrent qu'en fin de croissance, les tumeurs GL261-Ang2 sont moins vascularisées, plus hypoxiques, plus inflammatoires que les tumeurs contrôles. Toutefois, les tumeurs présentent des volumes équivalents et la survie des animaux est quasi identique aux animaux porteurs d'une tumeur GL261-wt.



Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe de Reiss ([Scholz et al., 2016](#)) sur le même modèle de tumeur mais pour lequel, l'Ang-2 était surexprimée au niveau endothélial. Dans ce modèle, la surexpression de l'Ang-2 induit également une régression des vaisseaux dans la tumeur et une infiltration macrophagique sans toutefois modifier la survie des animaux modifiés génétiquement par comparaison aux animaux porteur d'une tumeur implantée chez des souris sauvages.

Bien que nous n'ayons pas vérifié le niveau d'expression de l'Ang-2 au cours de la croissance tumorale, nos résultats obtenus *in vitro* suggèrent que les cellules tumorales modifiées génétiquement sont capables de sécréter la protéine Ang-2. Par ailleurs, sur ce modèle, nous avons également montré qu'outre les cellules tumorales qui expriment au

niveau transcriptomique les ARNm des récepteurs Tie-2 et intégrine $\beta 1$, les vaisseaux sanguins et les cellules inflammatoires CD68⁺ possédaient le récepteur à l'Ang-2, Tie-2. Ces résultats suggèrent que l'Ang-2 sécrétée pourrait alors exercer un effet autocrine et/ou paracrine direct ou indirect par le biais d'intermédiaires moléculaires.

L'effet autocrine de l'Ang-2 sur les cellules GL261 n'a pas été clairement établi. En effet, nos résultats montrent *in vitro* un ralentissement de la prolifération des cellules tumorales GL261-Ang2, effet qui n'a pas été retrouvé *in vivo*. Les effets de l'Ang-2 sur la prolifération des cellules n'étant pas retrouvés *in vivo*, nous n'avons pas cherché à approfondir l'effet autocrine de l'Ang-2 sur les cellules tumorales. À l'inverse, une étude réalisée antérieurement au laboratoire par Valable et al., avait montré sur un modèle murin de gliosarcome 9L, que ces cellules modifiées génétiquement pour surexprimer l'Ang-2 de façon stable avaient un taux de prolifération similaire aux cellules 9L contrôles. Toutefois, les tumeurs 9L-Ang2 développaient des tumeurs de plus faible volume et vivaient plus longtemps que les animaux porteurs de tumeurs contrôles (Valable et al., 2009). En accord avec cette étude, nous avons proposé que, comme pour les tumeurs 9L, dans les tumeurs GL261, l'Ang-2 exerçait plutôt un effet paracrine : l'Ang-2 étant un facteur angiogénique immunomodulateur, nous avons étudié le devenir des compartiments vasculaires et inflammatoire suite à une implantation orthotopique de cellules GL261-wt et GL261-Ang2.

Selon nos résultats, durant la phase de croissance, les tumeurs GL261-Ang2 bénéficient d'un réseau vasculaire plus dense que les tumeurs contrôles. Ces vaisseaux arborent les caractéristiques des vaisseaux tumoraux : par comparaison aux vaisseaux du tissu sain, ce sont des structures courtes mais élargies avec de gros diamètre. De plus, comme nous l'avons montré par une analyse en IRM, ces vaisseaux semblent fonctionnels puisque nous avons observé une perfusion sanguine lors de l'injection de l'agent de contraste P904.

Plusieurs hypothèses pourraient être évoquées afin de réconcilier ces résultats. Tout d'abord, bien que l'Ang-2 soit plutôt décrite comme un facteur angiogénique qui conduit à une déstabilisation des vaisseaux, certains auteurs suggèrent que l'Ang-2 pourrait également exercer des effets anti-apoptotiques vis-à-vis des cellules endothéliales en conditions de stress (Daly et al., 2006). Une seconde hypothèse permettant d'interpréter ces résultats serait de proposer un équilibre dans la biodisponibilité de l'Ang-2 et du VEGF. Rappelons qu'en

présence de VEGF, l'Ang-2 aura un effet pro-angiogénique (Holash et al., 1999; Mandriota and Pepper, 1998; Yancopoulos et al., 2000). Afin de confirmer cette hypothèse, notre étude devrait être complétée par une analyse moléculaire réalisée en cinétique afin de déterminer les niveaux d'expression des différents facteurs angiogéniques comme l'Ang-1, l'Ang-2 et le VEGF. En effet, l'Ang-2 est l'antagoniste naturel de l'Ang-1 et ce couple de cytokines répond à un équilibre pour lequel, au niveau tumoral, le rapport Ang-1/Ang-2 est un reflet du degré d'angiogenèse active ; un rapport faible illustrant une instabilité vasculaire et une meilleure accessibilité du VEGF-R (Reiss et al., 2005; Tait and Jones, 2004). Il aurait ainsi été pertinent d'étudier si l'augmentation de la densité vasculaire était la conséquence d'un processus angiogénique.

Toutefois, cet effet bénéfique sur la vascularisation n'est que transitoire puisqu'au point terminal de notre étude prenant en compte le bien-être de l'animal, les vaisseaux de la tumeur régressent. Ce résultat a été également observé par Scholz et al., sur le modèle GL261, mais aussi par Valable et al., sur le modèle 9L (Scholz et al., 2016; Valable et al., 2009). Cette régression vasculaire pourrait être le reflet d'une déstructuration de l'endothélium induit par un déséquilibre de la balance VEGF/Ang-2. D'autre part, les différences d'effets vasculaires exercés par l'Ang-2 pourraient dépendre également de l'origine des vaisseaux. Cette hypothèse a été évoquée par Oshima et al., qui ont montré, sur la rétine, que seuls les néovaisseaux étaient sensibles à une régression induite par un apport de l'Ang-2 en forte concentration alors que les vaisseaux matures n'étaient en rien altérés (Oshima et al., 2005). Nos résultats pourraient être cohérents avec la séquence des processus angiogéniques à l'origine de la vascularisation tumorale (Holash et al., 1999; Yancopoulos et al., 2000). Dans les premiers temps, les vaisseaux cooptés, donc matures ne seraient pas sensibles aux effets déstabilisants de l'Ang-2, puis le processus angiogénique serait initié et les néovaisseaux en présence de l'Ang-2 régresseraient.

Durant la phase de régression vasculaire, nous avons observé une hypoxie tumorale plus marquée dans ces tumeurs GL261-Ang2 que dans les tumeurs contrôles. Cependant, cette hypoxie ne semble pas suffisante ni pour ré-initier un processus angiogénique ni pour asphyxier la tumeur comme nous l'avons montré sur le modèle de gliosarcome 9L (Valable et al., 2009). En revanche, cette hypoxie pourrait permettre le recrutement des macrophages qui est amplifié à ce temps pour ces tumeurs. En effet, notre étude ne montre aucune différence

d'immunomarquage Iba-1 au temps J18 alors qu'il y a une augmentation de la proportion de cellules CD68⁺ dans les tumeurs GL261-Ang2 par rapport aux tumeurs GL261-wt. Ces résultats suggèrent qu'à ce temps, la surexpression de l'Ang-2 par les cellules tumorales favorise le recrutement des cellules CD68⁺/Iba-1⁻, caractérisées comme étant des macrophages périphériques par rapport aux tumeurs contrôles. Des résultats comparables ont été décrits par Scholz et al., sur un modèle de souris transgénique surexprimant Ang-2 au niveau endothélial (Scholz et al., 2016). Selon ces auteurs, outre l'effet chimio-attractant de l'Ang-2 sur les macrophages, ce recrutement serait d'autant plus facilité par une perméabilité vasculaire accrue (Murdoch et al., 2007; Scholz et al., 2016).

De plus, cette augmentation d'immunomarquage CD68⁺ peut également être dû à l'augmentation de l'hypoxie intratumorale retrouvée dans ces tumeurs. En effet, l'hypoxie induit l'expression de nombreuses chimiokines dont le SDF-1 (*stromal derived factor-1*) qui, par l'intermédiaire de son récepteur CXCR4 présent à la surface des macrophages favorise le recrutement de ces cellules inflammatoire (Wang et al., 2012).

En résumé, ces résultats contribuent à maintenir le débat controversé quant aux effets (bénéfiques ou néfastes) et aux mécanismes d'action de l'Ang-2 dans le processus de vascularisation tumorale. Un apport d'Ang-2 conduit très probablement, à une synthèse d'autres facteurs angiogéniques, en réponse à ce déséquilibre provoqué. Ceci suggère que les stratégies anti-angiogéniques devraient cibler plusieurs facteurs. Cette hypothèse a permis notamment d'expliquer l'échappement de certaines tumeurs en réponse à un traitement anti-angiogénique visant à bloquer l'effet du VEGF. Certains auteurs ont ainsi montré sur un modèle de GB chez la souris qu'un traitement au SU5416 (anticorps bloquant l'activité kinase du VEGF-R2) ou au SU6668 (anticorps multicible bloquant l'activité kinase des récepteur VEGF-R1, PDGF-R et FGF-R) induisait une augmentation d'expression de l'Ang-1 suggérant qu'il existe également un équilibre entre le VEGF et les Angiopoïétines (Erber et al., 2004). Plus récemment, comme nous l'avons décrit dans l'introduction de ce manuscrit, l'échappement des patients porteurs de GB au traitement par le bevacizumab (anticorps anti-VEGF) a été imputé à une surexpression d'Ang-2 (Labussière et al., 2016; Scholz et al., 2016).

Par ailleurs, les résultats suggèrent également que l'Ang-2 puisse exercer un effet immunomodulateur lors de la croissance tumorale.

Cependant, bien que nous ayons montré, au temps terminal de croissance tumorale, que la régression vasculaire est associée à une hypoxie et une inflammation dans les tumeurs GL261-Ang2, ces modifications du microenvironnement tumoral ne s'accompagnent pas d'un effet sur le volume tumoral ni sur la survie des animaux par rapport aux tumeurs contrôle. Ces résultats différents de nos résultats antérieurs obtenus sur le modèle syngénique de GB 9L et ceux de Machein et al., pour lesquels une surexpression d'Ang-2 conduisait à un fort remodelage vasculaire, une diminution du volume tumoral et une augmentation de la survie des animaux (Machein et al., 2004; Valable et al., 2009). Ces divergences de résultats pourraient s'expliquer, en autres, par la différence de réseau vasculaire des souris C57BL/6 et les rats Fischer 344.

Dans nos conditions expérimentales, il pourrait être proposé que l'hypoxie ne soit pas suffisante ni pour asphyxier la tumeur, ni pour permettre une polarisation des macrophages vers un phénotype pro-angiogéniques comme cela a été montré sur le modèle de GB humain U251 (Leblond et al., 2015).

L'angiogenèse et l'inflammation étant modulées par la radiothérapie (RT) et la chimiothérapie (CT), nous avons souhaité étudier dans un deuxième temps si les effets de l'Ang-2 observés lors de la progression du GB pouvaient être modulés lors de traitement anti-cancéreux. Au demeurant, ce modèle de GB GL261 a été validé comme pouvant être pertinent pour évaluer les effets anti-tumoraux de différentes modalités dont la CT et la RT (Szatmári et al., 2006).

II. Effet de la radiochimiothérapie sur le modèle de glioblastome GL261

Cette partie du travail de thèse a consisté dans un premier temps à définir et caractériser un protocole de radiochimiothérapie (RCT) efficace pour le modèle préclinique de GB, GL261. Ainsi dans un second temps, nous avons pu évaluer l'effet de l'Ang-2 sur la réponse à ce traitement. Dans cet objectif et afin de mimer la situation clinique, nous avons établi un protocole de traitement permettant une récurrence tumorale, reflet d'une résistance aux traitements conventionnels similaire à celle observée chez le patient.

II.1 Évaluation *in vitro* de la cytotoxicité de la radiochimiothérapie sur le modèle de glioblastome GL261

Des études préliminaires ont été menées afin d'établir la sensibilité des cellules GL261-wt au traitement de chimiothérapie (CT) par temozolomide (TMZ) et de radiothérapie (RT).

Actuellement, l'enzyme MGMT est considérée comme le facteur prédictif de la réponse des GB au TMZ (Hegi et al., 2005). En effet, l'effet cytotoxique du TMZ est due aux méthylations de l'ADN au niveau des adénines et majoritairement des guanines. La MGMT, enzyme de réparation de l'ADN ayant la capacité de déméthylater l'ADN, contrecarre ainsi la cytotoxicité du TMZ. L'effet protecteur de la MGMT vis-à-vis du TMZ est donc dépendant de la méthylation du promoteur de son gène : lorsque le promoteur du gène de la MGMT est méthylé, la protéine n'est pas exprimée et donc le TMZ peut exercer son effet cytotoxique. Actuellement, différentes techniques existent pour étudier la méthylation du promoteur du gène *MGMT* telles la PCR spécifique de la méthylation et le pyroséquençage. Toutefois, contrairement à l'Homme, l'état de méthylation des îlots CpG du gène *MGMT* n'étant pas connu chez la souris, nous avons vérifié au préalable par un test clonogénique que les cellules GL261-wt étaient sensibles au TMZ. La courbe dose-réponse obtenue et présentée sur la **Figure 87A** montre que, 10 jours après une exposition à la CT (100 μ M), plus de 90 % des cellules sont mortes.

Nous avons ensuite évalué la radiosensibilité des cellules GL261-wt après une exposition à un protocole de RCT et de RT seule. Dans cet objectif, les cellules,ensemencées à très faible densité ont été exposées à différentes doses de RX allant de 0 à 6 Gy en présence ou non de TMZ (100 μ M) appliqué 2 h avant l'irradiation. Les cellules ayant survécu à la RT

combinée ou non au TMZ se développent en formant des colonies comme illustrées sur la **Figure 87B**. La quantification du nombre de colonies en fonction de la dose d’irradiation permet d’établir les courbes de survie (**Figure 87B**) et de quantifier différents paramètres de radiobiologie (**Figure 87C**).

La SF2 (fraction de survie à 2 Gy) est le paramètre radiobiologique le plus couramment utilisé pour comparer la radiosensibilité intrinsèque de différents types cellulaires. La D_{37} , également dénommé D_0 , correspond à la dose létale moyenne et reflète aussi la radiosensibilité des cellules. En accord avec les observations des tests de colonies, les paramètres de radiobiologie issus des courbes de survie ne présentent pas de différences significatives entre la cytotoxicité de la RCT comparée à la RT seule. Ainsi, les résultats pour les cellules GL261-wt exposées à la RCT montrent une SF2 de $34,90 \pm 2,35 \%$ et une D_{37} de $1,89 \pm 0,11$ Gy versus une SF2 de $42,13 \pm 7,54 \%$ ($p=0,19$) et une D_{37} de $2,24 \pm 0,35$ Gy ($p=0,18$) lorsque celles-ci sont exposées exclusivement à la RT (**Figure 87C**).

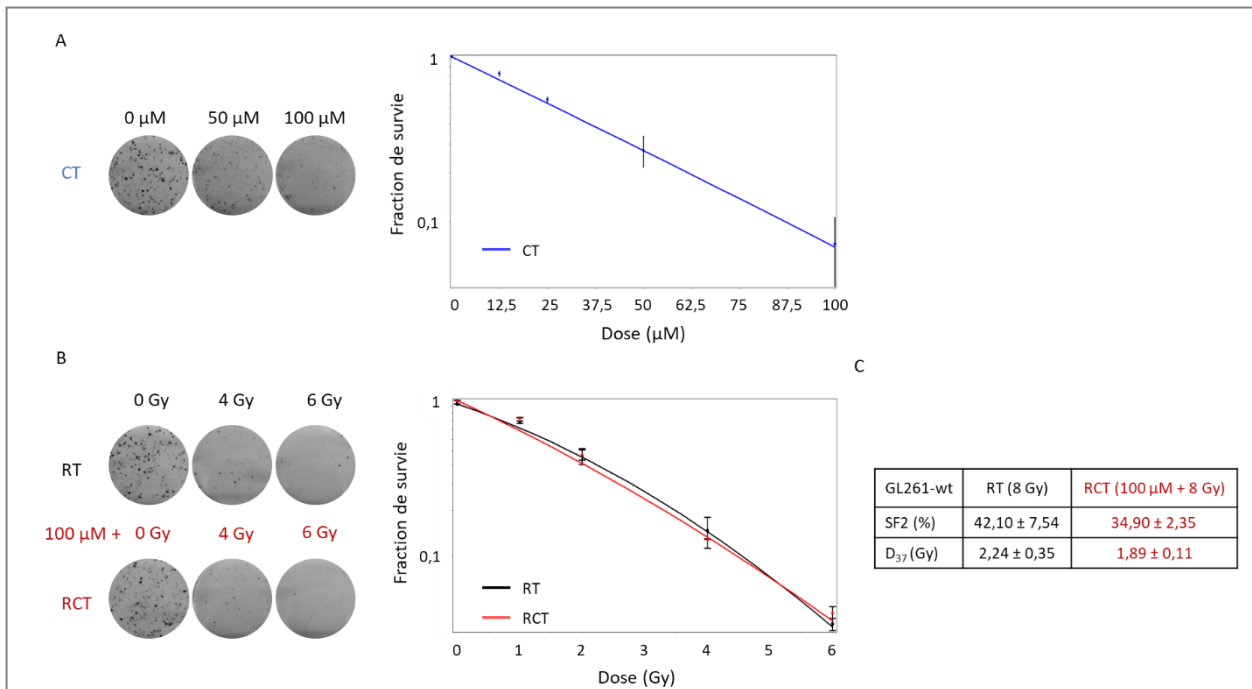


Figure 87 : Étude de la chimio- et radiosensibilité des cellules tumorales GL261-wt

A : Illustration des colonies et courbes de survie des cellules GL261-wt exposées à des doses croissantes de témozolomide (TMZ). Moyenne ± écart-type, N=3, n=3. **B** : Illustration des colonies et courbes de survie des cellules GL261-wt exposées à des doses croissantes de radiothérapie (RT, noir) et radiochimiothérapie (RCT, rouge). Moyenne ± écart-type, N=3, n=3. **C** : Paramètres radiobiologiques de SF2 (fraction de survie à 2 Gy) et D_{37} (dose nécessaire pour induire 37 % de survie cellulaire) obtenus après détermination des droites d’équations selon le modèle linéaire quadratique ($SF=e^{-\alpha D+\beta D^2}$). Moyenne ± écart-type, N=3, n=3. Test de Student non significatif.

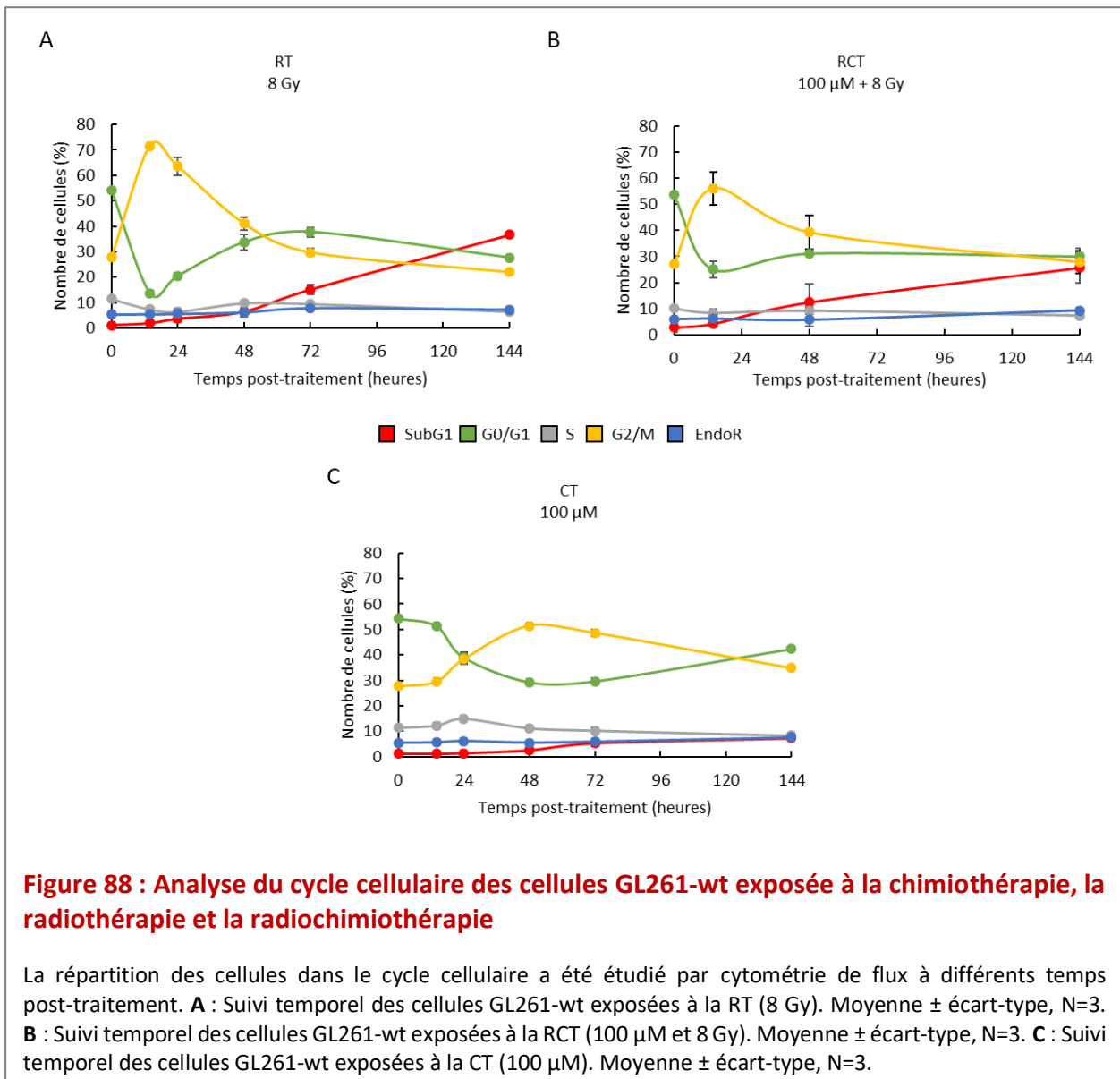
Dans ces conditions expérimentales, la présence de TMZ ne semble pas avoir radiosensibilisé les cellules GL261-wt.

Le test de clonogénicité permet d’appréhender la radiorésistance des cellules tumorales sur le long terme. Ainsi, nous avons complété ces données-par des études du cycle cellulaire de façon à déterminer si les lésions à l’ADN induites par les traitements s’accompagnaient d’une modification de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. En effet, lorsqu’une lésion à l’ADN existe, le cycle cellulaire peut être arrêté soit en phase G1, (la cellule n’effectue alors pas la transition G1/S), soit en phase S (la cellule bloque alors la réplication de l’ADN pour réparer les dommages à l’ADN), soit en phase G2/M (alors, la cellule ne rentre pas en mitose correctement, le cycle est arrêté pour permettre à la cellule de réparer). Le cycle cellulaire des cellules tumorales a donc été étudié à différents temps post-traitement (14h, 24h, 48h, 72 h et 6 jours).

En réponse à la RT en dose unique (8 Gy), l’analyse du cycle cellulaire fait apparaître un arrêt précoce des cellules GL261-wt dans la phase G2/M du cycle cellulaire, 14 h post-irradiation, au dépend des cellules présentes dans la phase G0/G1(**Figure 88A**). Cet arrêt des cellules en phase G2/M est toutefois transitoire. En effet, à partir de 24 h post-irradiation, la répartition des cellules GL261-wt dans les différentes phases du cycle cellulaire tend à revenir à l’état de base. Puis, comme en témoigne l’augmentation du nombre de cellules en phase subG1, à partir de 72 h, une mort par apoptose se déclenche et augmente progressivement pour atteindre $36,68 \pm 0,15$ % à J6 post-RT (**Figure 88A**).

En réponse à la RCT concomitante (TMZ : 100 μ M et RX : 8 Gy), tout comme en réponse à la RT seule, les cellules tumorales s’arrêtent précocement, dans la phase G2/M du cycle cellulaire 14 h après traitement. Toutefois, cet arrêt concerne une plus faible proportion de cellules par comparaison à la RT seule (**Figures 88A, B**). De même, bien que le traitement s’accompagne au cours du temps d’une augmentation du nombre de cellules probablement destinées à mourir par apoptose, la proportion de cellules dans la phase subG1 est également plus faible et atteint $25,65 \pm 5,91$ % à J6 (**Figure 88B**). Ce résultat pourrait être à rapprocher de celui présenté en **Figure 87** et pour lequel nous n’avons pas observé d’effet radiosensibilisant du TMZ pour ces cellules GL261-wt.

Des analyses cinétiques du cycle cellulaire suite à un traitement de CT sur les cellules tumorales ont également été réalisées pour mieux appréhender les résultats obtenus après RCT qui sont relativement similaires à ceux observés après RT seule. Ainsi, comme présenté sur la **Figure 88C** l'analyse du cycle cellulaire après un traitement à 100 μ M de TMZ, permet de visualiser certes un arrêt des cellules dans la phase G2/M du cycle cellulaire, cependant moins important et plus tardif (temps 48h) que pour les cellules exposées à la RT et RCT (**Figures 88 A, B, C**). De plus, 3 jours post-CT, seuls 5,35 % des cellules traités sont en phase subG1 pour n'atteindre que 7,34 % au temps J6 (**Figure 88C**).



Cette étude réalisée *in vitro* indique, que dans nos conditions expérimentales, les cellules GL261-wt sont sensibles à la RCT. Nous avons donc par la suite évalué *in vivo*, la réponse des tumeurs issues de l'implantation de cellules GL261-wt à la RCT. Dans cet objectif, les cellules de GB GL261-wt ont été implantées dans le striatum de souris C57BL/6.

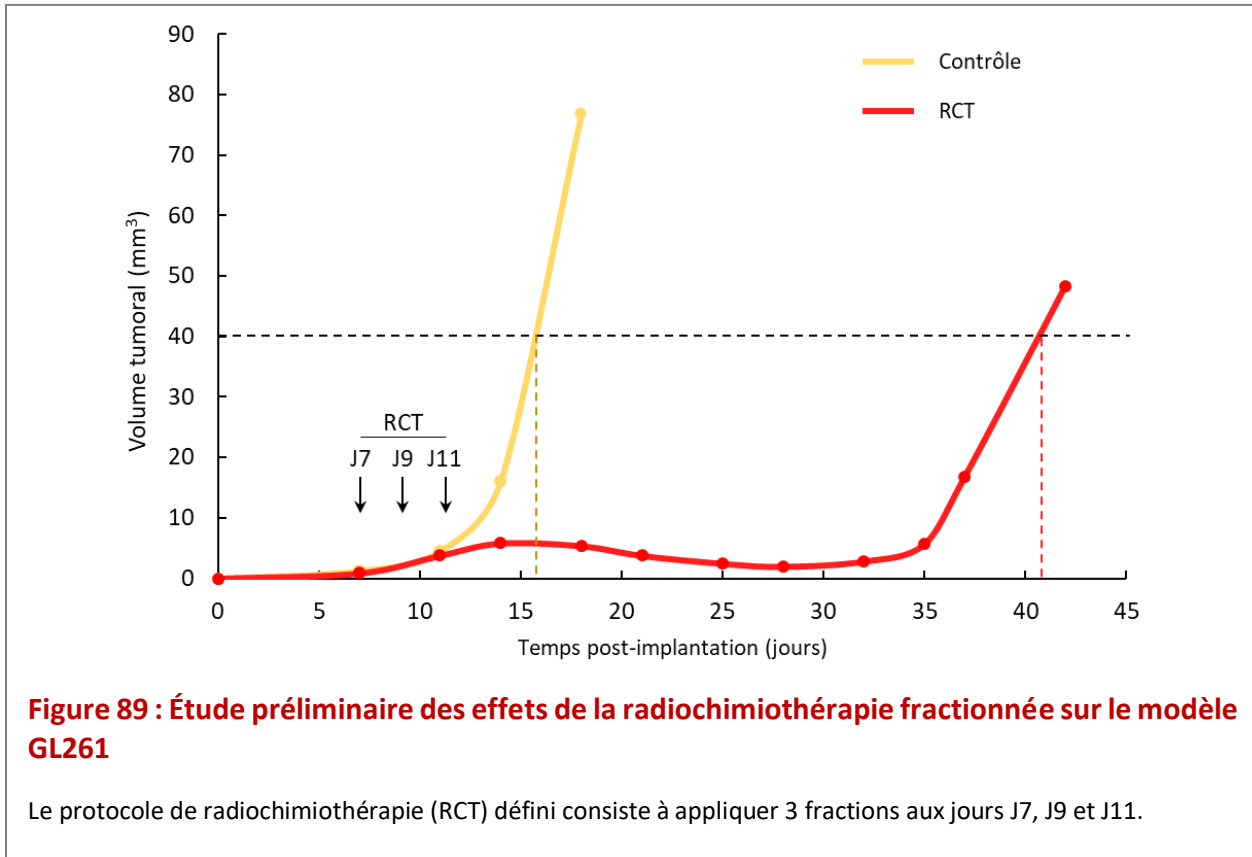
II.2 Évaluation *in vivo* des effets de la radiochimiothérapie sur le modèle de glioblastome GL261

II.2.1 Validation du protocole de radiochimiothérapie

A partir des données obtenues *in vitro* et celles de la littérature issues d'expérimentation *in vivo* sur le modèle de GB GL261 (Szatmári et al., 2006), nous avons développé et caractérisé un protocole de RCT fractionnée pour lequel la RT (3 x 4 Gy) est associée à une administration de TMZ (3 x 10 mg/kg).

Sur la base d'une étude préliminaire caractérisant l'évolution de la progression tumorale, le traitement fractionné débute 7 jours après l'implantation des cellules tumorales, afin que celui-ci ait lieu à l'initiation de la phase exponentielle de la croissance tumorales (**Figure 89**). A ce temps, le volume tumoral est compris entre 2 et 5 mm³ correspondant à 1 à 2 % du volume cérébral chez la souris. Ce volume se rapproche des conditions cliniques chez l'Homme en pré-opératoire pour lequel le volume moyen du GB représente environ 2% du volume cérébral (Bette et al., 2018). Le fractionnement du traitement se poursuit aux jours 9 et 11 post-implantation, soit un protocole de RCT décomposé en 3 fractions où chacune est espacée de 48 h (**Figure 89**).

Comme le montre la **Figure 89**, suite à ce traitement, la progression des tumeurs GL261-wt est stoppée, les tumeurs sont contenues pendant 20 jours, puis une récurrence est observée. En phase de récurrence, les tumeurs traitées par RCT prolifèrent à la même vitesse que les tumeurs non traitées.



Cette étude préliminaire de validation des modalités de traitements, nous a permis d'envisager une étude de plus grande envergure pour caractériser de façon longitudinale la progression tumorale en réponse à ce traitement de RCT.

II.2.2 Étude des effets de la radiochimiothérapie sur la progression tumorale

L'efficacité de la RCT combinée a été évaluée en étudiant par IRM l'évolution du volume tumoral des animaux ainsi que la survie des animaux et en comparant ces effets à ceux obtenus pour chacun des traitements (**Figure 90A**).

A partir des images issues de l'IRM T2w (**Figure 90**), il est possible de les exploiter quantitativement afin de déterminer le volume tumoral (**Figure 90C**) mais aussi qualitativement car cette séquence permet également d'obtenir des informations sur le plan biologique. Par exemple, la nécrose témoin d'une mort cellulaire apparaîtra en hypersignal (blanc sur l'image) (**Figure 90B**, flèche jaune). A partir des données d'imagerie (**Figure 90B**), l'analyse quantitative du volume tumoral indique que le protocole d'administration de CT établie (3 x 10 mg/kg de TMZ), basé sur les travaux de Pérès et al., ne présente aucun bénéfice

thérapeutique par rapport aux animaux GL261-wt non traités puisque les courbes de progression tumorale sont similaires entre le groupe non traité et le groupe traité par CT seule ($p=0,58$) (Pérès et al., 2014). En revanche, le protocole de RT en dose fractionnée (3 x 4 Gy de RX) diminue la croissance tumorale ($p<0,05$) avec une récurrence qui intervient dès le temps J25. Des résultats comparables sont observés en réponse à la RCT (3 x 4 Gy et 3 x 10 mg/kg) avec toutefois une récurrence qui intervient plus tardivement ($p<0,05$). Par exemple, les animaux traités par RT atteignent le volume tumoral de 30 mm³ à J16 post-RT alors que les animaux traités par RCT atteignent ce même volume à J26 post-RCT (**Figure 90C**).

Les résultats de l'étude de survie des animaux corroborent ceux des volumes tumoraux. En effet, l'étude de la survie des animaux montre une médiane de survie de 15 jours pour les animaux GL261-wt non traités et GL261-wt traités par CT ($p=0,96$) (**Figure 90D**). En réponse à la RT, la médiane de survie des animaux est de 28 jours ($p<0,05$), ce qui revient à dire que ce traitement seul double pratiquement la survie de ces animaux par comparaison aux animaux non traités ou traités par CT. En revanche, la CT apportée de façon concomitante à la RT semble potentialiser l'effet de la RT bien que l'augmentation de la survie des animaux exposés à la RCT ne soit pas significative par comparaison à la survie des animaux traités par RT seule ($p=0,073$). En effet, suite à la RCT, la médiane de survie est de 33 jours, ce qui représente une augmentation de 120 % par rapport au groupe non traités et de 18 % par comparaison aux animaux traités par RT seule (**Figure 90D**). De façon intéressante, le profil de survie des animaux obtenu dans cette étude reflète le profil de survie globale des patients de l'essai clinique de phase III EORTC/NCIC comparant le bénéfice d'un traitement associant la radiothérapie au TMZ par rapport à la radiothérapie seule (Stupp et al., 2005). Que ce soit par l'observation ou par l'analyse des données d'imagerie, nous avons montré que le protocole RCT est plus efficace que chacun des traitements testés individuellement (CT ou RT). Toutefois, cette efficacité n'est que transitoire puisqu'au temps J42 la tumeur a repris sa croissance (**Figure 90B**).

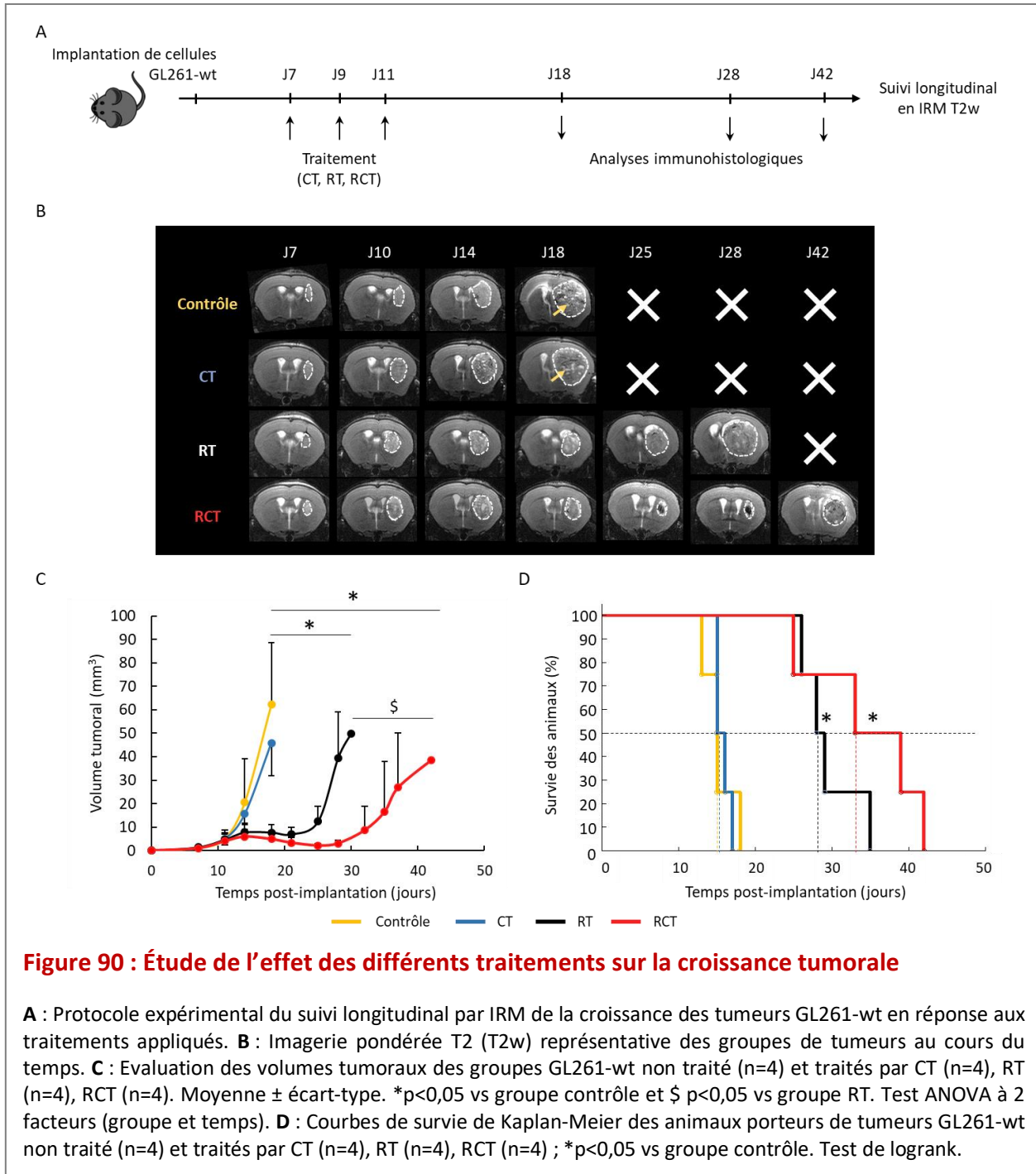


Figure 90 : Étude de l'effet des différents traitements sur la croissance tumorale

A : Protocole expérimental du suivi longitudinal par IRM de la croissance des tumeurs GL261-wt en réponse aux traitements appliqués. **B** : Imagerie pondérée T2 (T2w) représentative des groupes de tumeurs au cours du temps. **C** : Evaluation des volumes tumoraux des groupes GL261-wt non traité (n=4) et traités par CT (n=4), RT (n=4), RCT (n=4). Moyenne ± écart-type. *p<0,05 vs groupe contrôle et § p<0,05 vs groupe RT. Test ANOVA à 2 facteurs (groupe et temps). **D** : Courbes de survie de Kaplan-Meier des animaux porteurs de tumeurs GL261-wt non traité (n=4) et traités par CT (n=4), RT (n=4), RCT (n=4) ; *p<0,05 vs groupe contrôle. Test de logrank.

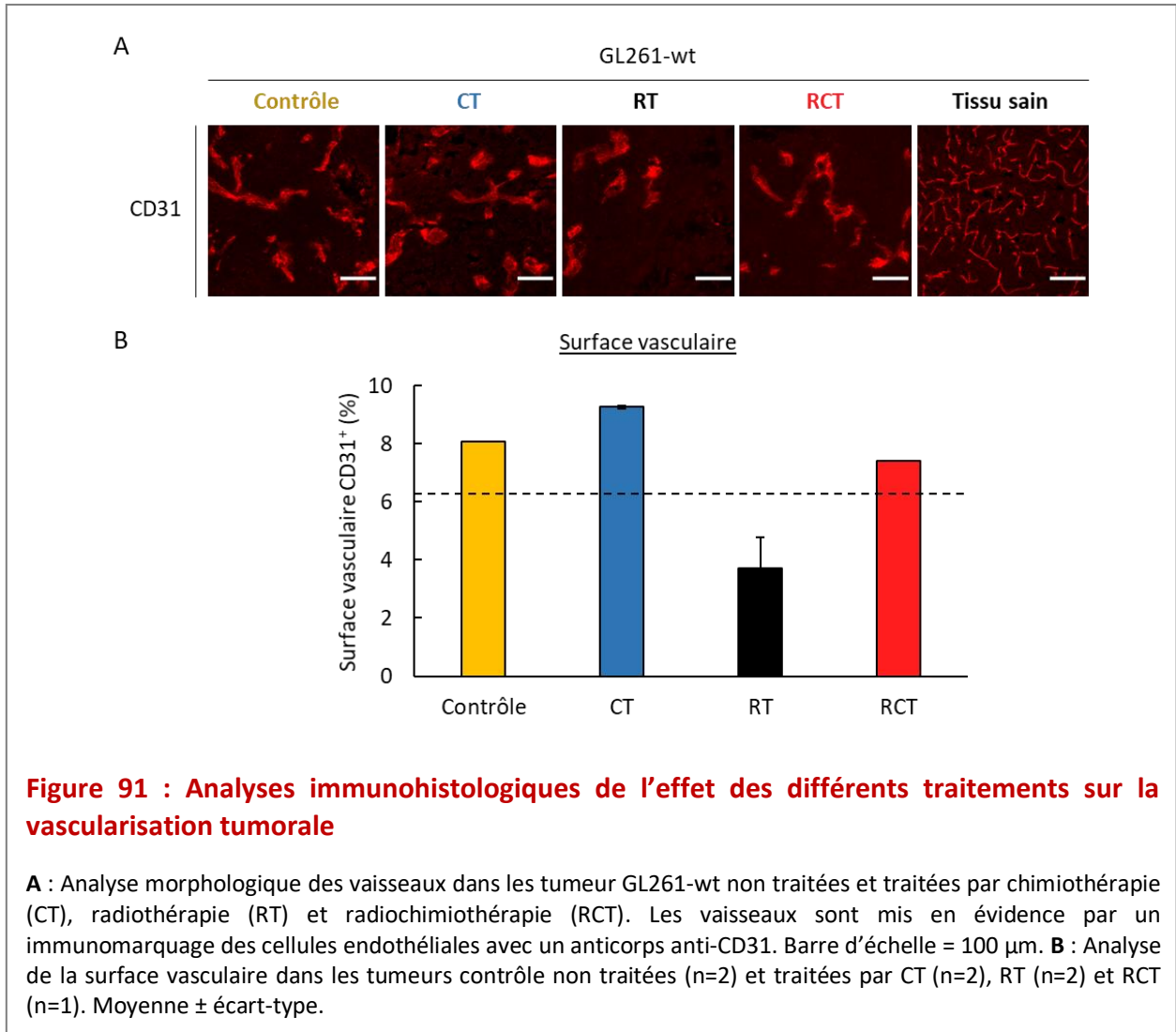
Ainsi, comme attendu, l'étude de la réponse tumorale aux différents traitements, montre qu'*in vivo* la RCT est le traitement le plus efficace pour ralentir la croissance tumorale. Cependant, les données *in vitro*, issues de l'étude du cycle cellulaire ou de clonogénicité, ne semblent pas indiquer de valeur ajoutée de la RCT par rapport à la RT sur la mort des cellules tumorales. C'est pourquoi, nous avons émis l'hypothèse que l'environnement tumoral pourrait influencer sur l'efficacité de ces traitements. Nous nous sommes particulièrement

intéressés au compartiment vasculaire, voie d'entrée de la CT et qui comme nous l'avons décrit en introduction de ce manuscrit est particulièrement sensible à la RT.

II.2.3 Effets de la radiochimiothérapie sur le compartiment vasculaire

Parallèlement à l'étude menée par IRM, des études immunohistologiques ont été réalisées sur des coupes de cerveaux d'animaux porteurs de tumeurs traitées ou non. Afin de s'affranchir d'un effet potentiel du volume tumoral sur son microenvironnement, les cerveaux des animaux ont été prélevés lorsque des volumes tumoraux similaires étaient atteints ($\sim 50 \text{ mm}^3$). L'impact des différents traitements thérapeutiques (CT, RT, RCT) sur le compartiment vasculaire des tumeurs GL261-wt a été étudié par immunohistologie.

Sur le plan morphologique, comme décrit précédemment pour la **Figure 81A**, nous avons retrouvé pour les animaux GL261-wt non traités, des vaisseaux tumoraux qui présentent des anomalies de structure par comparaison au tissu sain (**Figure 91A**). En réponse aux traitements, bien que sur le plan morphologique, chaque traitement semble accentuer les défauts structurels des vaisseaux présents dans la tumeur, seule la RT induit une diminution de la densité vasculaire (**Figures 91A, B**). En effet, suite à ce traitement, l'analyse quantitative de l'immunomarquage CD31 révèle une diminution de la surface vasculaire d'environ 50 % par comparaison aux 3 autres groupes qui présentent des densités vasculaires sensiblement équivalentes (**Figure 91B**). Par exemple, l'analyse quantitative des tumeurs GL261-wt non traitées indique une surface vasculaire de $8,07 \pm 0,02 \%$ alors que les groupes GL261-wt traités par CT et par RCT ont respectivement une surface vasculaire de $9,26 \pm 0,05 \%$ et $7,40 \%$. En réponse au traitement de RT, la proportion d'immunomarquage CD31 n'est plus que de $3,73 \pm 1,05 \%$.

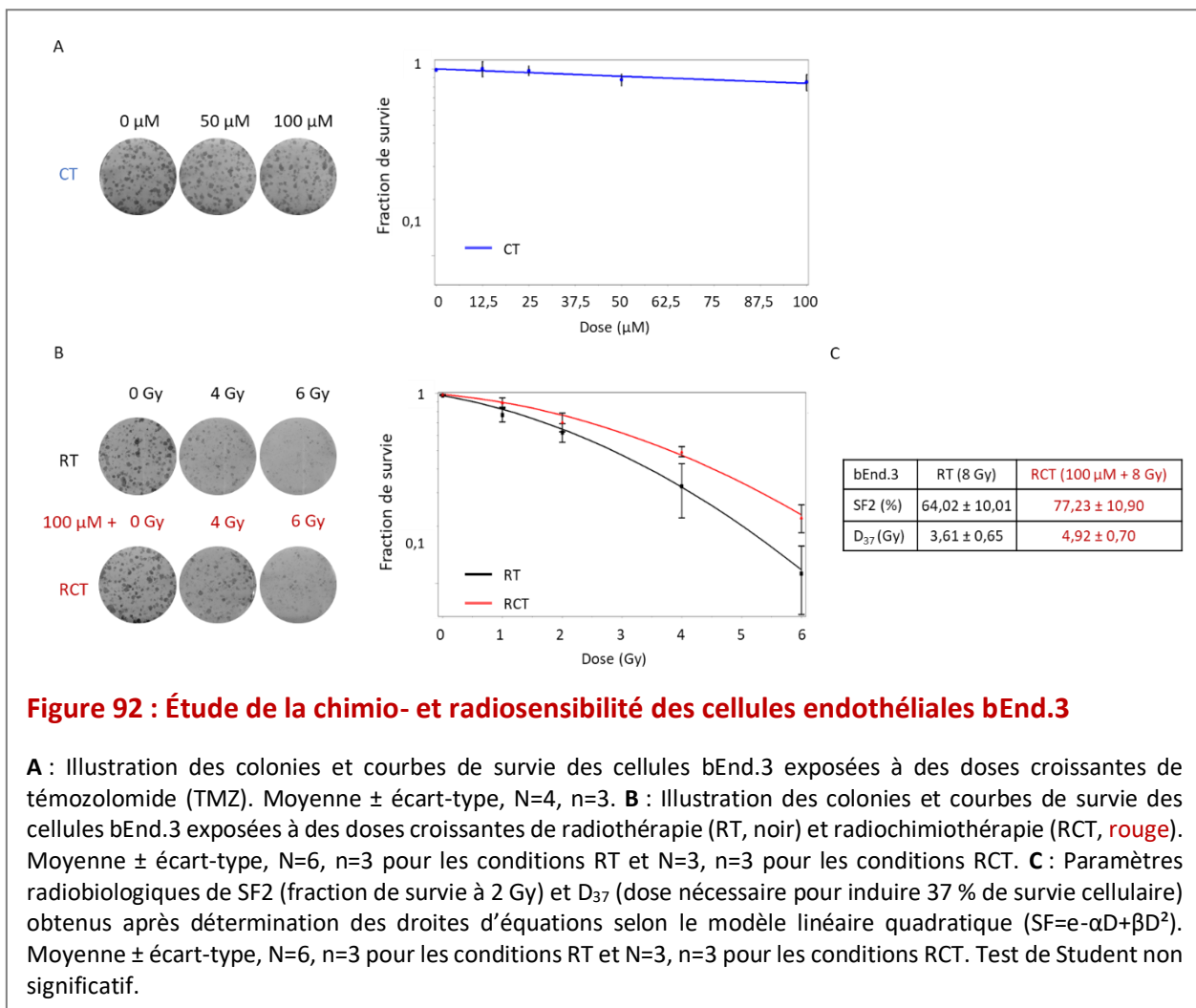


L'étude réalisée *in vivo* a permis de montrer qu'outre les cellules tumorales, les vaisseaux de la tumeur sont affectés sur le plan structural par les différents traitements. Ces observations suggèrent que les cellules endothéliales puissent également présenter une certaine sensibilité aux différents traitements. Dans la littérature, peu d'études s'adressent à la caractérisation de la chimio- et radiosensibilité des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux. C'est pourquoi, nous avons cherché à établir *in vitro*, quelle était la sensibilité des cellules de la lignée bEnd.3, cellules endothéliales obtenues à partir de microvaisseaux du cortex cérébral de souris, qui par leur capacité de prolifération nous permettent de nous rapprocher d'un contexte d'angiogenèse tumorale.

Comme pour les cellules tumorales, le test de clonogénicité a été réalisé pour évaluer la sensibilité des cellules endothéliales à la CT, RT et RCT. Le dénombrement des colonies, permettant d'établir les courbes de survie, est effectué 7 jours après traitement.

Par ce test, aucun effet cytotoxique du TMZ n'a été observé pour ces cellules endothéliales comme l'illustre la **Figure 92A**.

En revanche, l'observation du nombre de colonie formées après RT et RCT (**Figures 92B**) révèle que les cellules de la lignée bEnd.3 semblent plus résistantes à la RCT qu'à la RT seule. Toutefois, les paramètres radiobiologiques obtenue ne montrent aucune différence significative de la SF2 ($p=0,099$) et de la D37 ($p=0,128$) entre ces conditions (**Figure 92C**).



II.3 Conclusion/Discussion

L'objectif de cette étude était de définir et caractériser un protocole de traitement combinant la CT au TMZ à la RT sur le modèle murin de GB GL261. Ce protocole devait aboutir à une récurrence tumorale afin de permettre d'étudier dans un second temps, l'influence d'un apport d'Ang-2 sur l'efficacité de ce traitement.

Paradoxalement, alors qu'il existe une recherche intense afin d'optimiser l'efficacité des traitements conventionnels de RT et CT pour les GB, les études précliniques développées afin d'apporter la preuve de concept, intègrent rarement ce protocole de RCT. Or, ce traitement dénommé « protocole Stupp » demeure le traitement de première ligne des GB et repose sur une RT fractionnée (la dose est de 60 Gy en 30 fractions de 2 Gy par jour) en association avec le TMZ (75 mg/m², 5 jours par semaine). (Stupp et al., 2005). Le concept à l'origine de cette combinaison de traitement reposait sur le constat selon lequel les cellules tumorales présentant des arrêts dans le cycle cellulaire sont plus sensibles à la RT. Stupp a ainsi proposé d'associer le TMZ à la RT car le TMZ induit un arrêt des cellules tumorales en phase G2/M du cycle cellulaire (Dillon et al., 2014). Le TMZ est donc considéré comme un radiosensibilisant.

Le protocole clinique de RT résulte, quant à lui, d'un compromis entre l'efficacité recherchée et la toxicité acceptable. Actuellement, si la valeur ajoutée du fractionnement de la dose n'est pas contestée, il est de plus en plus envisagé à l'échelle de la recherche clinique de déposer de plus fortes doses de rayons X en un minimum de fraction soit un hypofractionnement de la RT (Mann et al., 2018).

Sur la base du protocole clinique, des données de la littérature et des contraintes inhérentes à l'expérimentation animale, nous avons adopté un protocole de RT hypofractionnée et conformationnelle (3 x 4 Gy) combinée à une administration concomitante de TMZ à une dose de 10 mg/kg qui est l'équivalent de la dose appliquée chez l'Homme : 75 mg/m² chez l'Homme. Ce protocole a été appliqué sur une semaine, avec un délai de 48 h entre chaque fraction.

L'étude longitudinale par IRM des animaux porteurs de tumeur GL261-wt a permis de vérifier que ce protocole conduisait à une récurrence de la tumeur. Nous avons ensuite mené une étude comparative afin d'évaluer le bénéfice thérapeutique de chaque traitement. Ainsi l'étude de la progression tumorale et de la survie des animaux a conforté l'intérêt de combiner

la CT à la RT, modalité qui présente le maximum d'efficacité. Toutefois, l'effet radiosensibilisant du TMZ n'a pas été retrouvé *in vitro*, comme en témoigne les résultats du test clonogénique comparant l'effet de la RT et RCT sur les cellules GL261-wt. Cette divergence de résultats peut s'expliquer en partie par une différence de protocole de RCT appliqué entre l'étude *in vivo* (3 fractions) et *in vitro* (1 fraction). En effet, *in vitro*, le traitement des cellules au TMZ est appliqué 2 h avant la RT, alors que les résultats présentés en réponse à la CT seule, montre bien un arrêt des cellules GL261-wt en phase G2/M, mais celui-ci est intervenu plus tardivement (48h) et ne permettrait de radiosensibiliser les cellules tumorales. Sur la base de ces données obtenues *in vitro*, la RCT a été appliquée chez les animaux, avec des intervalles de 48 h entre chaque fraction, de façon à optimiser l'effet radiosensibilisant du TMZ. Dans ces conditions, nous retrouvons effectivement un meilleur effet thérapeutique de la RCT par comparaison à la RT, tel qu'il est retrouvé chez l'Homme (Stupp et al., 2009).

Parallèlement, nous avons caractérisé la réponse du compartiment vasculaire aux différentes modalités de traitement (CT, RT et RCT).

Comme nous l'avons décrit en introduction de ce manuscrit, les effets observés en réponse à la RT dépendent du protocole d'irradiation (dose totale, unique ou fractionnée) (Bonnaud et al., 2007; Cervelli et al., 2014; Lafargue et al., 2017; Paris et al., 2001; Sofia Vala et al., 2010). En revanche, nous retrouvons sur notre modèle une résistance à la chimiothérapie à base de TMZ. Les résultats présentés au cours de cette étude corroborent les données de la littérature. En effet, les données quantitatives issues de l'étude immunohistologique montrent que la densité vasculaire des tumeurs GL261-wt traitées par la CT seule est équivalente à celle des animaux non traités. En accord avec ces données, *in vitro*, aucun effet cytotoxique de la CT n'a été observé sur la lignée de cellules endothéliales bEnd.3 issues de microvaisseaux cérébraux de souris. Cette chimiorésistance des cellules endothéliales serait due à un reflux important du TMZ, en raison d'une forte expression des transporteurs ABC sur ces cellules (Wijaia et al., 2017).

Alors que la radiosensibilité des cellules endothéliales dépend tant du statut de prolifération de ces cellules (quiescence versus prolifération) que de la nature des vaisseaux (macro- ou microvaisseaux) et du tissu concerné, peu d'études s'adressent à la caractérisation de la radiosensibilité des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux. C'est pourquoi nous avons utilisé les cellules bEnd.3, qui par leur capacité à proliférer se rapprochent d'un

contexte d'angiogenèse tumorale. Toutefois, bien que ces cellules présentent les caractéristiques majeures des cellules endothéliales primaires de vaisseaux cérébraux (Watanabe et al., 2013), il pourrait être pertinent de reproduire ces expériences de cytotoxicité sur des cultures primaires de cellules endothéliales issues de microvaisseaux prélevés dans les tumeurs (Xiao et al., 2015).

En revanche, *in vivo*, la RT conduit à une atteinte de la vascularisation tumorale. En effet, suite à une irradiation de 3 x 4 Gy, nous avons observé une régression vasculaire d'environ 50 % par rapport à la densité vasculaire des tumeurs contrôles. Comme nous l'avons rappelé en introduction de ce manuscrit selon la modalité de traitement aux RX utilisée, les effets sur la vascularisation peuvent être opposés. Il est généralement admis et de façon schématique qu'une dose unique (> 10 Gy) conduirait à une mort des cellules endothéliales et des altérations hémodynamiques des vaisseaux, alors qu'une irradiation fractionnée à faible dose (< 10 Gy) serait favorable à une activation des cellules endothéliales et au processus angiogénique. Les effets observés sur la vascularisation des tumeurs GL261-wt avec un protocole hypofractionnée et une dose totale de 12 Gy se rapprocheraient de ceux décrits pour une dose unique de RT. En accord avec ces résultats, une étude réalisée au sein de l'équipe CERVOxy, sur un modèle orthotopique de GB humain (U87) exposé à une irradiation fractionnée (3 x 10 Gy) a montré des perturbations morphologiques et hémodynamiques du réseau vasculaire de la tumeur U87 (Thèse A Gérard, 2015). Ce protocole d'irradiation conduit en effet à une diminution du volume sanguin cérébral (VSC) associé à une diminution de la densité vasculaire.

Il aurait été intéressant de compléter l'étude immunohistologique présentée dans ce document, par une étude d'IRM vasculaire afin de préciser notamment l'évolution du VSC, de la perméabilité vasculaire qui auraient renforcé les données morphologiques. De même une étude protéomique aurait permis de proposer les mécanismes moléculaires à l'origine des perturbations du réseau vasculaire suite à une irradiation. Parmi les mécanismes moléculaires avancés, il a été notamment proposé qu'un déséquilibre d'expression entre le VEGF et les Ang-1 et Ang-2 pourrait notamment expliquer les défauts de structure des vaisseaux tumoraux (Greene-Schloesser et al., 2012; Lee et al., 2011; Thèse A Gérard, 2015). En outre une irradiation de 10 Gy induit une augmentation d'expression des ARNm d'Ang-2 au niveau cérébral (Lee et al., 2011). Ce déséquilibre d'expression des facteurs angiogéniques

permettrait notamment d'expliquer les anomalies structurales des vaisseaux que nous avons décrites et la régression vasculaire associée conduisant à une raréfaction des vaisseaux.

L'analyse de la vascularisation par IRM aurait également été utile pour interpréter les résultats obtenus suite au protocole de RCT. En effet, la régression vasculaire post-RT n'est pas observée lorsque la RT est combinée à la CT, alors que les vaisseaux de la tumeur ne présentent pas de différences majeures sur le plan morphologique selon les traitements. Ces données ne peuvent être confrontées à celles de la littérature, car à notre connaissance et comme nous l'avons souligné en introduction de ce chapitre de discussion, il n'existe que peu d'études intégrant les deux modalités de traitements (CT et RT) et aucune ne s'est intéressée à évaluer les conséquences de cette combinaison de traitement sur le compartiment vasculaire cérébral. Il serait donc intéressant de comparer les propriétés des vaisseaux des tumeurs entre les groupes traités à la CT seule et RCT, de façon à identifier les modifications structurelles et fonctionnelles de ces vaisseaux qui pourraient conduire à une normalisation vasculaire. L'IRM vasculaire, quant à elle, permettrait d'appréhender la perméabilité, la perfusion de ces vaisseaux et de les comparer à celles des vaisseaux du tissu sain. Ces données vasculaires sont majeures dans un contexte de traitement puisque l'accessibilité des traitements dépend de l'intégrité de la BHE mais aussi de la fonctionnalité de ces vaisseaux.

De plus, les modifications de la vascularisation pourraient être à l'origine d'une hypoxie au sein de la tumeur. Il serait ainsi nécessaire d'évaluer l'hypoxie sur le modèle de GB GL261 et de comparer les effets des différentes modalités de traitement sur l'évolution de cette hypoxie tumorale. Cette information métabolique serait pertinente car l'hypoxie aura tant des conséquences sur l'efficacité des traitements que sur la progression tumorale. Par exemple, l'hypoxie augmentera la résistance des cellules tumorales à la RT mais favorisera aussi le recrutement des cellules inflammatoires et le devenir de ces cellules (Leblond et al., 2015; Murdoch et al., 2004).

Par ailleurs, les différents traitements vont également influencer sur le compartiment inflammatoire. Bien que les données concernant la réponse des macrophages au TMZ soient fragmentaires, ces cellules semblent résistantes au TMZ (Bauer et al., 2012; Briegert and Kaina, 2007). En revanche, à l'image de la vascularisation, les effets de la RT sur les

macrophages sont dépendant de la dose d'irradiation. Suite à de faibles doses de RT, l'inflammation intratumorale serait « bénéfique » puisque le phénotype M1 est le plus représenté au sein des TAMs (Klug et al., 2013; Stessin et al., 2020), alors qu'en réponse à une irradiation à fortes doses, un environnement inflammatoire pro-tumoral est favorisé par la présence des macrophages M2 (Leblond et al., 2017; Okubo et al., 2016; Seifert et al., 2016). Il aurait donc été informatif de mener une étude comparative de l'effet de ces différents traitements sur la réponse inflammatoire. Cependant, rappelons que l'objectif de cette étude était de valider un modèle de récurrence utilisant les traitements standards afin d'étudier l'influence de l'Ang-2 sur la réponse thérapeutique en nous focalisant sur le compartiment vasculaire et inflammatoire. Ces deux compartiments ont donc été étudiés dans la partie consacrée à cette étude.

III. Étude de l'effet d'une surexpression d'Ang-2 sur le modèle syngénique de glioblastome murin, GL261 exposé à un protocole de radiochimiothérapie

III.1 Avant-propos de l'article soumis à *Cancers*

Les GB sont des tumeurs richement vascularisées et très inflammatoires. Un certain nombre de données cliniques suggère que, tout comme le VEGF, l'Ang-2 participerait au remodelage vasculaire observé dans ces tumeurs. Plus récemment, un rôle de cette cytokine dans les processus d'inflammation a été également décrit notamment dans un contexte de tumeurs. Les travaux précédemment exposés dans ce manuscrit ont ainsi montré sur un modèle préclinique de GB syngénique qu'une surexpression d'Ang-2 conduisait à une régression vasculaire et à un recrutement de cellules inflammatoires au sein de ces tumeurs sans toutefois modifier le volume tumoral ni la survie des animaux porteurs d'une tumeur orthotopique GL261.

En clinique, les patients atteints de GB bénéficient après chirurgie, d'un traitement de radiochimiothérapie (RCT), qui prolonge la survie de certains patients sans toutefois permettre d'atteindre une rémission. Au-delà de la réponse des cellules tumorales à ce traitement, il est clairement établi que les compartiments vasculaire et inflammatoire évoluent au cours de ce traitement et qu'ils pourront conditionner la réponse thérapeutique de ces patients.

Dans ce contexte, nous avons cherché à déterminer quel était l'influence de la surexpression de l'Ang-2 sur la réponse des GB aux traitements conventionnels. Nous avons appliqué le protocole de RCT décrit et validé dans la partie 2 des résultats de ce manuscrit sur les tumeurs issues de l'implantation de cellules GL261-Ang2.

L'action de l'Ang-2 demeure cependant difficile à appréhender car l'action autocrine ou paracrine de ce facteur dépend notamment du contexte cellulaire, tissulaire, de sa concentration, de la présence concomitante d'autres facteurs vasculaires ou inflammatoires (Kim et al., 2000a; Korhonen et al., 2016; Maisonpierre et al., 1997; Souma et al., 2018).

En réponse aux traitements, des mécanismes de compensation peuvent également perturber l'expression de cette cytokine. C'est ainsi qu'il a été montré en clinique qu'une surexpression d'Ang-2 était un mécanisme d'échappement au traitement anti-VEGF appliqué aux GB (Labussière et al., 2016; Scholz et al., 2016). Par ailleurs, une irradiation à dose unique conduit à une surexpression d'Ang-2 au niveau cérébral (Lee et al., 2011). Plus récemment, les

travaux de l'équipe d'Alitalo ont notamment rapporté que le blocage de l'activité de l'Ang-2 sur des cellules endothéliales par un anticorps neutralisant, induisait un rétrocontrôle conduisant à une surexpression d'Ang-2 (Kallio et al., 2020). Ces données nous ont amenés à étudier si la RCT pouvait moduler l'expression de l'Ang-2 au sein des cellules tumorales.

III.2 Effet de la radiochimiothérapie sur l'expression de l'Ang-2 dans les cellules GL261

Les cellules GL261-wt et GL261-Ang2 ont été exposées à la RCT (3 x 4 Gy en présence de TMZ 100 μ M), protocole se rapprochant de celui que nous avons utilisé *in vivo*. Comme l'illustre la **Figure 93**, ce traitement induit une augmentation de l'Ang-2 tant au niveau transcriptomique (**Figure 93A**) que protéique (**Figure 93B**) dans les deux types cellulaires. Cependant, cette augmentation d'expression des ARNm en réponse à la RCT est beaucoup plus marquée pour les cellules GL261-Ang2 (environ 20 fois) par comparaison aux cellules GL261-wt pour lesquelles le traitement de RCT augmente l'expression des ARNm de l'Ang-2 d'environ 3 (**Figure 93A**). Ce résultat a été confirmé pour les cellules GL261-Ang2 au niveau protéique, avec toutefois une amplitude plus faible (environ 2 fois) (**Figure 93B**). En revanche, aucune expression de cette cytokine n'a été détectée par le dosage ELISA pour les cellules GL261-wt et ce quel que soit la condition (**Figure 93B**).

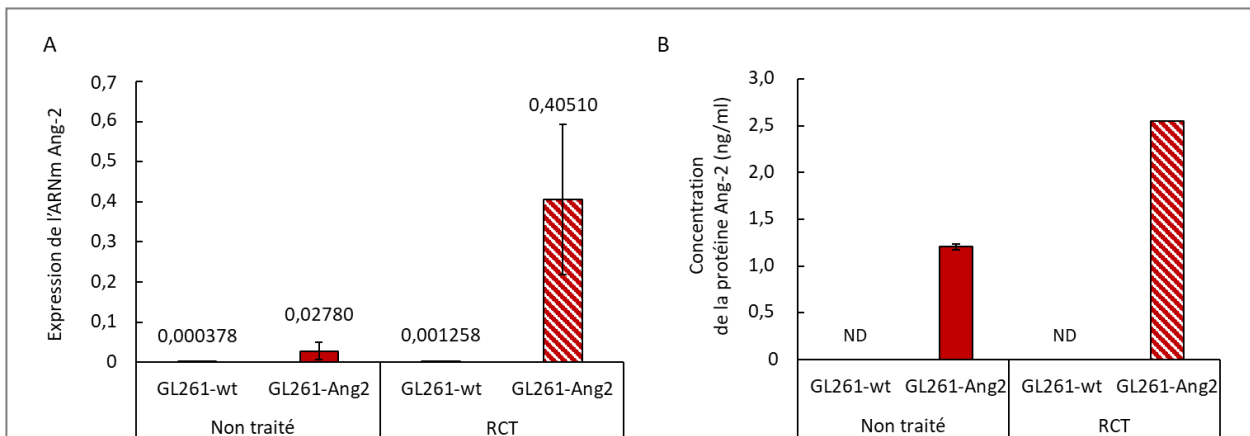


Figure 93 : Étude de l'effet de la radiochimiothérapie sur l'expression de l'Ang-2

A : Expression des ARNm d'Ang-2 normalisée par rapport à l'expression de la cyclophiline dans les cellules tumorales GL261-wt et GL261-Ang2, 48 h après une exposition ou non à la radiochimiothérapie (RCT). Moyenne \pm écart-type, N=2 par condition. **C** : Concentration de l'Ang-2 dans le surnageant des cellules tumorales GL261-wt et GL261-Ang2 exposées ou non à la RCT et déterminée par un test ELISA après 48 h de culture. Moyenne \pm écart-type, N=2 pour les conditions sans traitement et N=1 pour les conditions RCT. ND : non détectable.

Ce résultat suggère que, lors de la progression tumorale, la surexpression de l'Ang-2 sera renforcée par le traitement de RCT pour les tumeurs issues de l'implantation des cellules GL261-Ang2 et que cette cytokine pourra, en exerçant un effet paracrine sur le compartiment vasculaire et/ou inflammatoire, contribuer à moduler la réponse de ces deux compartiments à la RCT. Nous avons cherché à vérifier cette hypothèse lors de l'étude présentée ci-après.

L'article issu de cette étude illustre les principaux résultats obtenus lorsque les animaux porteurs de tumeurs GL261-Ang2 ont été exposés à la RCT. Une étude en cinétique a permis de rechercher le bénéfice thérapeutique de cette combinaison de traitement en évaluant la progression tumorale et la survie des animaux. Les effets de cette modalité de traitement sur le compartiment vasculaire et inflammatoire ont été analysés au temps J14 post-implantation des cellules tumorales. Ce temps d'analyse a été choisi afin de se situer dans une phase précoce post-traitement. Ces études menées *in vivo* ont été complétées par des études *in vitro*.

Cette étude ayant été menée en cinétique, des résultats complémentaires à ceux présentés dans l'article, sont exposés en fin de cette **partie 3** des résultats.

III.3 Article

**Angiopoietin-2 improves the efficacy of radiochemotherapy
in a preclinical glioblastoma model
by acting on angiogenesis and inflammation**

Charly Helaine, Aurélie E. Ferré, Marine M. Leblond, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin,
Samuel Valable, Edwige Petit

FRONT MATTER

TITLE

Angiopoietin-2 improves the efficacy of radiochemotherapy in a preclinical glioblastoma model by acting on angiogenesis and inflammation

AUTHOR LIST AND AFFILIATIONS

Charly Helaine¹, Aurélie E. Ferré¹, Marine M. Leblond¹, Elodie A. Pérès¹, Myriam Bernaudin¹, Samuel Valable¹, Edwige Petit¹

¹ Normandie Univ, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy group, GIP Cyceron, Caen, France

CORRESPONDING AUTHOR

Pr Edwige Petit: CERVOxy team - ISTCT Unit, GIP Cyceron, Boulevard Henri Becquerel, BP 5229, F-14074 Caen, France.

Phone: +33 (0)2 31 47 01 05

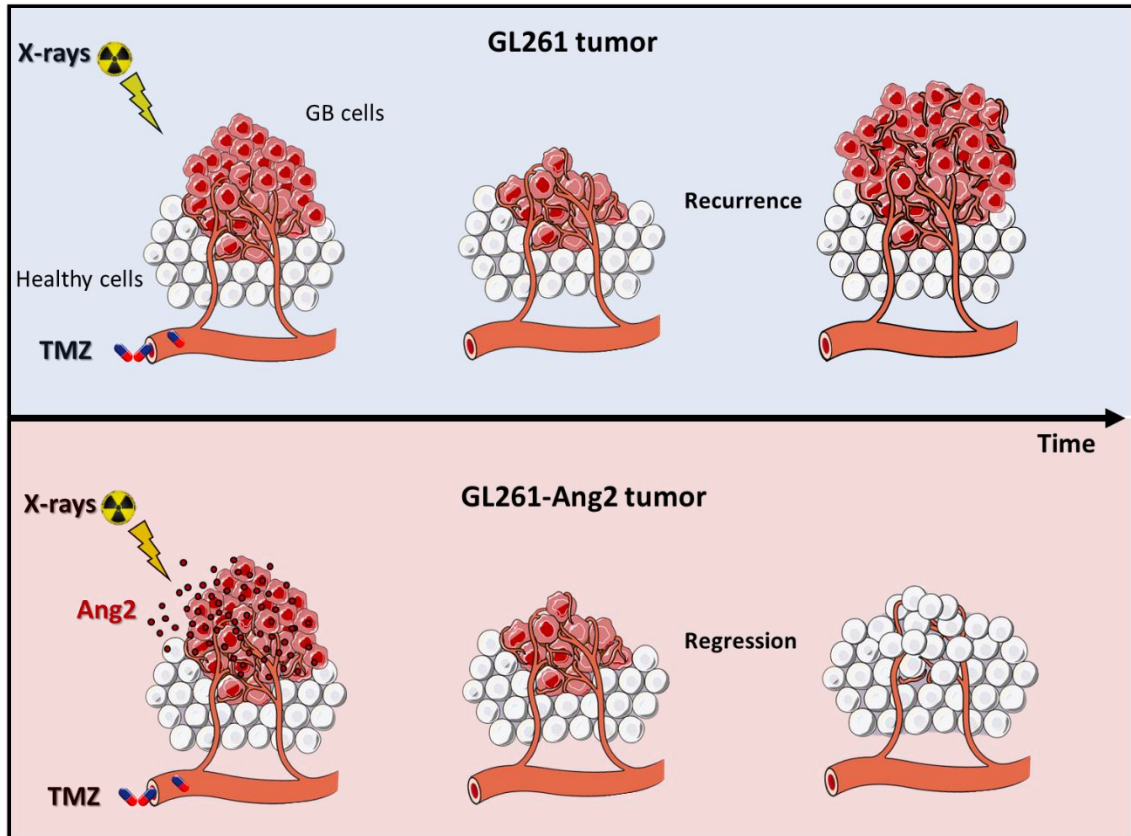
Email: epetit@cyceron.fr

ABSTRACT

Glioblastoma (GB) is a highly angiogenic tumor with poor prognosis despite radiochemotherapy (RCT). Evidence suggest that RCT induces vascular change and inflammation, which contribute to GB recurrence. Angiopoietin-2 (Ang2) is a crucial angiogenic factor in GB also involved in inflammation. Our aim was to clarify the role of Ang2 in RCT-induced changes in tumor environment. The effect of Ang2 overexpression in tumor cells was studied on the GL261 syngeneic immunocompetent model of GB in response to fractionated RCT. The overexpression of Ang2 improves the efficacy of RCT leading to a complete tumor clearance by acting on the tumor, vascular and immune compartments. *In vitro*, Ang2 overexpression in GL261 cells exposed to RCT promotes senescence and induces a robust genomic instability leading to mitotic death. Co-culture experiments of GL261-Ang2

cells with RAW 264.7 cells resulted in significant increase in macrophage migration, which was abrogated by addition of soluble Tie2 receptor. Together these preclinical results suggest that besides its angiogenic properties, Ang2, by acting on inflammation, improves the efficacy of conventional RCT in preclinical GB model, preventing tumor recurrence.

GRAPHICAL ABSTRACT



KEYWORDS

Glioblastoma – Angiopoietin-2 – Vascularization – Inflammation – Microenvironment – Radiotherapy – Chemotherapy – Radiochemotherapy

RESEARCH MANUSCRIPT SECTIONS

INTRODUCTION

Glioblastoma (GB) is the most common and aggressive primary brain tumor in adults [1]. Standard treatment for newly diagnosis patients includes maximal safe resection followed by radiochemotherapy (RCT). RCT consists in fractionated radiotherapy (RT) combined to concomitant and adjuvant cure of chemotherapy (CT) based on Temozolomide (TMZ), known as Stupp's regimen [2]. Despite this intensive multimodal treatment, GB patients constantly develop tumor recurrence and their median survival rarely exceeds 15 months [3]. The limited therapeutic benefit in patients can be attributed to inherent GB cell resistance but also to an abnormal tumor microenvironment, such as vascularization and inflammation [4].

GB progression is highly dependent on its vascularization and the intense and aberrant tumor angiogenesis correlates with poor prognosis of patients [5, 6]. The major role of tumor microenvironment in tumor progression and treatment efficacy prompted to the development of novel therapeutic options such as anti-angiogenic therapies. Due to its central role in angiogenesis, inhibition of VEGF (*vascular endothelial growth factor*) with Bevacizumab, a humanized monoclonal antibody, was approved for recurrent GB in 2009 and recently as first-line treatment association with RCT for newly diagnosed GB. However, early promising results with angiogenesis inhibitors gave way to disappointment [7, 8]. Indeed, those tumors present transitory response followed by an escape to anti-VEGF treatment and a restoration of tumor progression [9]. This is mainly attributable to the overexpression of alternative pro-angiogenic factors that contribute to an adaptive resistance as shown for Angiopoietin-2 (Ang2) [10]. Indeed, Ang2, up-regulated during tumor progression, is

associated with GB angiogenesis and is even described as a pre-requisite for the induction of angiogenesis in these tumors [11–14].

Ang2 belongs to the angiopoietin (Ang) family including two major members, Ang1 and Ang2, which act through a common tyrosine kinase receptor Tie2, but with antagonistic activities. Ang2 was originally thought to block the stabilizing effects of Ang1 on the vasculature, thereby facilitating the angiogenic response in presence of VEGF, or inducing vessel regression in the absence of VEGF [15]. Nevertheless, conflicting results were reported in the literature regarding the role of Ang2 in tumor angiogenesis and growth [16]. Similar contradictory results were also reported in GB suggesting a pro- or anti-angiogenic effect of Ang2 in tumors, depending on the context [17, 18].

In another hand, the tumor growth-supportive role of VEGF and Ang2 is not restricted to the vascular compartment but also to inflammation in various pathological contexts including cancers [19]. During inflammation, endothelial cells are critically involved in regulating vascular permeability and inflammatory cell recruitment [20]. This close correlation of angiogenesis and inflammation suggested the existence of molecules that trigger both angiogenesis and the recruitment of inflammatory cells. Evidence for the capacity of cytokines to interfere with inflammatory cell recruitment was previously described, notably for VEGF which attracts bone marrow–derived circulating cells [21]. In GB, the infiltrative myeloid population, including tumor-associated macrophages (TAM), is the major player of the innate immune system and can represent up to 30 % of the tumor mass [22]. These TAM were recently described as potential mediators of resistance to anti-VEGF therapy in these brain tumors since the degree of TAM infiltration is inversely correlated with survival among these GB patients [23]. Ang2, which is involved in the resistance to anti-angiogenic therapies in

recurrent GB, might also contribute to reprogram the tumor immune microenvironment [24, 25]. This cytokine, derived from endothelial cells, may promote macrophages and neutrophils infiltration in a paracrine manner dependent on either β 1-integrin and Tie2, respectively [26]. In GB, Ang2 might favor leukocytes infiltration by remodeling the tumor vasculature and the blood–brain barrier integrity [12]. In particular, Ang2 was recognized as a mediator of the homing of a subpopulation of pro-angiogenic TAM, identified as Tie2-expressing macrophages (TEM) in human GB [24, 27].

Based on the key complementary roles of Ang2 and VEGF in tumor angiogenesis, strategies targeting both angiogenesis pathways were initially introduced to overcome anti-VEGF treatment resistance. Accordingly, in a murine GB model, dual inhibition of VEGF and Ang2 decreased vessel density associated with a delayed tumor growth and a prolongation of animal survival [28, 29]. Consistent with their inflammatory-modulating function, the survival benefit of this dual therapy was also associated with TAM recruitment as well as the reprogramming of TAM from the pro-tumor phenotype (M2-like) toward the anti-tumor (M1-like) phenotype [29]. Although this multi-target therapy delays tumor growth, it fails to achieve a long-term inhibition of GL261 tumor growth. More importantly, the therapeutic benefit of this anti-angiogenic strategy was altered when combined with either CT or RT [30]. Vascular changes and a tumor growth slow-down were observed only when the anti-Ang2/VEGF-treatment was associated with TMZ. For RT, the best efficacy was obtained with anti-VEGF alone whereas RT is known to increase Ang2 in the brain [31]. The discrepancy of these results might reflect the context-depend effect of Ang2. To date, the role of Ang2 in tumor microenvironment remodeling in response to RCT treatment is not clearly established. Since Ang2 is upregulated during GB progression, as well as in response to brain RT, we

speculate that this pleiotropic cytokine might play a pivotal role in the remodeling of the inflammatory environment in response to RCT. To clarify this point, we generated Ang2-overexpressing GL261 cells and characterized the evolution of tumor growth, as well as inflammation and vascularization, in response to RCT.

RESULTS

Ang2 overexpression in glioblastoma cells combined to radiochemotherapy results in improved survival of mice bearing brain tumor

To recapitulate the high level of Ang2 observed in GB patients [12], we generated a stable glioma cell line overexpressing Ang2 (GL261-Ang2) and verified the efficacy of the transfection at the mRNA level, and the corresponding protein expression (**Figure S1 A,B**). Both cell lines exhibited a similar cell cycle distribution (**Figure S1C**).

We next studied the influence of Ang2 overexpression on tumor growth and its response to radiochemotherapy (RCT), following the protocol presented on **Figure 1A**. Tumor growth rate was monitored using T2w MRI. No difference in tumor growth was observed between untreated GL261-Ang2 and GL261-wt groups (**Figure 1B,C**) while GL261-Ang2 cell line showed a slight slow-down in growth rate compared to GL261-wt cells *in vitro* (**Figure S1D**).

When the tumors reached an equivalent volume of about 2 mm³ (*i.e.* at 7 days post-cell implantation), animals were treated three times with TMZ (10 mg/kg/day, *i.p.*) combined to RT (4 Gy/day) at 7, 9, 11 days. Both groups showed a similar response to RCT with a tumor regression 10 days after the last fraction of treatment (**Figure 1C**). As illustrated on MRI images (**Figure 1B**, D14 and D18), the presence of necrosis in the core of tumors attested of the treatment-induced cell death. Although RCT exhibited a significant effect, this one is transient and recurrence occurred 14 days after the end of treatment in the GL261-wt group.

Interestingly, Ang2 overexpression potentiated the cytotoxic effect of RCT and this effect was maintained at least during 3 months post-treatment (**Figure 1B,C**). According to these results, there was a significant survival improvement in the treated group with the combination of Ang2 overexpression and RCT. For the four groups of animals, the untreated GL261-Ang2 and GL261-wt had a median survival of 17 days and 18 days respectively (**Figure 1D**). RCT alone significantly improved the median survival to 35 days. Impressively, when combining Ang2 overexpression with RCT, the median survival was still not reached up to 100 days, and 100 % of mice were alive at this time point. At the end of study (day 100), MRI analysis attested the complete tumor clearance (**Figure 1B**). We next studied whether the reduction of tumor growth was related to a vascular effect of Ang2 overexpression.

FIGURE 1

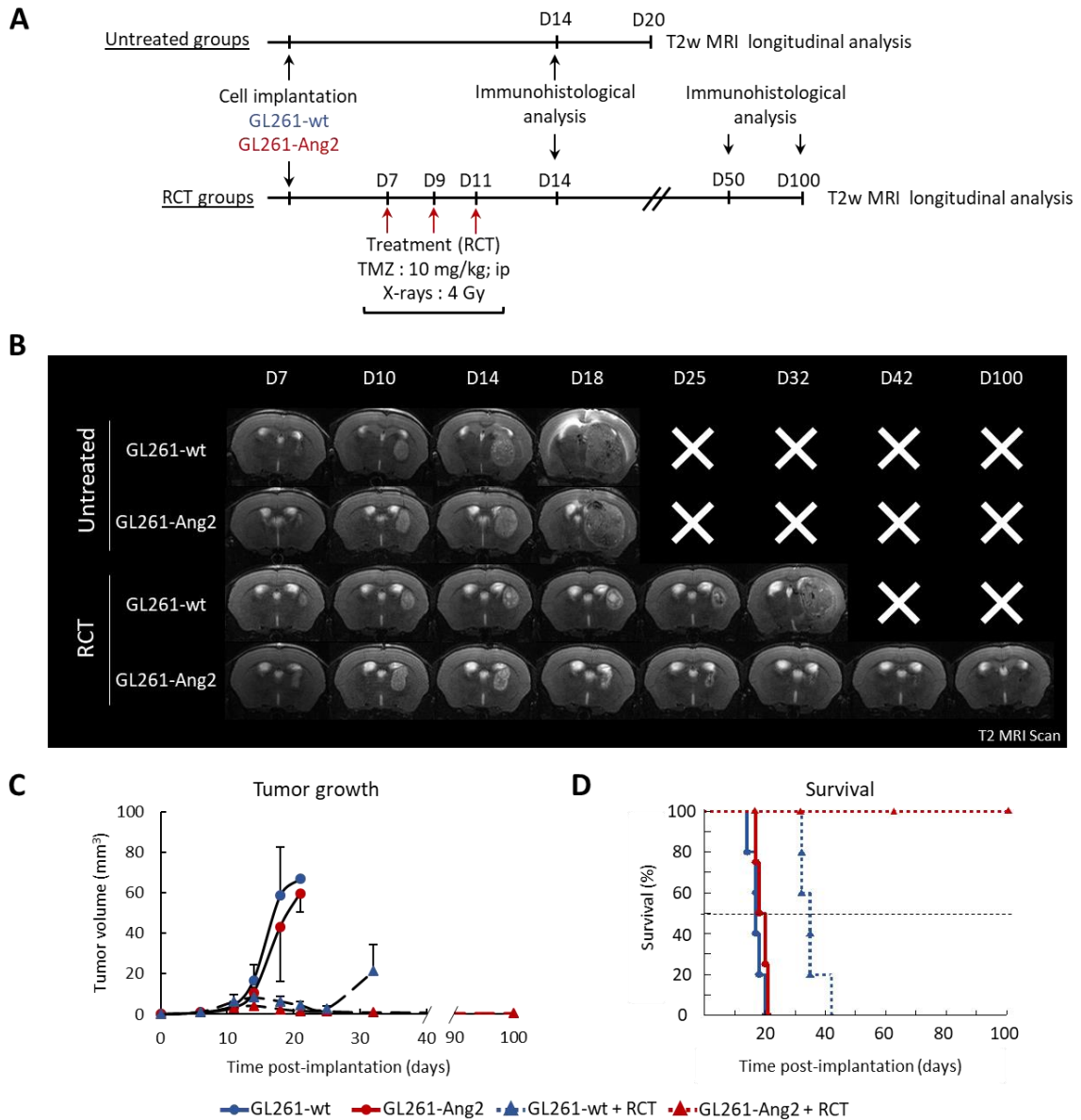


Figure 1: Combination of radiochemotherapy and Ang2 overexpression in glioblastoma cells improve animal survival and induce complete clearance of the brain tumor.

(A) Experimental protocol to compare the tumor progression of GL261-wt and GL261-Ang2 glioblastoma models (untreated groups) and in response to RCT (RCT groups); (B) Longitudinal representative image in T2-weighted MRI for the four tumor groups; (C) Longitudinal MRI tumor volume follow-up. For the two GL261-wt groups (untreated and RCT), mean \pm SD, $n=5$ and for the two GL261-Ang2 groups (untreated and RCT), mean \pm SD $n=4$; (D) Comparative Kaplan-Meier survival curves for the four tumors groups. GL261-wt group ($n=5$) and GL261-Ang2 group ($n=4$).

Ang2 overexpression in glioblastoma cells modulates the tumor vascular change induced by radiochemotherapy

We first examined the blood vessel morphology and density in the tumors among the four groups of animals at D14 post-implantation (*i.e.* 3 days after the last fraction of RCT). This time was chosen because it corresponds to an early post-treatment period, allowing the detection of potential early differences in the tumor microenvironment between the groups. **Figure 2** depicts the presence of typical vessels in tumors derived from the four groups and in the corresponding healthy contralateral hemisphere. Without treatment, as expected, the quantitative analysis revealed that the vascular area of GL261-wt and GL261-Ang2 tumors was larger than that of the healthy tissue (dash line) ($p < 0.05$) (**Figure 2B**), a characteristic of tumor vessels. These vessels were tortuous and display an abnormal shape (**Figure 2A**). The quantitative analysis confirmed a larger diameter of tumor vessels ($p < 0.05$) compared to healthy tissue (**Figure 2C**). When the tumors were exposed to RCT, the evolution of tumor vascularization was also different between the two groups. Whereas the vascularization of the GL261-wt tumors was not affected by the treatment, the vascular density decreased for GL261-Ang2 tumors treated with RCT (**Figure 2A,B**). In response to RCT, GL261-wt and GL261-Ang2 tumors displayed a vascular network similar to that of the untreated GL261-wt. These vessels of the GL261-wt and GL261-Ang2 groups remained enlarged even after treatment relative to those of the healthy tissue (**Figure 2C**).

Collectively, these results suggest that the vascularization induced during the growth of GL261-Ang2 tumors is more sensitive to RCT than those of the control tumors.

FIGURE 2

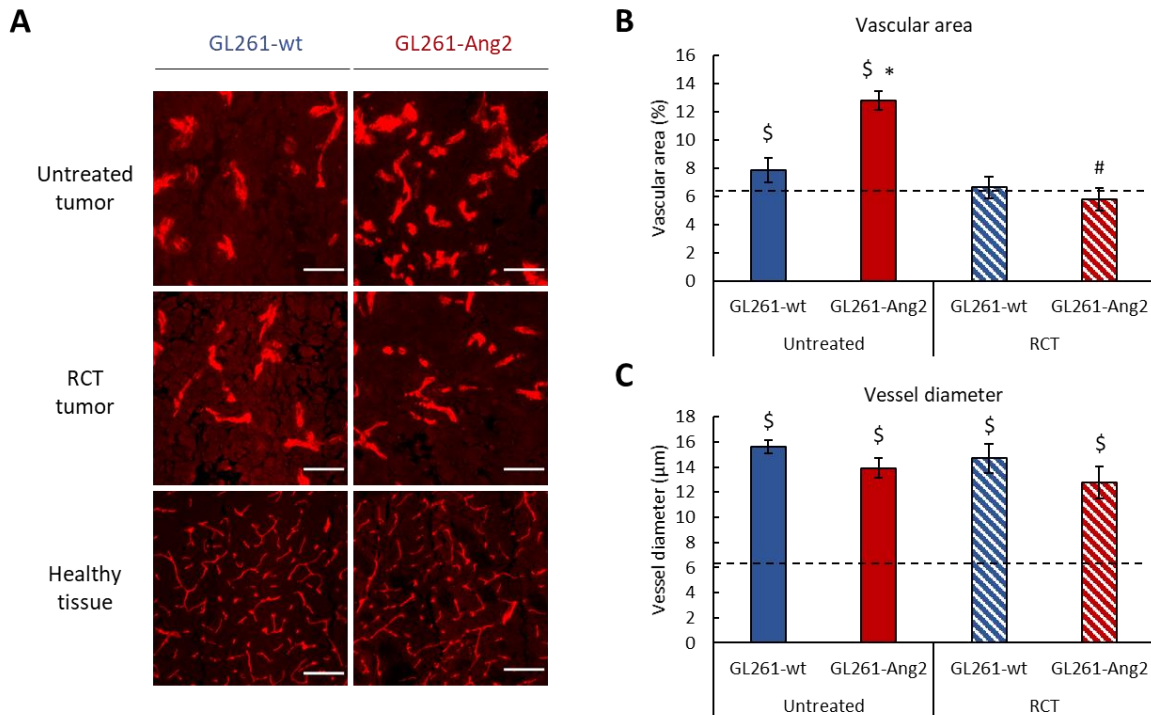


Figure 2: Ang2 overexpression in glioblastoma cells increase the tumor vascular regression induced by radiochemotherapy.

Tumor vascularization was studied at 14 days post-cell implantation, by CD31 immunostaining and the blood vessels were quantified in healthy contralateral hemisphere and in tumors of GL261-wt and GL261-Ang2 groups, treated or not with RCT. **(A)** Representative images of CD31 immunostaining in the tumor core of GL261-wt, GL261-Ang2 and in healthy hemisphere. Scale bar = 100 μm; **(B)** Quantitative analysis of vascular area. **(C)** Quantitative analysis of vessel diameter. Dotted line correspond to the mean of healthy tissue. $n=3$ animals for each group. Mean \pm SD * $p<0.05$ vs GL261-wt group, # $p<0.05$ vs corresponding untreated group, \$ $p<0.05$ vs healthy tissue ANOVA followed by Tukey's test.

Ang2 overexpression in glioblastoma cells combined to radiochemotherapy favors immune cells infiltration in glioblastoma

We then evaluated if Ang2 might affect the recruitment of immune cells into GB. TAMs (CD68⁺) were identified in both untreated groups and to a similar extent (**Figure 3A**). The fractionated treatment has not changed the CD68⁺ number in GL261-wt tumors (**Figure 3A**). In contrast, when GL261-Ang2 tumors were exposed to RCT, the TAM density increased in tumor core at D14 (7.71 \pm 0.87 % vs 5.16 \pm 0.32 % in GL261-wt tumors, $p<0.05$) (**Figure 3A**). Of note, among the CD68⁺ cells, only few were detected in the tumor cores as Tie2⁺ at the studied

times (**Figure 3D**). On the other hand, 14 days following RCT, no difference was observed in myeloid cell population in the blood and in the spleen of tumor bearing mice (**Figure S2A**)

For T lymphocytes (**Figure 3B,C**), we did not detect any significant differences in the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells between GL261-Ang2 and GL261-wt tumors. However, a decrease of these immune cells (about 50 %), was observed after RCT for both animal groups (**Figure 3B,C**). In presence or not of RCT, the CD4⁺/CD8⁺ ratio (around 1-1.5/3) was in favor of the CD8⁺ lymphocytes in the GL261-wt as well as in GL261-Ang2 tumors whereas this ratio was inverted in the blood and in the spleen of tumor bearing mice (**Figure S2B**). No differences between the tumor groups was detected on the systemic inflammation in any conditions (**Figure S2A,B**), even if the spleen weight of the GL261-Ang2 bearing mice was significantly higher than GL261-wt bearing mice ($p < 0.05$) (**Figure S2C**).

These data suggest that, in response to RCT, GL261-Ang2 tumors displayed a more inflammatory environment than GL261-wt tumors. We next carried out an immunohistofluorescence study at a later time post-treatment when the tumor was no longer detectable by MRI, *i.e.* 42 and 100 days post-RCT (**Figure 1B, and 3E**). As illustrated on **Figure-3E**, microglia/macrophages (CD68⁺) and T cells (CD4⁺ and CD8⁺) are still detected in the microscopically visible residual core of the tumor (Hoechst).

FIGURE 3

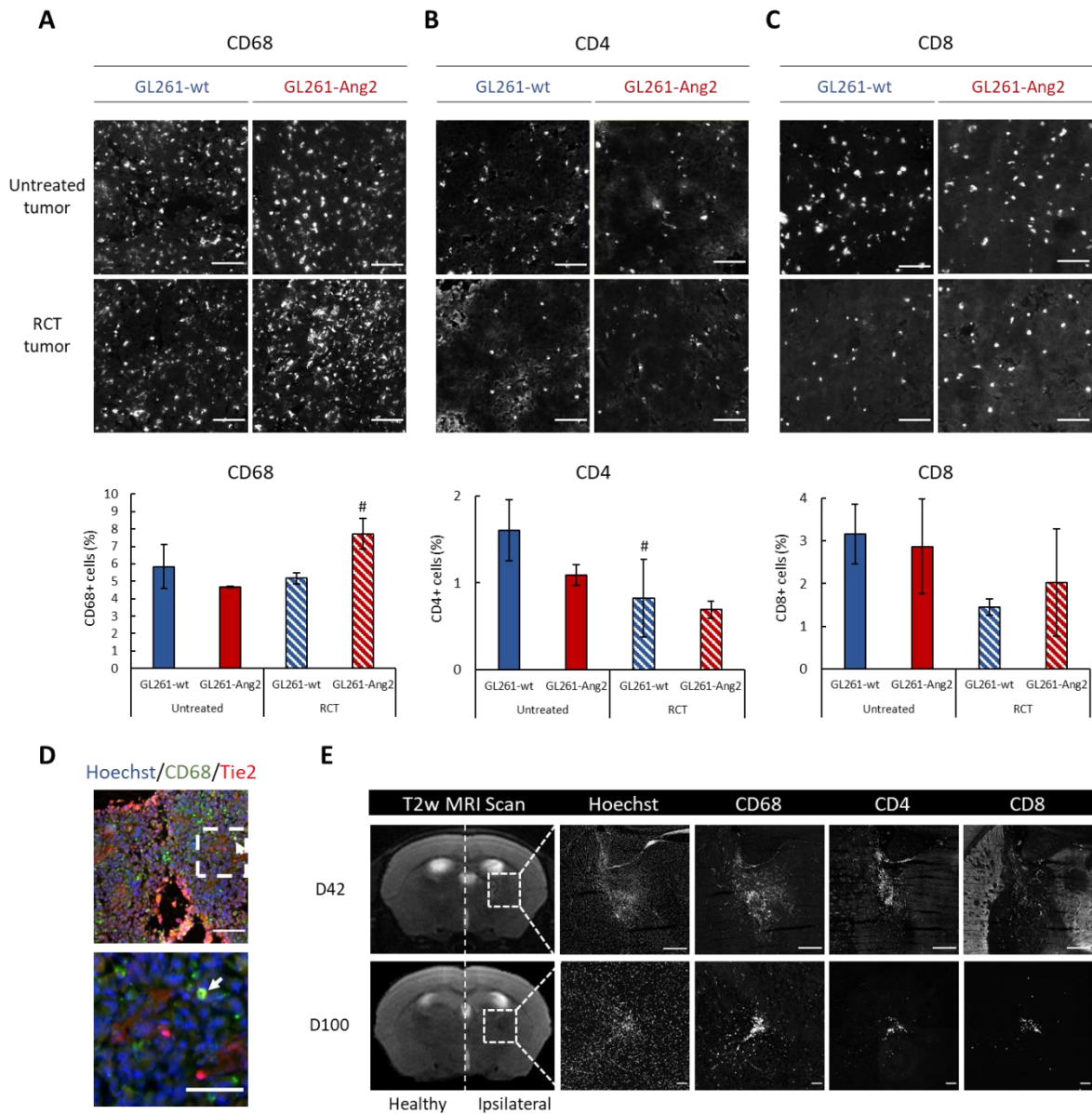


Figure 3: Ang2 overexpression in glioblastoma cell combined to radiochemotherapy favors inflammation in glioblastoma.

Tumor inflammation was studied in tumor core of both glioma models GL261-wt and GL261-Ang2 untreated or after RCT. **(A)** Representative images of CD68 immunostaining and quantification of CD68⁺ area; **(B)** Representative images of CD4 immunostaining and quantification of CD4⁺ area **(C)** Representative images of CD8 immunostaining and quantification of CD8⁺ area. Scale bar=100 μ m. $n=3$ animals for each group. Mean \pm SD # $p<0.05$ vs the corresponding untreated group, ANOVA followed by Tukey's test. **(D)** Representative images of CD68⁺/Tie2⁺ cells in GL261-Ang2 tumors bearing mice after RCT. Scale bar=100 μ m and 50 μ m for magnification. **(E)** Representative T2w images of the GL261-Ang2 tumor at D 42 and D100 post-RCT. Dotted lines delimit the residual tumor area and correspond to the representative images obtained from the immunohistochemistry study to detect immune cells (CD68⁺, CD4⁺ and CD8⁺). Scale bar=100 μ m.

Ang2 stimulates migration of macrophages *in vitro*

Our *in vivo* data suggest that Ang2 might stimulate the recruitment of myeloid cells in the murine glioblastoma model exposed to RCT. To evaluate whether Ang2 might exert a paracrine effect on macrophages, we performed *in vitro* migration assays on the macrophage murine RAW 264.7 cell line, which expresses the two Ang2 receptors, Tie2 and β 1-integrin (**Figure S3A, B**). The migration of RAW 264.7 cells toward Ang2 was first evaluated in response to increased concentrations of the mouse recombinant protein (rAng2) (**Figure 4A**). A dose-dependent effect of recombinant Ang2 was observed, being significantly with 400 ng/ml and 800 ng/ml of rAng2 ($p < 0.05$). It was partially reversed in presence of the soluble Tie2 receptor (FcTie2, $p < 0.05$) (**Figure 4A**), confirming the specificity of the effect of Ang2 on macrophages. We next performed similar experiments using GL261-wt or GL261-Ang2 cells exposed or not to RCT following the protocol illustrated on the **Figure S3C**. Compared to GL261-wt, a significant increase in RAW 264.7 cells migration was detected with GL261-Ang2 cells (**Figure 4B**). About 1.5 times more cells migrate under these conditions ($p < 0.05$). However, this effect was similar when GL261-Ang2 cells were pre-exposed to RCT, despite a slightly increase in migration of RAW 264.7 cells (**Figure 4B**). Importantly, like for the experiments with rAng2, the paracrine effect of Ang2 was reversed by the presence of the soluble receptor Tie2 ($p < 0.05$) (**Figure 4**).

These *in vitro* results indicate that Ang2 might exert a direct or indirect a chemotactic effect on macrophages.

FIGURE 4

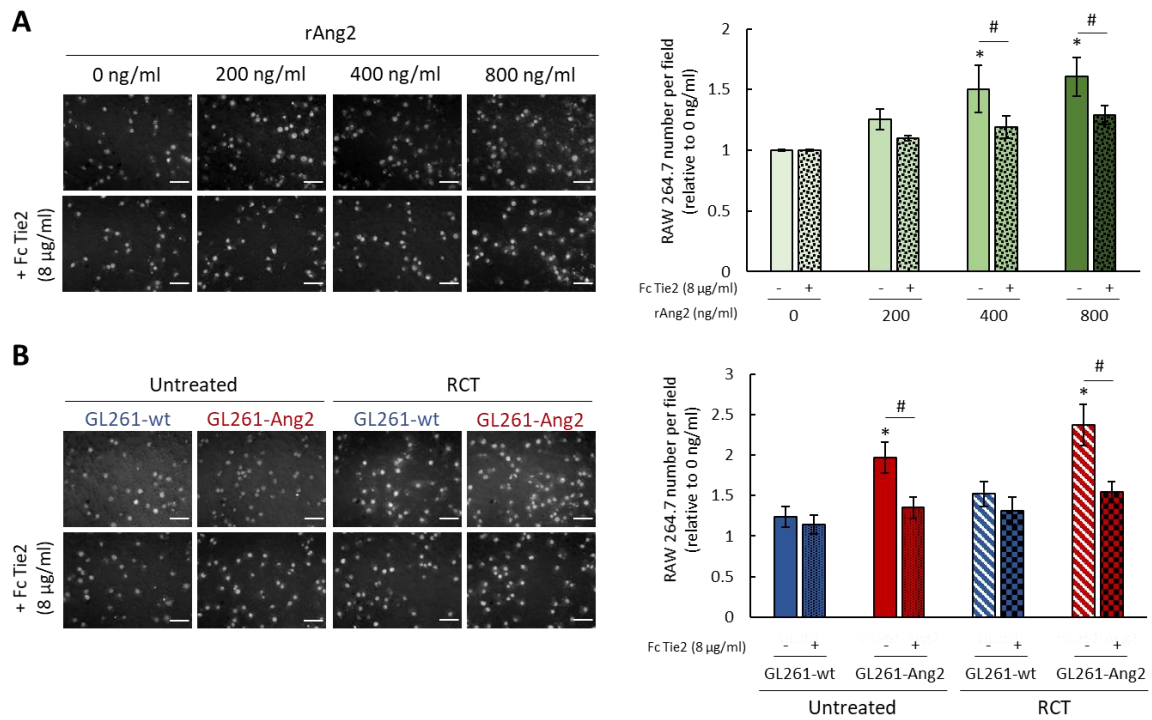


Figure 4: Ang2 induces macrophages migration *in vitro*.

(A) Representative images and quantification of migrated RAW 264.7 cells in response to recombinant Ang2. Scale bar=50 µm; Mean ± SD *p<0.05 vs 0 ng/ml Ang2, #p<0.05 vs Fc Tie2 condition, ANOVA followed by Tukey’s test; (B) Representative images and quantification of migrating RAW 264.7 cells in response to conditioned medium from tumor cells. Scale bar=50 µm; Mean ± SD, N=4 *p<0.05 vs GL261-wt group, #p<0.05 vs Fc Tie2 condition, ANOVA followed by Tukey’s test.

Ang2 overexpression in glioblastoma cells combined to radiochemotherapy promotes senescence and mitotic death of glioblastoma cells

We next sought to investigate the nature of the sensitization to RCT induced by Ang2 overexpression in glioblastoma cells, by focusing on glioma cell death. As depicted on **Figure 5A**, at D14 (*i.e.* 3 days after the last fraction of treatment), RCT induced cell nuclei changes in both tumor groups compared to untreated tumors. These changes included enlarged nuclei with prominent foci of heterochromatin along with cellular enlargement, some characteristics of the irradiation effects [32]. Morphometric analysis from the Hoechst staining showed a two-fold increase in the nuclei size for the treated GL261-wt cells compared

to untreated GL261-wt cells. However, this treatment-induced effect was particularly manifest for the GL261-Ang2 cells, as the size of nuclei can reach three times the one of untreated cells (**Figure 5A**). According to these characteristic morphological changes, we suspected a senescence phenotype for the treated tumors cells. To validate this hypothesis, GL261-wt and GL261-Ang2 cells were exposed to the identical fractionated RCT protocol that was used for *in vivo* experiments and were analyzed 5 days post-treatment. We confirmed that X-rays combined to TMZ caused the senescence of GL261-wt cells. However this phenomenon was amplified by Ang2 overexpression since the lysosomal beta-galactosidase activity is quantitatively more significant in GL261-Ang2 group compared to GL261-wt group ($p < 0.05$) (**Figure 5B**).

Cells in senescence may return to the cell cycle but in most cases, they may undergo cell death *via* apoptosis or mitotic death. Accordingly, we next addressed the question whether Ang2 might influence these cellular processes in response to RCT. We performed a flow cytometry study for both cell lines 5 days post-treatment (**Figure 5C**). Following RCT, both tumor cells accumulated in a similar proportion in the G2/M phase (about 40 % of cells) and in the subG1 phase (about 25 % of cells), suggesting the presence of apoptotic cells (**Figure 5C**). However, at this post-RCT time, we observed a decrease of tumors cells in G0/G1 phase which was more marked for GL261-Ang2 ($p < 0.05$) (**Figure 5C**). Moreover, we noted an increase in polyploid cells but this effect was more pronounced for GL261-Ang2 cells (13.49 ± 1.09 %) than in GL261-wt cells (9.28 ± 1.12 %, $p < 0.05$) (**Figure 5C**).

To strengthen this hypothesis, we also investigated the effects of the combined treatment on the DNA double-strand breaks by analyzing γ H2AX positive cells, since this persistence of γ H2AX foci, reflects the genomic instability and the presence of irreversible senescence

(Figure 5D). One of the consequences of such genomic instability might be analyzed by the presence of micronuclei. As illustrated on **Figure 5D**, five days post-RCT, cells of both groups displayed DNA damage (γ H2AX⁺ cells) and micronuclei. Nevertheless, the cell proportion with micronuclei was higher in GL261-Ang2 cells (64.33 ± 4.16 %) than in GL261-wt cells (37.33 ± 6.80 %, $p < 0.05$) (**Figure 5D**). All together, these results suggest that combined to RCT, an Ang2 overexpression in GB cells, increases the mitotic cell death induced by the cytotoxic treatment.

FIGURE 5

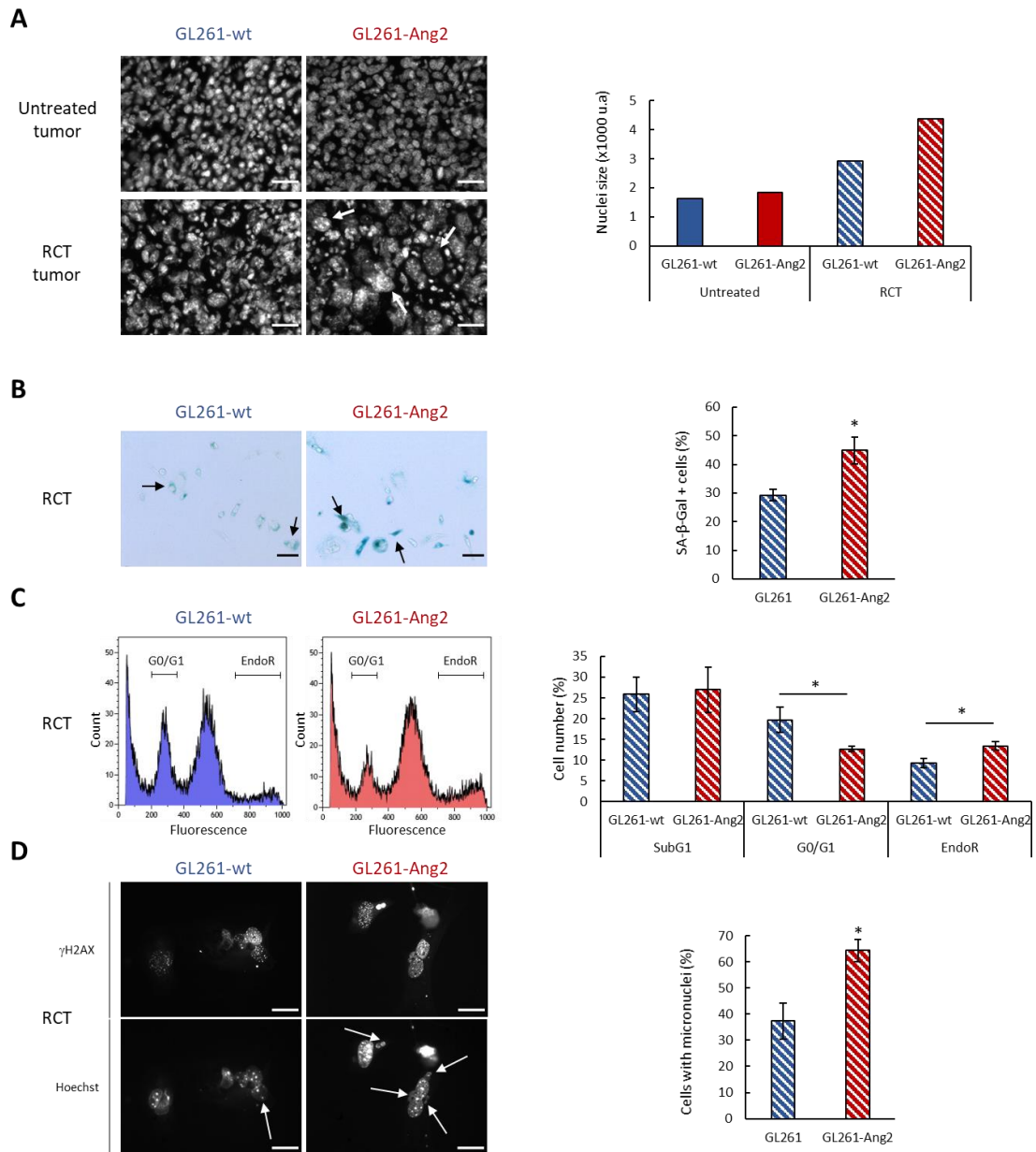


Figure 5: Ang2 overexpression in glioblastoma cells combined to radiochemotherapy modify cell death. (A) Representative photographs of nuclei (Hoechst) in the tumor core at D14 after cells implantation. Quantification of nuclei size for the four groups, N=1; (B) Representative photographs of senescent cells detected by β-galactosidase staining performed five days following the last dose of RCT on GL261-wt and GL261-Ang2 cells. The positive cells for senescence assay showed a blue coloration. Scale bar=50 μm. Quantification of senescence on tumor cells at five days after RCT. The proportion of β-galactosidase positive cells (arrows) was expressed relative to total cell number counted by phase contrast microscopy. Mean ± SD, N=3; *p<0.001 vs GL261-wt RCT group, Student’s t-test; (C) Cell cycle profile of tumor cells assessed at five days after RCT. Quantification of the cell distribution in SubG1, G0/G1 and EndoR phases of the cell cycle five days after RCT. Mean ± SD, N=3 *p<0.05 vs GL261-wt RCT group, Student’s t-test; (D) Representative photographs of DNA double-strand breaks and genomic instability linked to mitotic death and identified by the presence of micronuclei on GL261-wt and GL261-Ang2 cells five days after RCT. DNA double-strand breaks and cell micronuclei were identified respectively with γH2AX and Hoechst staining. Scale bar=50 μm. Quantification of mitotic death evaluated by micronuclei assay on GL261-wt and

GL261-Ang2 cells five days after RCT. The proportion of positive cells, having at least one micronucleus (arrows), was obtained relative to total cell number counted by Hoechst staining. Mean \pm SD, N=3 * p <0.05 vs GL261-wt RCT group, Student's t-test.

DISCUSSION

In this study, we gained insight in the paracrine role of Ang2 on the innate immune response of GB in response to radiochemotherapy (RCT). We showed, *in vitro*, that Ang2 displays chemotactic properties on macrophages, an effect that is potentiated in response to RCT. *In vivo*, our results indicate that, high level of Ang2 expressed by murine GL261 glioma cells favors a recruitment of TAM, when the tumors are exposed to RCT. Along with this infiltration of innate immune cells, the *in vitro* and *in vivo* data presented here suggest that Ang2 reinforces the efficacy of conventional treatments, by heightening the senescence of GB cells. On the long term, the tumors derived from GL261-Ang2 cells exposed to RCT totally regress and sustain an inflammatory environment 100 days post-treatment, which correspond to the last time-point of our study.

In GB patients, Ang2 upregulation is a biomarker of poor diagnostic [12], this cytokine being increased in the brain exposed to radiation [33] and in a sub-population of TEM accumulate around vessels after chemotherapy in cancer [34]. The main objective of our study was to evaluate whether Ang2 might modulate GB microenvironment in the presence of conventional treatment including radio and chemotherapy since we know that in addition to target tumor cells each of these therapeutic modalities can remodel the vascular and inflammatory microenvironment [35, 36].

To this end, genetically modified murine GB GL261 cells to overexpress Ang2 were orthotopically inoculated in mice brain. This syngeneic model allows to investigate, in addition to the vascularization, the contribution of the host immune system in tumor progression [37].

In addition, the tumor biology of GL261 displays the main characteristics of that of human GB and can be used to screen the response of GL261 tumors to different therapies relevant to the treatment of GB patient such as RCT [38].

On this model, our results are in favor of a beneficial effect of Ang2 when combined to a fractionated glioma treatment combining TMZ and X-rays. In contrast, without RCT treatment, no difference was detected between tumor progression and animal survival bearing GL261-Ang2 or GL261-wt tumors. Although a slight autocrine Ang2 effect on glioma cell proliferation was observed *in vitro*, the major *in vivo* effects might be attributable to a paracrine effect on the vascular and inflammatory compartments. Indeed, we presented evidence that the overexpression of Ang2 by GB cells promotes an increase in tumor vascularization compared to control tumors in the exponential phase of growth (D14). However, in both tumors, the vessels are destructured and enlarged compared with normal vessels of the healthy brain tissue. At this time of tumor growth, by a morphological histological study, we could not depict vascular pseudo-normalization or regression that we and other previously observed on the rat 9L gliosarcoma model using a similar *in situ* Ang2 overexpression approach [17, 18]. Ang2 is known to have a complex and contradictory role during tumor angiogenesis. The discrepancy between these effects could be explained by the different levels of Ang2, which could lead to different outcomes [39]. However, in this GL261 model and according to Scholz et al. [12], the overexpression of Ang2 induces vascular changes but did not modify the overall survival of the mice.

In response to RCT, the vascularization regressed in both groups of tumors to reach a similar density but with a more pronounced effect on the GL261-Ang2 tumor bearing mice. In GB patients, the abnormal vascularization of the tumors renders this brain tumor less susceptible

to standard chemotherapy (TMZ) and radiotherapy (X-ray). Although GL261-Ang2 and GL261-wt tumors displayed disorganized and enlarged vessels, the therapeutic effect of RCT was transient in the control tumor group, whereas it was drastically prolonged in the GL261-Ang2 tumor. No recurrence was observed 3 months post-RCT which corresponds to the last time point studied.

In addition to its function on the vasculature compartment, Ang2 also contributes to the myeloid cell infiltration in settings of inflammation and tumors [12, 40]. It was previously showed that the overexpression of Ang2 in endothelial cells which leads to an immature vascular phenotype supports the recruitment of inflammatory cells [12]. In our model, we showed that the inoculation of GL261-Ang2 cells, does not increase the presence of TAM as compared to control tumors. However, in response to RCT, the TAM density specifically increased in these GL261-Ang2 tumors. The suspected chemotactic effect of Ang2 was further demonstrated *in vitro* in migration assays using either the recombinant cytokine or conditioned medium from GL261-Ang2 tumor cells. Our *in vitro* and *in vivo* results are in line with those of Cortes-Santiago et al.[24] although they also suggest that the attractant properties of Ang2 is not restricted to TEM as also demonstrated by Murdoch et al. [41].

The enhanced monocyte infiltration in Ang2-overexpressing tumors could be due to indirect effects via changes in the tumor-associated vasculature induced by Ang2. In the present study, Ang2 overexpression combined to RCT induced a vascular regression, which could lead to hypoxia in the GL261-Ang2 tumors [40]. Hypoxia might favor monocyte extravasation, attraction, and/or retention in the tumor microenvironment in a TIE2-independent manner. Accordingly, in a previous study, using two models of human GB, highly different in terms of oxygenation, we showed that the degree of CD68⁺ cells into the tumor was related to the

depth of hypoxia [42]. Monocytes migration might also be mediated by the hypoxic upregulation of stromal cell-derived factor-1 [27], which is a potent TAM chemoattractant in various tumor models [43, 44]. Nevertheless, our *in vitro* data from migration assay speak also in favor of a direct chemoattraction of TAM by Ang2. The molecular signaling remains to be identified.

On another hand, we confirmed that RCT led to lymphopenia but to a similar extend in both tumor groups suggesting that Ang2 does not modify T-cell responses in these experimental conditions. Others described that Ang2 may stimulate TEM to acquire an immunosuppressive function in tumors by acting on Treg activation [45]. We speculate that in absence of a substantial population of TEM, the microenvironment of the GL261 tumors is not favorable to sustain an immunosuppressive state. Like for the vascular effect described above, we cannot exclude that the discrepancy between the results of studies on similar GL261 model might be due the different levels of Ang2 [12, 40]. However, our results also warn that to assess the effect of a molecule with therapeutic potential, it is necessary to integrate a treatment protocol similar to that used in the patient. In addition, according to single or combined treatment (RT plus CT), and to the fractionated protocols of RT (hypo-fractionated and normo-fractionated), the effects on induction or attenuation of antitumor immune response will be controversial [46, 47].

Interestingly, the fractionated protocol used in this study, applied on GL261-Ang2 tumors led to the tumor clearance. When we studied the cytotoxic effect of the combined therapy, we showed that RCT induced senescence in glioma cells and that Ang2 potentiated this effect. Induced senescence has been widely described when tumor cells are treated by various therapeutic agents, including chemotherapies and ionizing radiation. Cells exhibiting

senescence can be targeted and cleared by the components of immunological system, including macrophages, NK cells and T-lymphocytes [48]. Ang1 and Ang2 have been involved in senescence in endothelial cells [49]. However, we described for the first time, that Ang2 on glioma cells might exert this effect when the cells were exposed to RCT. A role for the adaptive immune system in the elimination of senescent cells from melanoma irradiated tumors has been reported. [50]

Here, although, we did not characterize the SASP phenotype of these cells in vivo, we observed a sustained infiltration of lymphocytes as well as inflammatory cells, resulting in eliminating tumors. In line with an active immune response in animal bearing treated-GL261-Ang2 tumors, the spleen weight of these mice indicates that these treated tumors might induce higher levels of splenocyte proliferation.

RCT produced long-term survival in mice bearing GL261-Ang2 tumor. Few studies argue in favor a beneficial anti-tumor effect of this cytokine in GB models [17, 18]. In contrast, Ang2 was identified as a resistance factor to anti-VEGF [10, 12, 28] and also shown to mediate the homing of macrophages in human GB [12, 51, 52]. Accordingly, recently, Ang2/VEGF bispecific antibodies have been developed to overcome the anti-VEGF resistance of GB patients and stimulate the host immune as well. However, when tested in combination with conventional GB patient treatments, while TMZ chemotherapy benefits most from combination with anti-Ang2/VEGF, radiotherapy does only from anti-VEGF [30]. Presently, no study has evaluated the therapeutic benefit of combined anti-Ang2/VEGF with RCT. The results presented here suggest that the vascular and immune properties of Ang2 not only probably depend on the concentration of this cytokine in the tumor but also of the evolution of the tumor microenvironment (vascularization, inflammatory compartment) which will be remodeled by the combined radio- and chemotherapy. Altogether, these studies [12, 45, 53], underline the

need to include all the modalities of the standard treatment to better screen and characterize new therapeutics for GB.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The murine glioblastoma cell line GL261 [NCI-DCTD (Division of Cancer Treatment and Diagnosis), Repository] and murine macrophage cell line RAW 264.7 [ATCC (American Type Culture Collections)] were used in this study. GL261 cells were maintained in RPMI medium (Roswell Park Memorial Institute, Sigma Aldrich) supplemented with 10 % fetal calf serum (Eurobio), 2mM glutamine (Gln, Sigma Aldrich) and 1 µg/ml penicillin/streptomycin (P/S, Sigma Aldrich) at 37°C with 5 % CO₂, 95 % air. RAW 264.7 cells were grown in DMEM 4.5 g/l of glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich) supplemented with 10 % fetal calf serum, 4mM Gln and 1 µg/ml P/S at 37°C in 5 % CO₂, 95 % air.

Stable establishment of GL261 cells overexpressing Ang2

A pCMV6 Kan/Neo expression plasmid was employed for GL261 cells transfection. This construct vector containing murine Ang2 cDNA, carried out in the laboratory, was transfected into GL261 cells at 80 % confluence, by lipofection using lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. Cells expressing pCMV6-K/N-Ang2 (GL261-Ang2) were selected 2 days later with geneticin (G-418, Sigma Aldrich) at 400 µg/ml. GL261-Ang2 cells were grown in RPMI medium and monthly selected with G-418. Ang2 mRNA overexpression was routinely checked by qRT-PCR.

Glioblastoma preclinical model

Animal investigations were performed under the current European directive (2010/63/EU). Ethical approval was obtained by E.P and S.V from the regional committee (CENOMEXA) and the French Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation with the autorization APAFIS#12496. This tumor model is based on an orthotopic injection of GL261-wt or GL261-Ang2 cells in the right striatum of C57BL/6 mice (male, 20-23g, Janvier laboratories). Anesthesia in mice were induced with 5 % of isoflurane in 70 % N₂O and 30 % O₂ and then were maintained at 2 % during surgery. Mice were placed on a stereotactic head holder and a cranial perforation was realized at 2 mm lateral to the bregma. Glioblastoma cells (1x10⁶ cells in 3 µl of 2 mM Gln-phosphate buffer saline) were then injected at depth of 4mm with 30G needle and standardized flow 0.6 µl/min during 5 min. Needle was removed 5 min later to avoid cells reflux. Injection of buprenorphine (Buprecare, 0.05 mg/kg, sc) were administered in perioperative phase.

Tumor volumes were evaluated longitudinally by magnetic resonance imaging (MRI, 7T MRI, Bruker, CYCERON biomedical imaging platform, Caen, France). Animals were anesthetized with isofluroane as described above and placed inside the magnet for acquisition with T2w sequence. The MRI scan properties are follows: T2w *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement* (RARE), acceleration factor of 8; TR/TE_{eff}=5000/60 msec ; average=1 ; 20 slices de 0.5 mm thick ; spatial resolution=0.07x0.07 mm ; acquisition time : 2 min. MRI images analyses were completed on ImageJ software [54].

***In vivo* radiochemotherapy**

In vivo radiochemotherapy (RCT) started seven days after glioblastoma cells implantation, when tumor size around 2-5 mm³. Mice were treated thrice with chemotherapy (TMZ, Sigma Aldrich, T2577) and radiotherapy (X-rays). Each fraction of RCT was spaced of 48 h. TMZ (10

mg/kg/day in saline) was administered intraperitoneally. Control animals received same volume of saline solution (vehicle). Two hours later, ipsilateral hemisphere of mice was irradiated with the X-RAD225 Cx system (Precision X-ray Irradiation, PXI) at 4 Gy/day with a dose rate of 3.3 Gy/min. The characteristic of the photon beam delivered by this small animal irradiator were: voltage=225 keV , intensity=13.3 mA and energy=80keV by using 1mm Cu filter. The schedule of protocol is illustrated in **Figure 1A**.

Immunohistofluorescence

At the end of protocol, mice were deeply anesthetized and transcardially perfused with cold heparinized saline solution. Brains were removed and immediately snap-frozen in *n*-pentane (Sigma Aldrich) and stored at -80°C. Thereafter, brains were cut on a cryostat to obtain serial coronal sections of 30 µm. Brains sections were collected on superfrost slides (Thermo Fisher Scientific) and were post-fixed 20 min in 4 % paraformaldehyde (PFA 4 %, Sigma Aldrich). Slices were blocked 2 h at room temperature with PBS-0.5 % triton X100 (Sigma Aldrich)-0.1 % tween (Sigma Aldrich)-3 % bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich) and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: rat anti-CD31 (1:100, BD Biosciences, 553370), rat anti-CD68 (1:800, Abcam, ab53444), rat anti-CD4 (1:100, BD Biosciences, 550278), rabbit anti-CD8 (1:100, Abcam, ab217344), rabbit-anti-Tie2 (1:200, Santa-Cruz, sc-324) in PBS-0.5 % triton X100-0.1 % tween-1 % BSA. Primary antibody was revealed with an Alexa-555-conjugated anti-rat (1:500, Invitrogen, A21434) or an Alexa-555-conjugated anti-rabbit (1:500, In vitrogen, A21428) in PBS-0.5 % triton X100-0.1 % tween-1 % BSA containing 33342 Hoechst (10 µg/ml, Sigma Aldrich). Slices were then coverslipped with mounting medium Aqua-PolyMount (Tebu-Bio) and acquired at x10 magnification with epifluorescence microscope Leica DMI8S (Leitz Leica).

Images analysis and quantification

All analyses were performed with regions of interest (ROI) of 736x736 pixels or 468x468 μm , chosen randomly and representative of whole tumor. Images were then binarized with ImageJ software [54] after applying an automatic threshold. The results obtained were represented as the percentage of immunostaining in the ROI. The blood vessel analysis was examined with an ImageJ plugging developed in-house [18], which was provided the vascular density and the average diameter of vessels.

***In vitro* radiochemotherapy**

For *in vitro* experiments, 3 fractions of RCT, spaced of 48 h was applied. Tumor cells were exposed to 100 μM TMZ which was brought in fresh medium followed by an exposition to X-rays at 4 Gy with dose rate of 2 Gy/min (X-RAD 225Cx irradiator).

Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was studied by flow cytometry (SFR ICORE, University of Caen platform, France). Propidium iodide (Beckman Coulter SAS) staining was realized according to manufacturer's instruction and detected with Gallios™ flow cytometer (Beckman Coulter SAS). All analyses were performed on a minimum of 10 000 events and analyzed with Kaluza® Flow Analysis Software (Beckman Coulter SAS).

SA- β -Galactosidase assay

Senescence was determined based on alterations in cell morphology (enlargement and flattening) and expression of a pH-dependent β -galactosidase [55]. Senescence associated- β -Galactosidase staining (SA- β -gal, Cell Signaling, 9860S) was employed according to manufacturer's instructions 5 days after the last treatment with RCT.

Migration assay

For transwell migration assay (5 μ m, Sarsted), RAW 264.7 cells were plated in DMEM medium with 0.5 % fetal calf serum to the top chambers of transwell which was then added in 24-wells plate containing GL261 cells treated by RCT 24h upstream or not. For conditions with cytokine, recombinant Ang2 (R&D Systems, 7186-AN) was added 30 min before seeding RAW 264.7 cells with increasing doses of 0, 200, 400 and 800 ng/ml in medium containing 0.5 % serum. To evaluate Ang2 contribution, Fc Tie2 at 8 μ g/ml (R&D Systems, 762-T2) was added 30 min before adding the transwell into the plate. Top cells were removed and bottom cells were stained 5 min in 33342 Hoechst solution (10 μ g/ml). Images were acquired on a Leica Aristoplan microscope (Leitz Leica) with a 25X objective. Migration quantification was evaluated by counting the number of migrated cells with 5 microscope fields of view.

Immunocytochemistry

Glioblastoma cells were plated in 24-well plates on coverslips. Five days after RCT, cells were fixed with 4 % PFA and blocked with PBS-0.1 % tween-3 % BSA for 1 hour at room temperature. Then cells were incubated overnight at 4°C with the primary antibody phospho-histone H2AX (ser139) (1:200; Cell Signalling Technology, 2577S) in PBS-0.1 % Tween-1 % BSA. Primary antibody was revealed with an Alexa-555-conjugated anti-rabbit (1:500, In vitrogen, A21428) in PBS-0.5 % triton X100-0.1 % tween-1 % BSA. Cells were counterstained with 33342 Hoechst (10 μ g/ml) for nuclear staining. A micronucleus assay was performed from Hoechst 33342 staining and a cell with at least one micronucleus was considered positive. All immunocytochemical markers were observed on epifluorescence microscope Leica DMI8S with a 25X objective. For each condition, at least 3 coverslips were analyzed. Images from 5 representative high-power fields per slide were acquired.

Statistical analysis

All data were represented as the mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were performed with Statistica® (Tibco Software Inc ;USA). Tests used and the number of experiments are detailed in each figure legend.

CONCLUSIONS

Our results suggest that, in this murine immunocompetent GB model, Ang2 improves the efficacy of conventional RCT leading to a complete tumor clearance. In these experimental conditions, Ang2 acted as a modulator of the innate immune system, in addition to an angiogenic factor.

BACK MATTER

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Reverse transcription and real time quantitative PCR

The cell layer was rinsed with PBS and stored at -80°C. The total RNA was isolated by the Nucleospin® RNA plus (Macherey-Nagel) kit according to manufacturer's instructions. Total RNA (1 µg) were converted into cDNA during one hour at 42°C with AMV® reverse transcriptase (Promega). cDNA was amplified and analysed by real-time PCR with mix containing Takyon™ low ROX SYBR Mastermix (Eurogentec), forward and reverse mouse primers (Eurogentec): Ang1 F: 5'-CATTCTTCGCTGCCATTCTG-3' and R: 5'-TTATATCTTCTCCCTCCGTTTTCTG-3'; Ang2 F: 5'-TTAGCACAAAGGATTCGGACAAT-3' and R: 5'-GGACCACATGCGTCAAACC-3'; Tie2 F: 5'-GCCGCGGACTGACTACGAGC-3' and R: 5'-GGAGGAGGGAGTCCGATAGACGC-3'; β1-integrin F: 5'-AGTGCTCCCACTTCAATCTCACCA-3' and R: 5'-TCTCCTTGCAATGGGTCACAGGAT-3'; VEGF-A F: 5'-GGAGATCCTTCGAGGAGCACTT-3' and R: 5'-TGGCGATTTAGCAGCAGATATAAG-3'; CD68 F: 5'-GCTTATAGCCCAAGGAACAGAG-3' and R: 5'-CTGTAGGTGTCATCGTGAAGGA-3'; Cyclophilin F: 5'-CAGACGCCACTGTGGCTTT-3' and R: 5'-TGTGTTTGGAACTTTGTCT-3'. Amplification profile used is as follow: activation stage 3 min at 95°C, 40 cycles of 3 sec at 95°C and a last stage of 30 sec at 60°C. Samples were run in triplicate and mRNA expression was calculated by the ΔCT method with QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific).

ELISA assay

To evaluate the overexpression of Ang2 on protein level, subconfluent cells were washed in phosphate buffer saline and incubated for 48 h with 250 µl of RPMI medium. The

concentration of Ang2 in the cell supernatant was measured with a mouse/rat Ang2 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems, MANG20) according to the manufacturer's instructions, and the optical density was measured using a Sparck plate reader (TECAN).

Cell counting

Cells were mixed with identical volume of 0.4 % trypan blue, and the mix were counted with the hemocytometer in triplicate according to the standard methodology.

Immunocytofluorescence

Immunocytofluorescence procedure is identical that previously described in materials and methods. Antibodies used for immunocytofluorescence: rat anti-CD68 (1:800, Abcam, ab53444), rat anti- β 1-integrin (1:200; Millipore, MAB1997), rabbit anti-Tie2 (1:200; Santa cruz, sc324).

Leukocyte isolation for flow cytometry analysis

From blood

Blood were collected by a puncture in the ventricle just before the intracardiac perfusion procedure. The blood was recovered using a heparinized syringe, then a lysis of the red blood cells with red blood cell lysis buffer (RBC, Thermo Fisher Scientific) was carried out before immunostaining of Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

From spleen

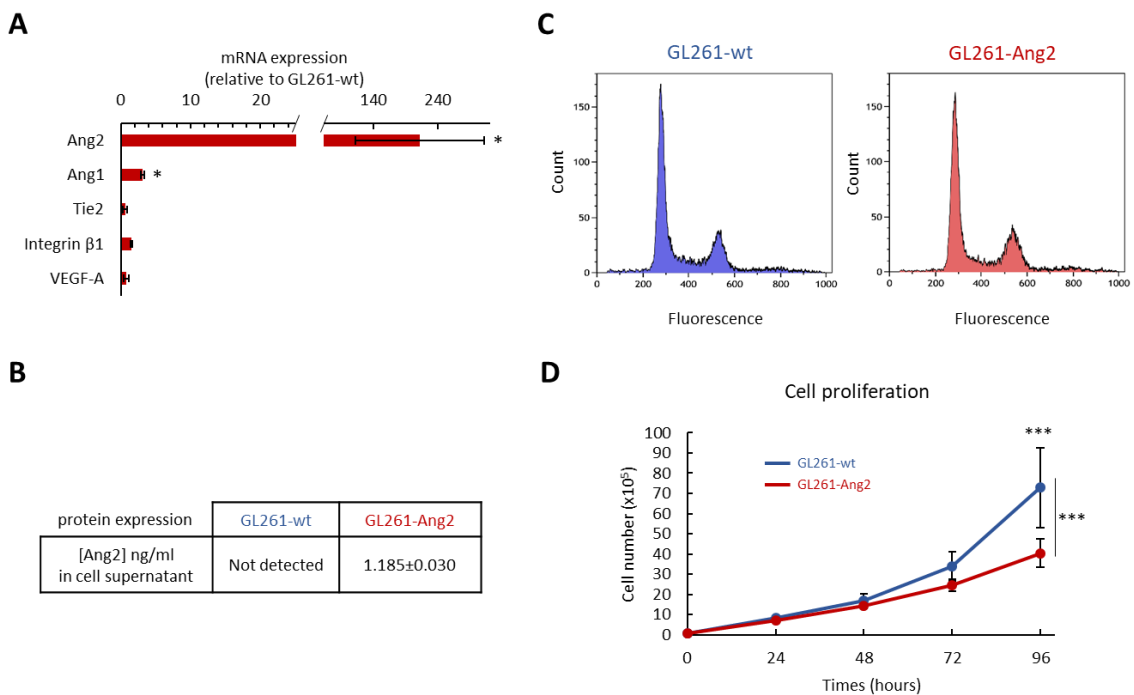
The spleen was mashed through a 70 μ m strainer (Sarsted). The cells were then centrifuged and resuspended in RBC lysis buffer before immunostaining of splenocytes.

Flow cytometry

Cells were resuspended in 50 µl of staining buffer (Thermo Fisher Scientific) and fc receptors were blocked for 15 min at 4°C with anti-CD16/CD32 antibodies (10 µg/ml, BD Biosciences). Cells were then labeled for 30 min at 4°C with primary fluorochrome-conjugated antibodies (**Table S1**). Cells were washed and fixed with PBS-2 % PFA and analysed with CytoFLEX S flow cytometer (Beckman Coulter SAS, SFR ICORE Caen).

SUPPLEMENTARY MATERIALS

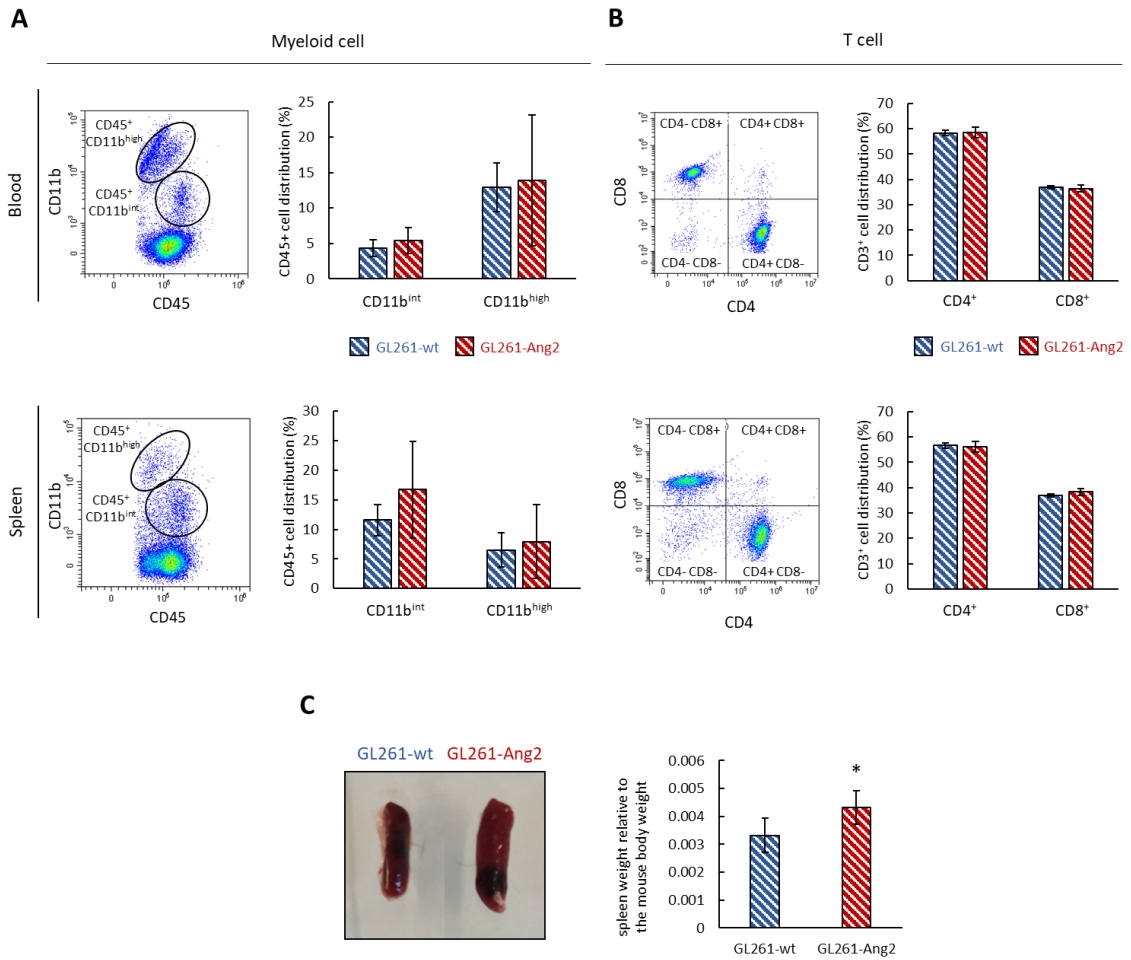
FIGURE S1



Supplementary Figure S1: Characterization of Ang2 overexpression in glioblastoma cells.

(A) Ang2, Ang1, Tie2, β1-integrin and VEGF-A mRNA relative expression (relative to GL261-wt) determined by qRT-PCR. Mean ± SD, N=3, *p<0.05 vs GL261-wt, Student’s *t*-test; (B) Protein level of Ang2 secreted by tumor cells determined by ELISA assay. Mean ± SD, N=2; (C) Cell cycle profile of glioma GL261-wt and GL261-Ang2 cells at 72h. (D) Kinetics of GL261-wt and GL261-Ang2 cells proliferation evaluated by cell counting at 24h, 48h, 72h, 96h. Mean ± SD, N=3, ***p<0.001 vs GL261-wt, ANOVA followed by Tukey’s test.

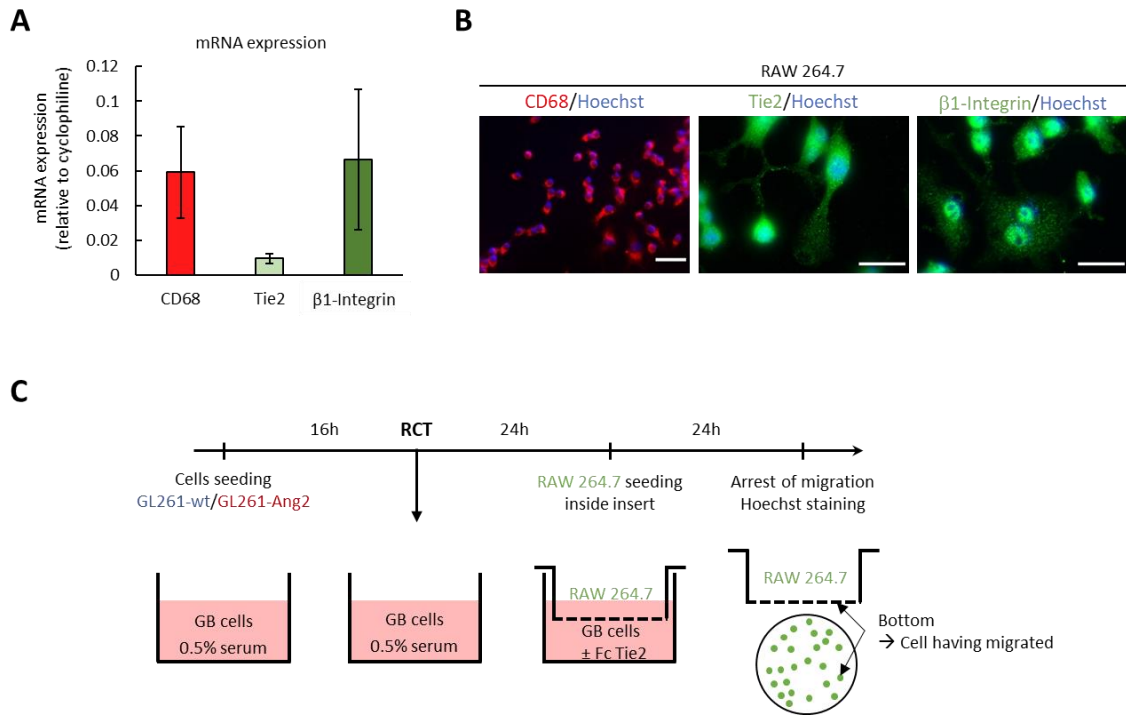
FIGURE S2



Supplementary Figure S2: Involvement of Ang2 in systemic inflammation after radiochemotherapy in glioblastoma bearing mice.

(A) Representative dot plots of CD11b marker in CD45⁺ cells (myeloid cell) 14 days post-cell implantation from blood and spleen of tumor bearing mice following RCT. Mean ± SD, n=5 per group, Student's *t*-test; (B) Representative dot plots of CD3⁺ cells (T cell) 14 days post-cell implantation from blood and spleen of tumor bearing mice following RCT. Mean ± SD, n=5 per group, Student's *t*-test; (C) Representative spleen's photographs of tumor bearing mice at D14. Ratio of spleen weight relative to the mouse body weight 14 days post-cell implantation of tumor bearing mice following RCT. Mean ± SD, n=7 per group, *p<0.05 Student's *t*-test.

FIGURE S3



Supplementary Figure S3: Characterization of Ang2 receptors, Tie2 and β1-integrin, in RAW 264.7 cells. (A) CD68, Tie2 and β1-integrin mRNA relative expressions (compared cyclophilin) in RAW 264.7 cells determined by qRT-PCR. Mean ± SD, N=3; (B) Representative CD68, Tie2 and β1-integrin immunofluorescence images of RAW 264.7 cells. Scale bar for CD68=50 μm and scale bar for Tie2, β1-integrin=20 μm; (C) Experimental protocol for RAW264.7 cells migration.

TABLE S1

Supplementary table S1: List of antibodies used for flow cytometry analyses.

Panel	Antibody	Clone	Concentration	Supplier	Reference
Lymphoid T cell Myeloid cell	CD16/CD32	2.4G2	10 µg/ml	BD Biosciences	553142
	V450-CD3e	500A2	1 µg/ml	BD Biosciences	560801
	PE-CD4	H129.19	1 µg/ml	BD Biosciences	553653
	PE-Cy™7-CD8	53-6.7	1 µg/ml	BD Biosciences	552877
	FITC-CD45	30-F11	1 µg/ml	BD Biosciences	553080
	PE-CD11b	M1/70	1 µg/ml	BD Biosciences	553311

FUNDING STATEMENTS

This study was supported in part by the Région Normandie, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université de Caen-Normandie (UNICAEN), the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), the Advanced Resource Center for Hadrontherapy in Europe (Archade), the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau par l'opération Rotary "Espoir en tête" (FRC) and the French National Agency for Research ANR-10-EQPX-1401, HABIONOR European project, co-funded by the Normandy County Council, the French State in the framework of the interregional development Contract "Vallée de la Seine" 2015-2020.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the SFR ICORE (*Intéraction Cellules-Organismes-Environnement*) platform localized in the University of Caen (France) and Maryline Guillamin for the access to the materials used to perform the flow cytometry analyses. We are grateful to Emilie Pacary (Neurocentre Magendie, INSERM U1215, Bordeaux, France) for technical assistance in plasmid construction.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors have made substantial contributions to the conception/design of the work or the acquisition/analysis/interpretation of data and have approved the submitted version as well as agree to be personally accountable for the author's own contributions.

The individual contributions of authors are detailed below: Conceptualization (CH, EAP, SV, EP); Methodology (CH, EAP, SV, EP); Formal Analysis (CH); Investigation (CH, AEF, MML, EAP, MB, SV, EP); Writing – Original Draft Preparation (CH, EAP, SV, MB, EP); Writing – Review & Editing (CH, AEF, MML, EAP, MB, SV, EP) ; Visualization (CH, EP); Supervision (EAP, SV, EP); Project Administration (MB, SV, EP); Funding Acquisition (MB, SV, EP).

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflicts of interest were disclosed.

REFERENCES

1. Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., Wrensch, M.R., Barnholtz-Sloan, J.S.: The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncol.* 16, 896–913 (2014).
2. Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996 (2005).
3. Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.-O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group: Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10, 459–466 (2009).
4. Osuka, S., Van Meir, E.G.: Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J. Clin. Invest.* 127, 415–426 (2017).
5. Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W.: The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 803–820 (2016).
6. Jain, K.K., Sahoo, P., Tyagi, R., Mehta, A., Patir, R., Vaishya, S., Prakash, N., Vasudev, N., Gupta, R.K.: Prospective glioma grading using single-dose dynamic contrast-enhanced perfusion MRI. *Clin. Radiol.* 70, 1128–1135 (2015).
7. Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., Jeraj, R., Brown, P.D., Jaeckle, K.A., Schiff, D., Stieber, V.W., Brachman, D.G., Werner-Wasik, M., Tremont-Lukats, I.W., Sulman, E.P., Aldape, K.D., Curran, W.J., Mehta, M.P.: A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 699–708 (2014).
8. Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., Brandes, A.A., Hilton, M., Abrey, L., Cloughesy, T.: Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 709–722 (2014).
9. Bergers, G., Hanahan, D.: Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 8, 592–603 (2008).
10. Labussière, M., Cheneau, C., Prahst, C., Pérez-Larraya, J.G., Farina, P., Lombardi, G., Mokhtari, K., Rahimian, A., Delattre, J.-Y., Eichmann, A., Sanson, M.: Angiopoietin-2 May Be Involved in the Resistance to Bevacizumab in Recurrent Glioblastoma. *Cancer Invest.* 34, 39–44 (2016).
11. Koga, K., Todaka, T., Morioka, M., Hamada, J., Kai, Y., Yano, S., Okamura, A., Takakura, N., Suda, T., Ushio, Y.: Expression of angiopoietin-2 in human glioma cells and its role for angiogenesis. *Cancer Res.* 61, 6248–6254 (2001)

12. Scholz, A., Harter, P.N., Cremer, S., Yalcin, B.H., Gurnik, S., Yamaji, M., Di Tacchio, M., Sommer, K., Baumgarten, P., Bähr, O., Steinbach, J.P., Trojan, J., Glas, M., Herrlinger, U., Krex, D., Meinhardt, M., Weyerbrock, A., Timmer, M., Goldbrunner, R., Deckert, M., Braun, C., Schittenhelm, J., Frueh, J.T., Ullrich, E., Mittelbronn, M., Plate, K.H., Reiss, Y.: Endothelial cell-derived angiopoietin-2 is a therapeutic target in treatment-naive and bevacizumab-resistant glioblastoma. *EMBO Mol. Med.* 8, 39–57 (2016).
13. Stratmann, A., Risau, W., Plate, K.H.: Cell Type-Specific Expression of Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 Suggests a Role in Glioblastoma Angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 153, 1459–1466 (1998)
14. Reiss, Y., Machein, M.R., Plate, K.H.: The Role of Angiopoietins During Angiogenesis in Gliomas. *Brain Pathol.* 15, 311–317 (2005).
15. Mandriota, S.J., Pepper, M.S.: Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ. Res.* 83, 852–859 (1998).
16. Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D.: Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 277, 55–60 (1997).
17. Machein, M.R., Knedla, A., Knoth, R., Wagner, S., Neuschl, E., Plate, K.H.: Angiopoietin-1 Promotes Tumor Angiogenesis in a Rat Glioma Model. *Am. J. Pathol.* 165, 1557–1570 (2004)
18. Valable, S., Eddi, D., Constans, J.-M., Guillamo, J.-S., Bernaudin, M., Roussel, S., Petit, E.: MRI assessment of hemodynamic effects of angiopoietin-2 overexpression in a brain tumor model. *Neuro-Oncol.* 11, 488–502 (2009).
19. Scholz, A., Plate, K.H., Reiss, Y.: Angiopoietin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1347, 45–51 (2015).
20. Pober, J.S., Sessa, W.C.: Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 803–815 (2007).
21. Zhu, C., Kros, J.M., Cheng, C., Mustafa, D.: The contribution of tumor-associated macrophages in glioma neo-angiogenesis and implications for anti-angiogenic strategies. *Neuro-Oncol.* 19, 1435–1446 (2017).
22. Rossi, M.L., Hughes, J.T., Esiri, M.M., Coakham, H.B., Brownell, D.B.: Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. 74, 269–277 (1987).
23. Lu-Emerson, C., Snuderl, M., Kirkpatrick, N.D., Goveia, J., Davidson, C., Huang, Y., Riedemann, L., Taylor, J., Ivy, P., Duda, D.G., Ancukiewicz, M., Plotkin, S.R., Chi, A.S., Gerstner, E.R., Eichler, A.F., Dietrich, J., Stemmer-Rachamimov, A.O., Batchelor, T.T., Jain, R.K.: Increase in tumor-associated macrophages after antiangiogenic therapy is associated with poor survival among patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 15, 1079–1087 (2013).
24. Cortes-Santiago, N., Hossain, M.B., Gabrusiewicz, K., Fan, X., Gumin, J., Marini, F.C., Alonso, M.M., Lang, F., Yung, W.K., Fueyo, J., Gomez-Manzano, C.: Soluble Tie2 overrides the heightened invasion induced by anti-angiogenesis therapies in gliomas. *Oncotarget.* 7, 16146–16157 (2016).
25. Park, J.-S., Kim, I.-K., Han, S., Park, I., Kim, C., Bae, J., Oh, S.J., Lee, S., Kim, J.H., Woo, D.-C., He, Y., Augustin, H.G., Kim, I., Lee, D., Koh, G.Y.: Normalization of Tumor Vessels by Tie2 Activation and Ang2 Inhibition Enhances Drug Delivery and Produces a Favorable Tumor Microenvironment. *Cancer Cell.* 30, 953–967 (2016).

26. Lemieux, C., Maliba, R., Favier, J., Théorêt, J.-F., Merhi, Y., Sirois, M.G.: Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood*. 105, 1523–1530 (2005).
27. Mazziere, R., Pucci, F., Moi, D., Zonari, E., Ranghetti, A., Berti, A., Politi, L.S., Gentner, B., Brown, J.L., Naldini, L., De Palma, M.: Targeting the ANG2/TIE2 Axis Inhibits Tumor Growth and Metastasis by Impairing Angiogenesis and Disabling Rebounds of Proangiogenic Myeloid Cells. *Cancer Cell*. 19, 512–526 (2011).
28. Kloepper, J., Riedemann, L., Amoozgar, Z., Seano, G., Susek, K., Yu, V., Dalvie, N., Amelung, R.L., Datta, M., Song, J.W., Askoxylakis, V., Taylor, J.W., Lu-Emerson, C., Batista, A., Kirkpatrick, N.D., Jung, K., Snuderl, M., Muzikansky, A., Stubenrauch, K.G., Krieter, O., Wakimoto, H., Xu, L., Munn, L.L., Duda, D.G., Fukumura, D., Batchelor, T.T., Jain, R.K.: Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 4476–4481 (2016).
29. Peterson, T.E., Kirkpatrick, N.D., Huang, Y., Farrar, C.T., Marijt, K.A., Kloepper, J., Datta, M., Amoozgar, Z., Seano, G., Jung, K., Kamoun, W.S., Vardam, T., Snuderl, M., Goveia, J., Chatterjee, S., Batista, A., Muzikansky, A., Leow, C.C., Xu, L., Batchelor, T.T., Duda, D.G., Fukumura, D., Jain, R.K.: Dual inhibition of Ang-2 and VEGF receptors normalizes tumor vasculature and prolongs survival in glioblastoma by altering macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 4470–4475 (2016).
30. Solecki, G., Osswald, M., Weber, D., Glock, M., Ratliff, M., Müller, H.-J., Krieter, O., Kienast, Y., Wick, W., Winkler, F.: Differential Effects of Ang-2/VEGF-A Inhibiting Antibodies in Combination with Radio- or Chemotherapy in Glioma. *Cancers*. 11, (2019).
31. Deng, Z., Huang, H., Wu, X., Wu, M., He, G., Guo, J.: Distinct Expression of Various Angiogenesis Factors in Mice Brain After Whole-Brain Irradiation by X-ray. *Neurochem. Res.* 42, 625–633 (2017).
32. Sabin, R.J., Anderson, R.M.: Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integr.* 2, 7 (2011).
33. Lee, W.H., Cho, H.J., Sonntag, W.E., Lee, Y.W.: Radiation Attenuates Physiological Angiogenesis by Differential Expression of VEGF, Ang-1, Tie-2 and Ang-2 in Rat Brain. *Radiat. Res.* 176, 753–760 (2011)
34. Hughes, R., Qian, B.-Z., Rowan, C., Muthana, M., Keklikoglou, I., Olson, O.C., Tazzyman, S., Danson, S., Addison, C., Clemons, M., Gonzalez-Angulo, A.M., Joyce, J.A., De Palma, M., Pollard, J.W., Lewis, C.E.: Perivascular M2 Macrophages Stimulate Tumor Relapse after Chemotherapy. *Cancer Res.* 75, 3479–3491 (2015).
35. McLaughlin, M., Patin, E.C., Pedersen, M., Wilkins, A., Dillon, M.T., Melcher, A.A., Harrington, K.J.: Inflammatory microenvironment remodelling by tumour cells after radiotherapy. *Nat. Rev. Cancer.* 20, 203–217 (2020).
36. Larionova, I., Cherdyntseva, N., Liu, T., Patysheva, M., Rakina, M., Kzhyshkowska, J.: Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology.* 8, (2019).
37. McKelvey, K.J., Hudson, A.L., Prasanna Kumar, R., Wilmott, J.S., Attrill, G.H., Long, G.V., Scolyer, R.A., Clarke, S.J., Wheeler, H.R., Diakos, C.I., Howell, V.M.: Temporal and spatial modulation of the tumor and systemic immune response in the murine GL261 glioma model. *PLoS ONE.* 15, (2020).
38. Newcomb, E.W., Zagzag, D.: The Murine GL261 Glioma Experimental Model to Assess Novel Brain Tumor Treatments. In: Meir, E.G. (ed.) *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets, and Therapeutic Approaches*. pp. 227–241. Humana Press, Totowa, NJ (2009)

39. Oshima, Y., Oshima, S., Nambu, H., Kachi, S., Takahashi, K., Umeda, N., Shen, J., Dong, A., Apte, R.S., Duh, E., Hackett, S.F., Okoye, G., Ishibashi, K., Handa, J., Melia, M., Wiegand, S., Yancopoulos, G., Zack, D.J., Campochiaro, P.A.: Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds in the eye: new vessels are most sensitive. *FASEB J.* 19, 963–965 (2005).
40. Coffelt, S.B., Tal, A.O., Scholz, A., Palma, M.D., Patel, S., Urbich, C., Biswas, S.K., Murdoch, C., Plate, K.H., Reiss, Y., Lewis, C.E.: Angiopoietin-2 Regulates Gene Expression in TIE2-Expressing Monocytes and Augments Their Inherent Proangiogenic Functions. *Cancer Res.* 70, 5270–5280 (2010).
41. Murdoch, C., Tazzyman, S., Webster, S., Lewis, C.E.: Expression of Tie-2 by Human Monocytes and Their Responses to Angiopoietin-2. *J. Immunol.* 178, 7405–7411 (2007).
42. Leblond, M.M., Gérault, A.N., Corroyer-Dulmont, A., MacKenzie, E.T., Petit, E., Bernaudin, M., Valable, S.: Hypoxia induces macrophage polarization and re-education toward an M2 phenotype in U87 and U251 glioblastoma models. *Oncoimmunology.* 5, (2015).
43. Kozin, S.V., Kamoun, W.S., Huang, Y., Dawson, M.R., Jain, R.K., Duda, D.G.: Recruitment of myeloid but not endothelial precursor cells facilitates tumor re-growth after local irradiation. *Cancer Res.* 70, 5679–5685 (2010).
44. Kioi, M., Vogel, H., Schultz, G., Hoffman, R.M., Harsh, G.R., Brown, J.M.: Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 694–705 (2010).
45. Coffelt, S.B., Chen, Y.-Y., Muthana, M., Welford, A.F., Tal, A.O., Scholz, A., Plate, K.H., Reiss, Y., Murdoch, C., Palma, M.D., Lewis, C.E.: Angiopoietin 2 Stimulates TIE2-Expressing Monocytes To Suppress T Cell Activation and To Promote Regulatory T Cell Expansion. *J. Immunol.* (2011).
46. Derer, A., Spiljar, M., Bäumlner, M., Hecht, M., Fietkau, R., Frey, B., Gaipl, U.S.: Chemoradiation Increases PD-L1 Expression in Certain Melanoma and Glioblastoma Cells. *Front. Immunol.* 7, (2016).
47. Tamura, R., Tanaka, T., Morimoto, Y., Kuranari, Y., Yamamoto, Y., Takei, J., Murayama, Y., Yoshida, K., Sasaki, H.: Alterations of the tumor microenvironment in glioblastoma following radiation and temozolomide with or without bevacizumab. *Ann. Transl. Med.* 8, (2020).
48. Pawlowska, E., Szczepanska, J., Szatkowska, M., Blasiak, J.: An Interplay between Senescence, Apoptosis and Autophagy in Glioblastoma Multiforme—Role in Pathogenesis and Therapeutic Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 19, (2018).
49. Yang, M., Zhang, M., Chen, J., Mukherjee, R., Zhang, L., Lin, S., Gu, Y.: Angiopoietin-1 Inhibits Mouse Glomerular Endothelial Cell Senescence via Tie2 Receptor-Modulated ERK1/2 Signaling. *Am. J. Nephrol.* 31, 490–500 (2010).
50. Meng, Y., Efimova, E.V., Hamzeh, K.W., Darga, T.E., Mauceri, H.J., Fu, Y.-X., Kron, S.J., Weichselbaum, R.R.: Radiation-inducible Immunotherapy for Cancer: Senescent Tumor Cells as a Cancer Vaccine. *Mol. Ther.* 20, 1046–1055 (2012).
51. Venneri, M.A., De Palma, M., Ponzoni, M., Pucci, F., Scielzo, C., Zonari, E., Mazzieri, R., Doglioni, C., Naldini, L.: Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood.* 109, 5276–5285 (2007).
52. Gabrusiewicz, K., Liu, D., Cortes-Santiago, N., Hossain, M.B., Conrad, C.A., Aldape, K.D., Fuller, G.N., Marini, F.C., Alonso, M.M., Idoate, M.A., Gilbert, M.R., Fueyo, J., Gomez-Manzano, C.: Anti-vascular endothelial growth factor therapy-induced glioma invasion is associated with accumulation of Tie2-expressing monocytes. *Oncotarget.* 5, 2208–2220 (2014)

53. Lee, O.-H., Fueyo, J., Xu, J., Yung, W.K.A., Lemoine, M.G., Lang, F.F., Bekele, B.N., Zhou, X., Alonso, M.A., Aldape, K.D., Fuller, G.N., Gomez-Manzano, C.: Sustained Angiopoietin-2 Expression Disrupts Vessel Formation and Inhibits Glioma Growth. *Neoplasia* N. Y. N. 8, 419–428 (2006)
54. Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W.: NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat. Methods*. 9, 671–675 (2012)
55. Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O.: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9363–9367 (1995). h

III.4 Résultats complémentaires de l'article

En complément des données présentées dans l'article, les effets de la surexpression de l'Ang-2 combinée à la RCT ont également été évalués pendant la phase de traitement, au temps J10. Nous avons ainsi comparé l'effet de la RCT après 2 fractions (J10) à celui décrit précédemment en fin de traitement (3 fractions) à J14 pour les deux groupes de tumeurs GL261-Ang2 et GL261-wt. Ces données complémentaires concernent notamment le compartiment vasculaire et inflammatoire.

III.4.1 Évolution du microenvironnement tumoral durant la radiochimiothérapie

III.4.1.1 Évolution de la réponse inflammatoire

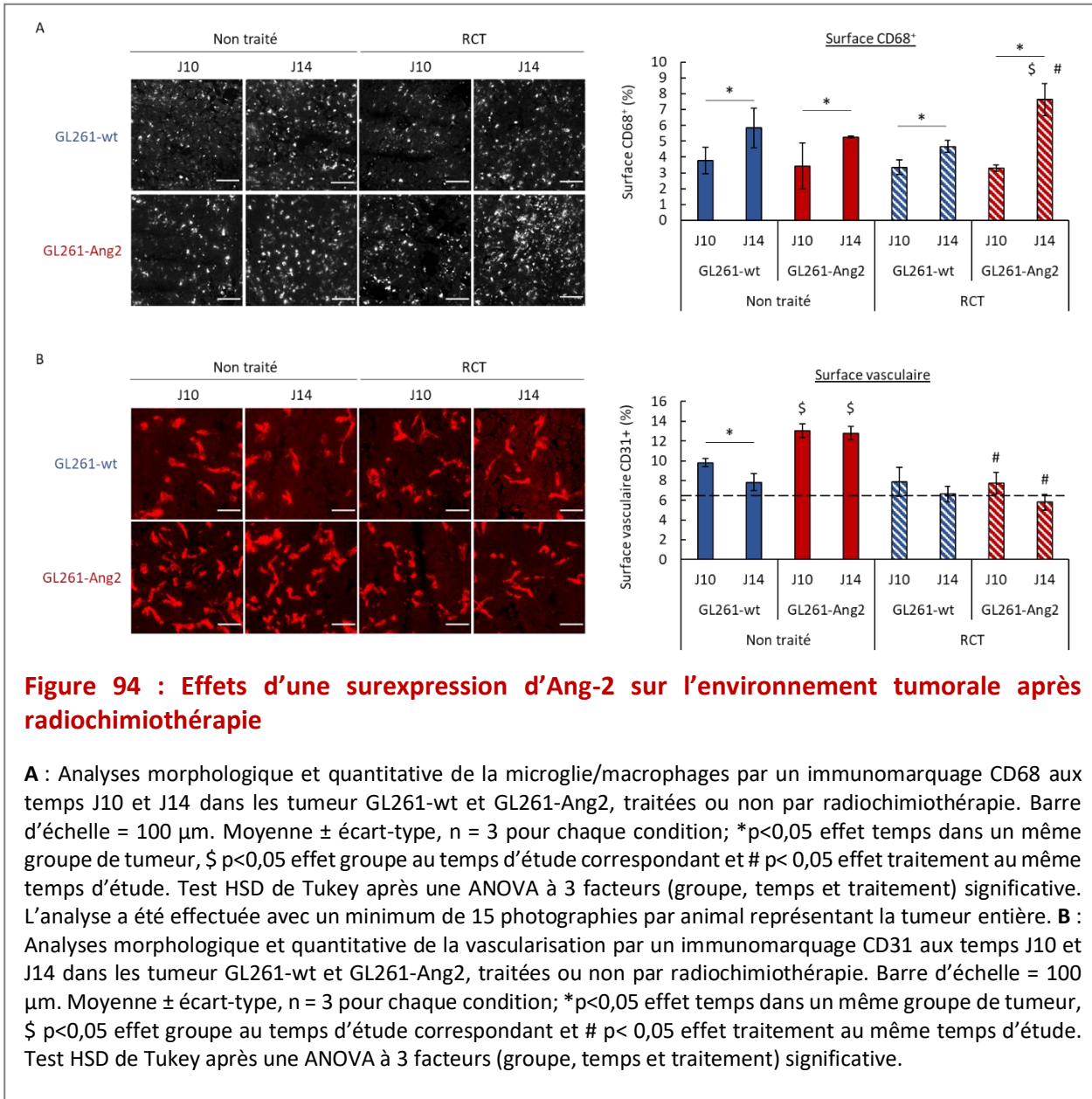
Les résultats de l'étude immunohistologique visant à caractériser l'évolution de la réponse inflammatoire après 2 fractions (J10) ou 3 fractions de RCT (J14, résultats de l'article) sont présentés sur la **Figure 94A**. Sur cette figure ont été reportés pour rappel, les résultats obtenus en absence de traitement et ce pour les 2 groupes de tumeurs GL261-Ang2 et GL261-wt.

En fin de traitement (J14), nous avons montré que la RCT s'accompagnait d'un recrutement des cellules de l'inflammation innée $CD68^+/Iba-1^-$ et que celui-ci était significativement plus important dans les tumeurs GL261-Ang2 ($p < 0,05$). Les résultats présentés sur la **Figure 94A** nous permettent de préciser que la présence de ces cellules inflammatoires est certes fonction de la taille de la tumeur mais aussi que la RCT potentialise ce recrutement uniquement dans les tumeurs GL261-Ang2 au temps J14. En effet, à J10, soit après 2 fractions de RCT, la surface du marquage $CD68^+$ est identique dans les tumeurs GL261-Ang2 et GL261-wt avec respectivement $3,313 \pm 0,198\%$ et $3,358 \pm 1,454\%$ ($p=1$)

III.4.1.2 Évolution de la vascularisation

L'analyse quantitative de l'immunomarquage CD31, permettant de visualiser la vascularisation, a permis de montrer que pour les deux groupes de tumeurs la régression vasculaire observée en fin de traitement (J14) est déjà amorcée après 2 fractions de RCT (J10) (**Figure 94B**). En effet, dans les groupes GL261-wt et GL261-Ang2, au temps J10 en réponse à la RCT, la densité vasculaire diminue respectivement de 20 % ($p=0,18$) et 41 % ($p < 0,05$) (**Figure 94B**) Les tumeurs GL261-Ang2 non traitées étant plus vascularisées que les tumeurs

contrôles, l'effet du traitement est d'autant plus marqué pour ces tumeurs que pour les tumeurs GL261-wt. Sur le plan morphologique, quel que soit le groupe de tumeurs, traitées ou non, les diamètres des vaisseaux sont élargis mais de taille non significativement différente entre les groupes (de l'ordre de 14 μm versus 6 μm pour les vaisseaux du tissu sain).



III.4.2 Étude *in vitro* de l'effet de l'Ang-2 combinée à la radiochimiothérapie sur les cellules endothéliales bEnd.3

Les résultats présentés ci-dessus, suggèrent que l'Ang-2 pourrait par des effets directs ou indirects être responsable de la régression vasculaires suite à la RCT.

Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences *in vitro* sur la lignée de cellules endothéliales bEnd.3 en présence ou non d'Ang-2 recombinante de souris.

Les cellules endothéliales bEnd.3 ont été traitées par une RCT fractionnée (3 x 4 Gy en présence de TMZ 100 μ M). L'Ang-2 a été apportée de façon concomitante à la RCT à une dose de 200 ng/ml, dose pour laquelle des effets biologiques de cette cytokine ont été décrits dans la littérature (Harfouche and Hussain, 2006).

Nous avons dans un premier temps évalué si l'apport de l'Ang-2 sur les cellules endothéliales modifiait la répartition des cellules endothéliales dans le cycle cellulaire en réponse à une RCT.

III.4.2.1 Étude du cycle cellulaire en réponse au traitement combinant l'Ang-2 à la radiochimiothérapie

Suite à l'exposition des cellules endothéliales au protocole de RCT, la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été évaluée par cytométrie de flux, 5 jours après la dernière fraction (**Figure 95A**). Alors qu'aucune différence de cycle cellulaire n'a été observé en condition basale entre les cellules bEnd.3 et les cellules bEnd.3 supplémenté d'Ang-2, l'analyse quantitative des données du cycle cellulaire suite à une exposition à la RCT (**Figure 95A**), révèle qu'en présence d'Ang-2 la proportion de cellules bEnd.3 en phase subG1 est de $12,39 \pm 0,84$ % versus $5,06 \pm 0,98$ % en absence d'Ang-2 ($p < 0,05$). Parallèlement, une diminution de la proportion de cellules présentes dans la phase G0/G1 est observée dans ces conditions expérimentales ($p < 0,05$).

Ces résultats suggèrent que, pour les cellules endothéliales, l'Ang-2 pourrait contribuer à augmenter la cytotoxicité de la RCT en induisant notamment une mort cellulaire par apoptose de ces cellules.

Borovski et al., ont décrit la présence de cellules endothéliales en sénescence sur des biopsies de patients porteurs de GB, suggérant que le traitement de RCT de ces patients pouvait induire ce phénotype sénescence (Borovski et al., 2013). Par ailleurs, les résultats que nous avons présentés dans l'article, montrent pour les cellules tumorales que la combinaison de l'Ang-2 et RT orientent également ces cellules vers ce phénotype de sénescence. Nous avons recherché si tel était le cas des cellules endothéliales.

III.4.2.2 Étude de la sénescence en réponse au traitement combinant l'Ang-2 à la radiochimiothérapie

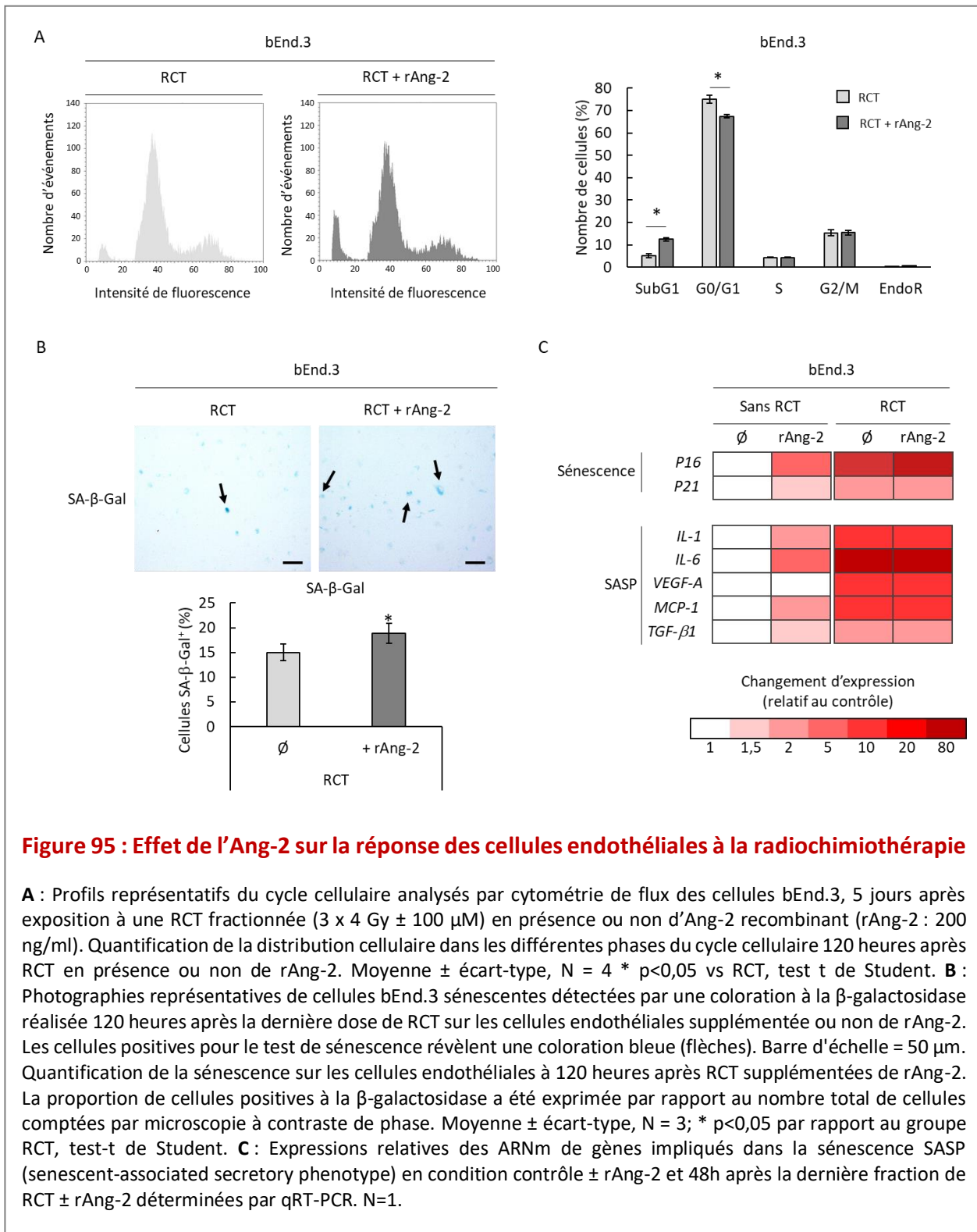
Les lésions de l'ADN radio ou chimio induits, peuvent conduire à la sénescence. Cette sénescence cellulaire s'accompagne alors de changements morphologiques et biochimiques des cellules. Parmi les caractéristiques biochimiques, le critère retenu pour caractériser cet état est basé principalement sur une augmentation de l'activité de la β -galactosidase, une enzyme lysosomale. Dès 1995, il a été proposé qu'à pH 6, seules les cellules sénescents (et non quiescentes) peuvent transformer le substrat X-Gal pour donner une coloration bleue observable en microscopie optique (Dimri et al., 1995).

En accord avec les données de la littérature (Bonnaud et al., 2007; Borovski et al., 2013; Lafargue et al., 2017), nous avons observé des cellules endothéliales bEnd.3 positives au test de la β -galactosidase, 5 jours après qu'elles aient été exposées à la RCT (**Figure 95B**). Dans ces conditions expérimentales, la présence d'Ang-2 augmente légèrement mais de façon significative ce nombre de cellules bEnd.3 en sénescence ($18,91 \pm 2,00$ %) par comparaison aux cellules endothéliales traitées par RCT seule ($14,98 \pm 1,69$ %) ($p < 0,05$) (**Figure 95B**).

Sur le plan moléculaire, les dommages à l'ADN induits par la RT et la CT peuvent conduire à la sénescence en impliquant en amont une activation des inhibiteurs des CDK comme p16 ou p21. Nous avons ainsi renforcé les données biochimiques en montrant que le protocole de RCT utilisé dans ces expériences *in vitro* conduit à une augmentation d'expression des ARNm de p16 et en moindre proportion de p21 (**Figure 95C**). Ces résultats sont en accord avec ceux de McRobb et al., montrant également que ces cellules bEnd.3 activent de façon plus importante la voie de la cycline p16 que celle de p21 pour entrer en sénescence suite à une irradiation de 20 Gy (McRobb et al., 2017).

En revanche, la présence d'Ang-2 associée à la RCT ne modifie pas cette modulation d'expression de p16 ou de p21 observée avec le traitement seul (**Figure 95C**).

Nous avons ensuite cherché à déterminer si cette sénescence était de phénotype SASP, en étudiant l'expression des ARNm d'IL-1, IL-6, MCP-1, VEGF et TGF- β 1. Les résultats obtenus résumés sur la **Figure 95C** sont en faveur d'une sénescence de phénotype SASP puisque l'expression de ces cinq gènes augmente fortement après la RCT. En revanche, dans ces conditions, nous n'observons pas de valeur ajoutée de l'Ang-2 sur l'expression de ces gènes.



III.5 Conclusion/Discussion

Dans cette dernière partie de résultats, nous avons recherché quelle était l'influence de l'Ang-2 sur l'environnement tumoral dans un contexte thérapeutique se rapprochant du traitement conventionnel des patients porteurs de GB. Nous avons ainsi montré qu'un protocole de RCT hypofractionnée, conduisait à une récurrence des tumeurs GL261-wt contrôles, et ce 14 jours après le traitement de RCT (J25). En revanche, à ce temps, les tumeurs GL261-Ang2 sont toujours contenues et aucune récurrence n'a été observée que ce soit à 1,5 mois ou à 3 mois (dernier temps d'étude), après traitement. Pour ces temps tardifs, nous avons montré la présence de cellules inflammatoires au niveau du tissu tumoral résiduel. Afin d'élucider les mécanismes sous-jacents à cet effet bénéfique observé sur les tumeurs GL261-Ang2 traitées par RCT, nous avons caractérisé l'évolution du compartiment tumoral, vasculaire et inflammatoire, en réponse au traitement. Ces effets ont été étudiés à des temps différents : durant le traitement (J10) et à un temps précoce post-traitement (J14), de façon à se placer dans une phase durant laquelle les deux groupes de tumeurs présentent des volumes équivalents.

- ***Evolution du compartiment vasculaire.***

Sans traitement, nous avons montré que dès J10, les deux groupes de tumeurs, GL261-wt et GL261-Ang2 présentaient une densité vasculaire supérieure à celle du tissu sain cérébral. Toutefois, cette densité vasculaire est supérieure pour les tumeurs GL261-Ang2 par comparaison aux tumeurs GL261-wt (environ 50 %) que ce soit à J10 ou J14.

En réponse à la RCT, dès J10, une régression vasculaire est observée et maintenue à J14 pour les deux groupes de tumeurs, pour revenir à une densité vasculaire proche de celle du tissu sain. En revanche, sur le plan morphologique, les vaisseaux sont déstructurés. La régression vasculaire induite par la RCT est cependant proportionnellement plus importante pour les tumeurs GL261-Ang2, (environ 40%) par comparaison aux tumeurs contrôles (régression d'environ 20 %). Nous émettons ainsi l'hypothèse que les vaisseaux des tumeurs issues de l'implantation des cellules GL261-Ang2 seraient plus sensibles à la RCT. Les études menées *in vitro* confirment partiellement cette hypothèse, puisqu'en présence de la protéine recombinante d'Ang-2, une proportion plus importante de cellules endothéliales de la lignée bEnd.3 est retrouvée en phase subG1 du cycle cellulaire, après RCT. Ces résultats suggèrent

que ces cellules soient destinées à une mort par apoptose. Toutefois, afin d'affirmer ces résultats, il serait nécessaire de mieux caractériser cette mort apoptotique en recherchant notamment si celle-ci met en jeu l'aSMase, comme cela a été montré sur des cellules endothéliales exposées à des radiations ionisantes (Niaudet et al., 2017; Paris et al., 2001). Par ailleurs, le rôle de l'Ang-2 dans cette mort apoptotique reste également à déterminer en réponse à la RT. En effet, bien que l'étude de Daly et al., ne prennent pas en compte la RT, l'Ang-2 serait un facteur anti-apoptotique pour les cellules endothéliales (Daly et al., 2006). Toutefois, selon d'autres auteurs, la signalisation du récepteur Tie-2, induite par la liaison de l'Ang-1, protégerait ces cellules endothéliales contre l'apoptose radio-induite (Kwak et al., 2000).

Parallèlement à cette mort par apoptose, nous avons également rapporté que la combinaison de l'Ang-2 et de la RCT favorisait la sénescence de ces cellules endothéliales. Sur le plan moléculaire, nous avons retrouvé une augmentation d'expression de certaines molécules impliquées dans la SASP telles que : les inhibiteurs de CDK p16, p21, les interleukines IL-1, IL-6, les facteurs angiogéniques, VEGF et TGF- β , sans toutefois montrer de valeur ajoutée de l'Ang-2. Ces résultats, en faveur d'une sénescence SASP des cellules endothéliales exposées à la RCT, sont en accord avec ceux de la littérature en réponse à la RT seule. Sur le plan mécanistique, l'équipe de Paris a notamment décrit qu'une irradiation à 5 Gy ou 15 Gy sur des cellules HMVEC (*human microvascular endothelial cells*) provoque l'entrée en sénescence des cellules 21 jours post-irradiation (Lafargue et al., 2017). De plus, les cellules SASP, se caractérisent par une augmentation de sécrétion d'IL-1 α mais aussi d'IL-6 et une augmentation d'expression d'ICAM-1. Ces molécules favoriseraient le processus inflammatoire (Cervelli et al., 2014; Ungvari et al., 2013). Il aurait été intéressant de compléter les données présentées dans ce travail, en étudiant notamment les molécules impliquées dans l'activation des cellules endothéliales (ICAM, VCAM, VE-Cadhérine), qui pourraient favoriser notamment le processus d'inflammation.

- ***Evolution du compartiment inflammatoire***

Chez l'homme, les TAMs (*tumor associated macrophages*) représentent environ 30% de la population des cellules inflammatoires recrutées (Carvalho da Fonseca and Badie, 2013). En accord avec les données cliniques, nous avons montré que l'implantation de cellules de GB

dans un modèle de souris syngénique conduisait au développement de tumeurs présentant une infiltration de cellules macrophagiques. En effet, en absence de traitement, nous avons observé la présence des cellules myéloïdes (CD68⁺) dès J10 post-implantation des cellules tumorales, et ce pour les deux groupes de tumeurs, GL261-wt et GL261-Ang2. Cette infiltration augmente à J14 puisque la densité de ces cellules est 1,5 fois plus importante par rapport au temps J10 pour les deux groupes d'animaux. En absence de traitement, le statut inflammatoire des tumeurs GL261-wt et GL261-Ang2 est comparable.

En réponse au protocole de RCT utilisé dans cette étude, l'intensité de la réponse inflammatoire des tumeurs GL261-wt ne semble pas modifiée, que ce soit à J10 ou à J14. Il en est de même pour les tumeurs GL261-Ang2 lorsque l'analyse a été effectuée en cours de traitement (J10). En revanche, une augmentation significative de l'infiltration des cellules CD68⁺ est observée 3 jours après la dernière fraction du traitement (J14). De cette observation, nous avons suggéré que l'Ang-2 pouvait exercer un effet chimioattractant sur les macrophages, effet que nous avons retrouvé *in vitro*. En effet, en présence de la protéine recombinante d'Ang-2 ou de surnageant de culture issu de cellules GL261-Ang2, nous avons observé une augmentation de la migration des cellules de la lignée macrophagique RAW 264.7. L'effet chimioattractant de l'Ang2 est toutefois plus marqué lorsque les cellules de GB sont exposées à la RCT.

Certaines études ont décrit sur des modèles de GB, la présence d'une sous-population de TAM, dénommée TEM car exprimant le récepteur Tie-2 (De Palma et al., 2005; Murdoch et al., 2007; Venneri et al., 2007). Toutefois, nous n'avons retrouvé que très peu de ces cellules parmi la population totale de macrophages. C'est pourquoi, nous proposons en accord avec l'étude de Murdoch que l'Ang2 puisse favoriser l'infiltration macrophagique indépendamment de la présence du récepteur Tie-2 sur ces cellules (Murdoch et al., 2007).

Les résultats présentés dans cette dernière partie de thèse sont en faveur d'un effet immunomodulateur induit par les cellules GL261-Ang2 exposées à la RCT. Comme le suggèrent les données *in vitro*, cet effet pourrait être direct. L'effet direct de l'Ang-2 pourrait nécessiter des intermédiaires moléculaires tel le SDF-1, comme il a été démontré pour le VEGF

(Turkowski et al., 2018). Cette hypothèse nécessiterait cependant d'être vérifiée par une étude du sécrétome des cellules GL261-Ang2 exposées à la RCT.

- ***Evolution du compartiment tumoral***

En l'absence de traitement, bien que leur environnement soit différent, les tumeurs GL261-wt et GL261-Ang2 se développent suivant des cinétiques similaires avec un temps limite autour de 18 jours.

Cependant, en réponse à la RCT, les tumeurs GL261-wt et GL261-Ang2 évoluent très différemment. En effet, les tumeurs GL261-Ang2 semblent totalement régresser au dernier temps d'étude, c'est-à-dire à 3 mois alors que les tumeurs GL261-wt ont repris leur croissance, 14 jours post-traitement. Nous avons proposé que les tumeurs issues de l'implantation de cellules GL261-Ang2 après exposition à la RCT seraient plus susceptibles à déclencher une réaction inflammatoire. A partir des études histologiques réalisées sur les cerveaux de souris porteurs de tumeurs, nous avons observé qu'au cœur de la tumeur, les cellules des tumeurs GL261-Ang2 traitées présentaient des modifications cytomorphologiques plus marquées (augmentation du volume nucléaire) que celles présentes dans les tumeurs GL261-wt traitées. A partir de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que ces cellules pourraient présenter un phénotype de sénescence. Cette hypothèse a été vérifiée *in vitro* mais nécessiterait d'être confirmée *ex vivo* sur les coupes de cerveaux. Ces données nous amènent à suggérer que la sénescence des cellules GL261-Ang2 consécutives au traitement pourraient être à l'origine d'un effet abscopal conduisant à une réponse inflammatoire. De tels effets ont notamment été décrits pour les traitements par RT (Zenkoh et al., 2017) . De façon intéressante, nous avons noté, qu'après RCT, les rates des animaux porteurs des tumeurs GL261-Ang2 étaient plus grosses, reflétant une prolifération des splénocytes, comme le suggèrent l'étude de Alson et al., (Alson et al., 2020). Bien que cet argument soit indirect, celui-ci plaide en faveur d'une activation de la rate suite au traitements des animaux porteurs de tumeur GL261-Ang2. Afin de renforcer l'hypothèse selon laquelle les cellules GL261-Ang2 exposées à la RCT sont plus immunogènes, il pourrait être envisagé d'utiliser ces cellules dans un protocole mimant une vaccination. Ce protocole consisterait à injecter par voie sous-cutanée des cellules GL261-Ang2 préalablement traitées à la RCT *in vitro*, à des souris

syngéniques. Puis, quelques jours après cette injection, les cellules GL261-wt et/ou GL261-Ang2 seraient implantées dans le cerveaux de ces mêmes souris (Lumniczky et al., 2002; Zenkoh et al., 2017).

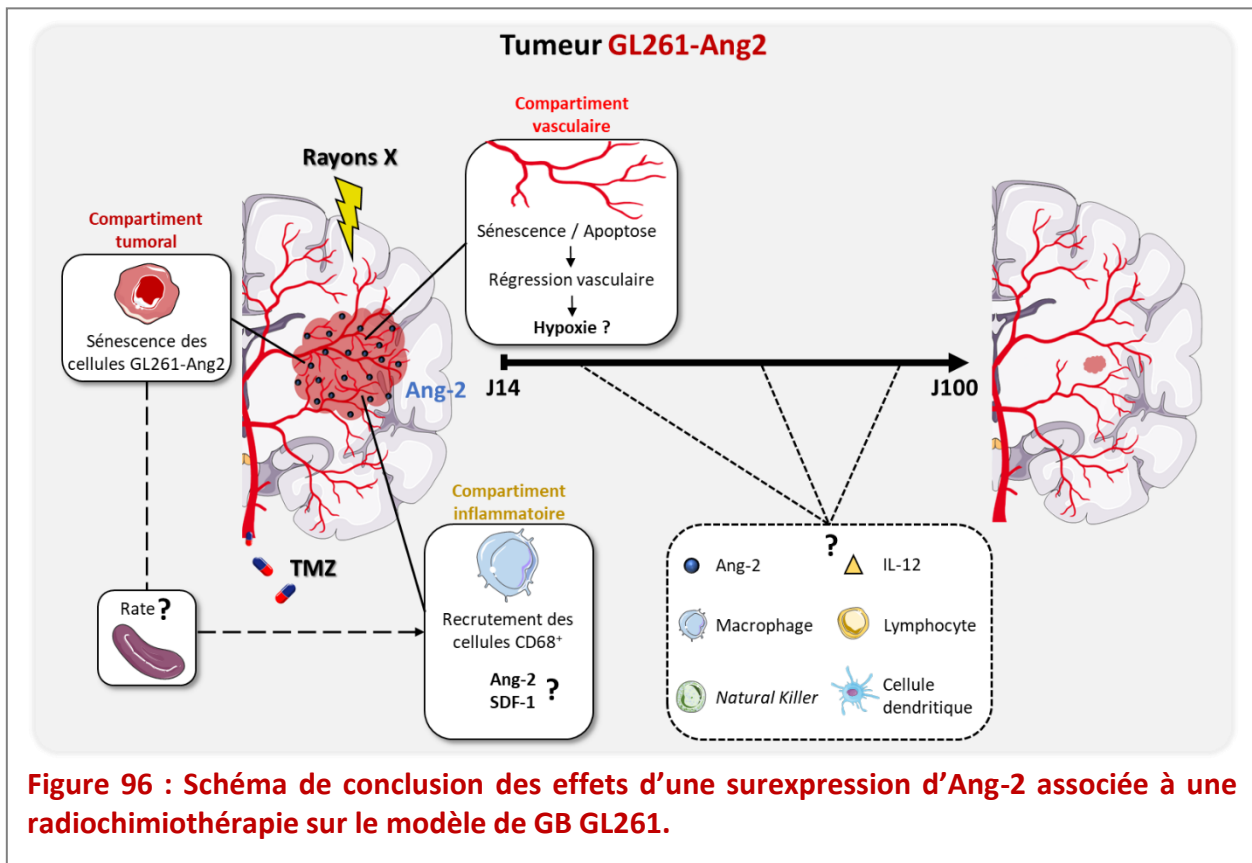
- **Perspectives**

Les résultats de cette étude, réalisée à 2 temps de RCT (pendant et 3 jours post-traitement), suggèrent que les tumeurs issues de l'implantation des cellules GL261-Ang2 exposées à ce protocole favorisent le recrutement des macrophages. A ces temps, l'Ang-2, en agissant sur les cellules myéloïdes, pourrait être considérée comme un médiateur de l'immunité innée. Concernant les cellules de l'immunité acquise, nous avons également décrit un recrutement de cellules CD4⁺ et CD8⁺ lors de la progression tumorale qui semble être diminué par le traitement aussi bien pour les tumeurs GL261-wt que pour les tumeurs GL261-Ang2. Les résultats des études immunohistologiques à long terme montrent également pour les tumeurs GL261-Ang2 la présence de cellules de l'immunité innée et acquise au niveau du tissu tumoral résiduel que ce soit à 1,5 ou 3 mois post-RCT. Cependant, nous ne disposons d'aucune information entre l'intervalle de temps : J14 et J42. Il serait donc nécessaire de compléter ces résultats par une étude réalisée en cinétique afin de déterminer l'intervention temporelle de chacune des cellules myéloïdes et lymphoïdes en réponse à la RCT. Au-delà de l'infiltration, il serait également majeur d'évaluer le statut d'activation de ces cellules. Une étude par cytométrie de flux à partir de prélèvements de tumeur à différents temps post-traitement serait plus appropriée pour dresser un profil longitudinal qualitatif et quantitatif de l'infiltration des différentes cellules de l'immunité susceptibles d'intervenir suite à ce protocole de RCT. L'analyse en cytométrie de flux serait par ailleurs une première approche permettant également de renseigner sur le statut d'activation de ces cellules.

Sur le plan moléculaire, en réponse à ce protocole de RCT, l'immunité anti-tumorale pourrait être restaurée sur les tumeurs GL261-Ang2, *via* une sécrétion d'IL-12. En effet, les travaux de Garcia et al., montrent que l'Ang-2 en présence de TNF- α stimule la synthèse d'IL-12 par les macrophages (García et al., 2014). Par ailleurs, sur un modèle de carcinome hépatique, la RT combinée à l'IL-12 conduit à la clairance tumorale en activant les cellules immunostimulatrices (CD8, cellules dendritiques et *natural killer*) (Wu et al., 2018).

En résumé, dans notre étude, les données recueillies dans les phases précoces de traitement de RCT, suggèrent que l'Ang-2 soit un facteur modulateur de l'immunité innée. Toutefois, ces données, confrontées à celles de la littérature, soulignent également l'importance de mener une étude en cinétique. Cette étude contribuerait 1/ à élucider le signal cellulaire et/ou moléculaire (Ang-2 et IL-12 ?) à l'origine de cet effet cytostatique et cytotoxique de la RCT observé sur les tumeurs GL261-Ang2 dans les premières phases post-traitement ; 2/ à établir si ces signaux sont suffisants pour permettre de rétablir un environnement inflammatoire anti-tumoral conduisant à la clairance de la tumeur au moins pendant 3 mois. Par ailleurs, au regard du lien étroit entre l'inflammation et l'angiogenèse, il serait tout aussi important d'étudier sur cette même cinétique l'évolution de la vascularisation en s'intéressant non seulement à définir les modifications morphologiques et hémodynamiques présents dans la tumeur des vaisseaux mais également en caractérisant le statut d'activation des cellules endothéliales.

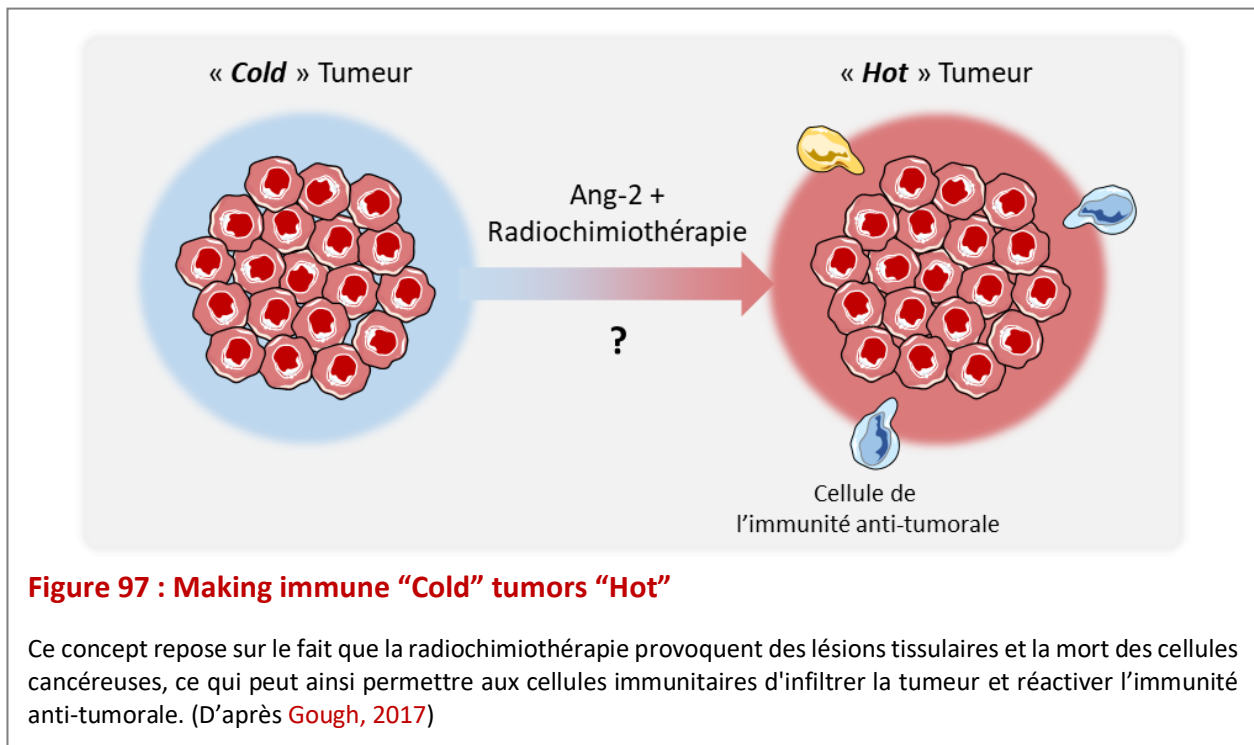
Les principaux résultats et les perspectives de cette étude sont présentés schématiquement sur La **Figure 96**.



Discussion générale

Discussion générale

Les travaux de cette thèse ont été engagés afin de déterminer le rôle de l'Ang-2 dans la réponse des GB au traitement de radiochimiothérapie (RCT). Nous avons notamment montré que les tumeurs issues de cellules de GB surexprimant l'Ang-2 traitées par RCT évoluaient favorablement, puisqu'une clairance de ces tumeurs est observée à 3 mois, qui correspond au temps terminal de l'étude. Nos résultats suggèrent que dans ces tumeurs, suite à ce traitement, une immunité anti-tumorale puisse être restaurée dans les tumeurs GL261-Ang2. Ainsi, le traitement de RCT contribuerait à faire évoluer le statut immunologique de ces tumeurs GL261-Ang2 : *Making Immune "Cold" Tumors "Hot"* (Figure 97) (Gough, 2017).



Historiquement, l'Ang-2 a été initialement décrite comme un facteur angiogénique agissant de concert avec le VEGF au cours de l'angiogenèse physiologique. Puis, cette cytokine a été impliquée dans l'angiogenèse de certaines tumeurs solides y compris celles des GB. Bien qu'une surexpression de l'Ang-2 soit associée à la progression des GB, à l'échelle préclinique, les données sont plus controversées quant à son rôle pro- ou anti-angiogénique suivant le contexte tumoral étudié. Par ailleurs, il a été également montré que l'Ang-2 contribuerait à l'échappement des GB aux traitements anti-VEGF (Labussière et al., 2016; Scholz et al., 2016).

Plus récemment, l'Ang-2 a été également décrite comme un facteur pro-inflammatoire dans différents contextes pathologiques, y compris les tumeurs solides. L'inflammation étant en partie dépendante du compartiment vasculaire, il a été proposé qu'une même molécule pouvait participer à la régulation de ces deux processus. Tel est le cas du VEGF mais aussi de l'Ang-2. Dans les GB, la population de cellules myéloïdes (dont les macrophages, dits TAM) représente jusqu'à 30% des cellules de l'inflammation (Carvalho da Fonseca and Badie, 2013). Nos résultats montrent que précocement, la RCT potentialiserait le recrutement des TAM dans les tumeurs GL261-Ang2 (Figure 96) et que le microenvironnement inflammatoire évoluerait favorablement et de façon soutenue pour que la tumeur puisse régresser et disparaître pendant un temps relativement long (3 mois).

En revanche, selon certains auteurs, l'Ang-2 en absence de traitement de RCT, favoriserait le recrutement d'une sous-population de macrophages dénommées TEM (Cortes-Santiago et al., 2016; Venneri et al., 2007) et favoriserait également le phénotype pro-angiogénique de ces cellules inflammatoires dites M2 like (Coffelt et al., 2010, 2011). En outre, ces macrophages M2 like sont décrits également comme des cellules immunosuppressives et ce notamment, en limitant l'activation des cellules immunitaires et l'expansion des cellules Treg dans les tumeurs (Coffelt et al., 2011).

Au vu de ces données et afin de renforcer les thérapies anti-angiogéniques dans les GB, il a été envisagé de combiner une stratégie bloquant l'Ang-2 à celle bloquant le VEGF dans l'objectif d'agir sur la vascularisation tumorale tout en limitant son environnement immunosuppressif (Grenga et al., 2015; Kloepper et al., 2016; Peterson et al., 2016).

En 2016, l'équipe de Jain a apporté la preuve de concept étayant cette hypothèse en montrant l'efficacité d'un traitement par un anticorps bispécifique ciblant le VEGF et l'Ang-2 (Kloepper et al., 2016 ; Peterson et al., 2016). Sur des modèles de GB, ce traitement, *via* des effets vasculaires et immunomodulateurs, conduit à un ralentissement de la progression tumorale et à une augmentation de la survie des animaux ; ces effets étant imputés à la reprogrammation des macrophages pro-angiogéniques et immunosuppresseurs (M2 like) vers un phénotype anti-tumoral (M1 like). Si les résultats étaient prometteurs sur les modèles précliniques, une étude clinique de phase II, menée sur des patients porteurs de GB en récurrence, n'a cependant pas montré de valeur ajoutée de la stratégie combinant les anti-Ang-2

aux anti-VEGF (Reardon et al., 2018). La divergence de résultats entre ces études pourrait s'expliquer, en partie, par le fait qu'à l'échelle préclinique, les études n'intègrent pas les modalités des traitements conventionnels que sont la RT et la CT. Or, ces traitements conventionnels ciblent certes les cellules tumorales, mais ne seront pas sans conséquences sur le compartiment vasculaire et inflammatoire. C'est ainsi que l'étude de Winkler et al., réalisée sur un modèle de GB, montre un bénéfice thérapeutique de cette stratégie combinée, mais uniquement lorsque le ciblage bispécifique anti-Ang-2/VEGF est associé à la CT seule. En revanche, ces mêmes auteurs montrent que la RT est plus efficace uniquement lorsqu'elle est combinée à un anti-VEGF (Solecki et al., 2019). L'équipe d'Alitalo rapporte, quant à elle, sur un modèle de mélanome, un effet bénéfique d'une stratégie associant un anti-Ang-2 à une RT à faibles doses (Kallio et al., 2020). Toutefois, selon ces mêmes auteurs, le blocage de l'Ang-2 combiné à la RT s'accompagne d'un effet rebond, avec une augmentation d'expression des ARNm d'Ang-2 par les cellules endothéliales HUVEC (Kallio et al., 2020).

Les données bibliographiques présentées ci-dessus suggèrent que les propriétés angiogéniques et immunomodulatrices de l'Ang-2 et du VEGF dépendent probablement non seulement de la concentration de ces cytokines dans la tumeur mais aussi de l'évolution du microenvironnement tumoral (vascularisation, compartiment inflammatoire) qui sera remodelé par la radio- et chimiothérapie.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, pour les GB, peu d'études incluent ces protocoles de RCT dans les étapes de validation de nouvelles approches thérapeutiques. C'est également le cas des stratégies d'immunothérapie récemment introduites pour améliorer la prise en charge thérapeutique des patients porteurs de GB. A titre d'exemple, il a été proposé de tester le bénéfice thérapeutique de stratégies ciblant le *checkpoint* immunitaire PD-1/PD-L1 de PD-1. Bien que ce traitement, soit très efficace pour certains cancers, les résultats n'ont pas été à la hauteur des espérances pour les GB (Adhikaree et al., 2020). Là encore, cette absence d'efficacité pourrait être attribuée à une différence d'effet de l'immunothérapie, lorsque cette stratégie est apportée en combinaison aux traitements standards. En effet, à l'échelle préclinique, il a été établi que l'expression de PD-L1 était augmentée ou diminuée sur les cellules de GB selon la dose de RT, son fractionnement ou la présence TMZ (Derer et al., 2016; Heynckes et al., 2019).

Les compartiment vasculaire et inflammatoire des GB sont désormais reconnus comme des compartiments majeurs de la progression de ces tumeurs. A ce titre, les nouvelles approches thérapeutiques des GB proposent de cibler ces deux compartiments. Le VEGF et l'Ang-2, en tant que facteurs angiogéniques immunomodulateurs ont été identifiés comme des cibles de choix. Toutefois, les travaux et données de la littérature, exposés dans ce manuscrit montrent que l'Ang-2 peut exercer des effets opposés suivant le contexte tumoral et thérapeutique. En effet, selon les modèles précliniques utilisés, l'Ang-2 peut être pro- ou anti-angiogénique, pro- ou immunosuppressive. Il paraît donc nécessaire de renforcer les données expérimentales actuelles, en utilisant des modèles animaux pertinents et en incluant les protocoles de RCT afin de statuer sur l'effet bénéfique ou délétère de l'Ang-2 dans le GB.

Dans un contexte thérapeutique des GB, le compartiment vasculaire est essentiel à la distribution de la CT, de l'immunothérapie (moléculaire ou cellulaire) mais aussi de la RT (en assurant une bonne oxygénation tissulaire). Apporter un traitement efficace pour les GB demeure un défi. L'avenir thérapeutique de ces tumeurs reposent probablement sur des approches multimodales de traitements. En parallèle des avancées technologiques de la RT, il est donc essentiel de poursuivre les études fondamentales afin d'identifier les stratégies les plus adaptées de façon à permettre, par exemple, une normalisation vasculaire temporaire ou durable au sein de la tumeur et de les associer à des stratégies qui permettraient de restaurer une immunité anti-tumorale de façon durable.

Bibliographie

Bibliographie

Aasland, D., Götzing, L., Hauck, L., Berte, N., Meyer, J., Effenberger, M., Schneider, S., Reuber, E.E., Roos, W.P., Tomacic, M.T., et al. (2018). Temozolomide induces senescence and repression of DNA repair pathways in glioblastoma cells via activation of ATR-CHK1, p21, and NF- κ B. *Cancer Res.*

Adhikaree, J., Moreno-Vicente, J., Kaur, A.P., Jackson, A.M., and Patel, P.M. (2020). Resistance Mechanisms and Barriers to Successful Immunotherapy for Treating Glioblastoma. *Cells* 9.

Aghi, M., Cohen, K.S., Klein, R.J., Scadden, D.T., and Chiocca, E.A. (2006). Tumor Stromal-Derived Factor-1 Recruits Vascular Progenitors to Mitotic Neovasculature, where Microenvironment Influences Their Differentiated Phenotypes. *Cancer Res.* 66, 9054–9064.

Ahir, B.K., Ozer, H., Engelhard, H.H., and Lakka, S.S. (2017). MicroRNAs in glioblastoma pathogenesis and therapy: A comprehensive review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 120, 22–33.

Alban, T.J., Alvarado, A.G., Sorensen, M.D., Bayik, D., Volovetz, J., Serbinowski, E., Mulkearns-Hubert, E.E., Sinyuk, M., Hale, J.S., Onzi, G.R., et al. (2018). Global immune fingerprinting in glioblastoma patient peripheral blood reveals immune-suppression signatures associated with prognosis. *JCI Insight* 3.

Algire, G.H., Chalkley, H.W., Legallais, F.Y., and Park, H.D. (1945). Vasculae Reactions of Normal and Malignant Tissues in Vivo. I. Vascular Reactions of Mice to Wounds and to Normal and Neoplastic Transplants. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 6, 73–85.

Alifieris, C., and Trafalis, D.T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol. Ther.* 152, 63–82.

Alson, D., Schuyler, S.C., Yan, B.-X., Samimuthu, K., and Qiu, J.T. (2020). Combination Vaccination With Tetanus Toxoid and Enhanced Tumor-Cell Based Vaccine Against Cervical Cancer in a Mouse Model. *Front. Immunol.* 11.

Andaloussi, A.E., and Lesniak, M.S. (2006). An increase in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncol.* 8, 234–243.

Anfray, C., Ummarino, A., Torres Andón, F., and Allavena, P. (2019). Current Strategies to Target Tumor-Associated-Macrophages to Improve Anti-Tumor Immune Responses. *Cells* 9.

Angara, K., Borin, T.F., and Arbab, A.S. (2017). Vascular Mimicry: A Novel Neovascularization Mechanism Driving Anti-Angiogenic Therapy (AAT) Resistance in Glioblastoma. *Transl. Oncol.* 10, 650–660.

Arcondéguy, T., Lacazette, E., Millevoi, S., Prats, H., and Touriol, C. (2013). VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res.* 41, 7997–8010.

Audero Enrica, Cascone Ilaria, Zanon Ilaria, Previtali Stefano C., Piva Roberto, Schiffer Davide, and Bussolino Federico (2001). Expression of Angiopoietin-1 in Human Glioblastomas Regulates Tumor-Induced Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 536–541.

- Augustin**, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G., and Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 165–177.
- Azambuja**, J.H., da Silveira, E.F., de Carvalho, T.R., Oliveira, P.S., Pacheco, S., do Couto, C.T., Beira, F.T., Stefanello, F.M., Spanevello, R.M., and Braganhol, E. (2017). Glioma sensitive or chemoresistant to temozolomide differentially modulate macrophage protumor activities. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1861, 2652–2662.
- Badie**, B., Schartner, J., Prabakaran, S., Paul, J., and Vorpahl, J. (2001). Expression of Fas ligand by microglia: possible role in glioma immune evasion. *J. Neuroimmunol.* 120, 19–24.
- Baldi**, I., Huchet, A., Bauchet, L., and Loiseau, H. (2010). Épidémiologie des glioblastomes. *Neurochirurgie* 56, 433–440.
- Banissi**, C., Ghiringhelli, F., Chen, L., and Carpentier, A.F. (2009). Treg depletion with a low-dose metronomic temozolomide regimen in a rat glioma model. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 1627–1634.
- Bao**, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A.B., Shi, Q., McLendon, R.E., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 66, 7843–7848.
- Barbero**, S., Bonavia, R., Bajetto, A., Porcile, C., Pirani, P., Ravetti, J.L., Zona, G.L., Spaziante, R., Florio, T., and Schettini, G. (2003). Stromal Cell-derived Factor 1 α Stimulates Human Glioblastoma Cell Growth through the Activation of Both Extracellular Signal-regulated Kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res.* 63, 1969–1974.
- Batchelor**, T.T., Sorensen, A.G., di Tomaso, E., Zhang, W.-T., Duda, D.G., Cohen, K.S., Kozak, K.R., Cahill, D.P., Chen, P.-J., Zhu, M., et al. (2007). AZD2171, a Pan-VEGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Normalizes Tumor Vasculature and Alleviates Edema in Glioblastoma Patients. *Cancer Cell* 11, 83–95.
- Batchelor**, T.T., Mulholland, P., Neyns, B., Nabors, L.B., Campone, M., Wick, A., Mason, W., Mikkelsen, T., Phuphanich, S., Ashby, L.S., et al. (2013). Phase III Randomized Trial Comparing the Efficacy of Cediranib As Monotherapy, and in Combination With Lomustine, Versus Lomustine Alone in Patients With Recurrent Glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 31, 3212–3218.
- Bauchet**, L., and Ostrom, Q.T. (2019). Epidemiology and Molecular Epidemiology. *Neurosurg. Clin.* 30, 1–16.
- Bauer**, M., Goldstein, M., Heylmann, D., and Kaina, B. (2012). Human Monocytes Undergo Excessive Apoptosis following Temozolomide Activating the ATM/ATR Pathway While Dendritic Cells and Macrophages Are Resistant. *PLOS ONE* 7, e39956.
- Behnan**, J., Finocchiaro, G., and Hanna, G. (2019). The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours. *Brain* 142, 847–866.
- Bekaert**, L., Valable, S., Lechapt-Zalcman, E., Ponte, K., Collet, S., Constans, J.-M., Levallet, G., Bordji, K., Petit, E., Branger, P., et al. (2017). [18F]-FMISO PET study of hypoxia in gliomas before surgery: correlation with molecular markers of hypoxia and angiogenesis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 44, 1383–1392.

- Benarroch, E.E. (2012).** Blood-brain barrier: recent developments and clinical correlations. *Neurology* 78, 1268–1276.
- Benjamin, L.E., Golijanin, D., Itin, A., Podes, D., and Keshet, E. (1999).** Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J. Clin. Invest.* 103, 159–165.
- van den Bent, M.J. (2010).** Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 120, 297–304.
- Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003).** Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401–410.
- Bergers, G., and Hanahan, D. (2008).** Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8, 592–603.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., et al. (2000).** Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2, 737–744.
- Bette, S., Barz, M., Wiestler, B., Huber, T., Gerhardt, J., Buchmann, N., E. Combs, S., Schmidt-Graf, F., Delbridge, C., Zimmer, C., et al. (2018).** Prognostic Value of Tumor Volume in Glioblastoma Patients: Size Also Matters for Patients with Incomplete Resection. *Ann. Surg. Oncol.* 25, 558–564.
- Biau, J., Chautard, E., Verrelle, P., and Dutreix, M. (2019).** Altering DNA Repair to Improve Radiation Therapy: Specific and Multiple Pathway Targeting. *Front. Oncol.* 9.
- Bonnaud, S., Niaudet, C., Pottier, G., Gaugler, M.-H., Millour, J., Barbet, J., Sabatier, L., and Paris, F. (2007).** Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death. *Cancer Res.* 67, 1803–1811.
- Bordji, K., Grandval, A., Cunha-Alves, L., Lechapt-Zalcman, E., and Bernaudin, M. (2014).** Hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α), but not HIF-1 α , is essential for hypoxic induction of class III β -tubulin expression in human glioblastoma cells. *FEBS J.* 281, 5220–5236.
- Borovski, T., Beke, P., van Tellingen, O., Rodermond, H.M., Verhoeff, J.J., Lascano, V., Daalhuisen, J.B., Medema, J.P., and Sprick, M.R. (2013).** Therapy-resistant tumor microvascular endothelial cells contribute to treatment failure in glioblastoma multiforme. *Oncogene* 32, 1539–1548.
- Böttcher, J.P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Bles, H., Cabeza-Cabrero, M., Sammiceli, S., Rogers, N.C., Sahai, E., Zelenay, S., and Reis e Sousa, C. (2018).** NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* 172, 1022–1037.e14.
- de Boüard, S., Herlin, P., Christensen, J.G., Lemoisson, E., Gauduchon, P., Raymond, E., and Guillo, J.-S. (2007).** Antiangiogenic and anti-invasive effects of sunitinib on experimental human glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 9, 412–423.
- Boucher, Y., Salehi, H., Witwer, B., Harsh, G.R., and Jain, R.K. (1997).** Interstitial fluid pressure in intracranial tumours in patients and in rodents. *Br. J. Cancer* 75, 829–836.
- Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2009).** HIF at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 1055–1057.

Brat, D.J., Bellail, A.C., and Van Meir, E.G. (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-Oncol.* 7, 122–133.

Bregy, A., Wong, T.M., Shah, A.H., Goldberg, J.M., and Komotar, R.J. (2013). Active immunotherapy using dendritic cells in the treatment of glioblastoma multiforme. *Cancer Treat. Rev.* 39, 891–907.

Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Nouseh, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462–477.

Briegert, M., and Kaina, B. (2007). Human Monocytes, but not Dendritic Cells Derived from Them, Are Defective in Base Excision Repair and Hypersensitive to Methylating Agents. *Cancer Res.* 67, 26–31.

Brown, J.M., and Wilson, W.R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* 4, 437–447.

Brown, C., Gaspar, J., Pettit, A., Lee, R., Gu, X., Wang, H., Manning, C., Volland, C., Goldring, S.R., Goldring, M.B., et al. (2004). ESE-1 is a novel transcriptional mediator of angiopoietin-1 expression in the setting of inflammation. *J. Biol. Chem.* 279, 12794–12803.

Brown, C.E., Alizadeh, D., Starr, R., Weng, L., Wagner, J.R., Naranjo, A., Ostberg, J.R., Blanchard, M.S., Kilpatrick, J., Simpson, J., et al. (2016). Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N. Engl. J. Med.* 375, 2561–2569.

Brown, J.L., Cao, Z.A., Pinzon-Ortiz, M., Kendrew, J., Reimer, C., Wen, S., Zhou, J.Q., Tabrizi, M., Emery, S., McDermott, B., et al. (2010). A Human Monoclonal Anti-ANG2 Antibody Leads to Broad Antitumor Activity in Combination with VEGF Inhibitors and Chemotherapy Agents in Preclinical Models. *Mol. Cancer Ther.* 9, 145–156.

Budanov, A.V., and Karin, M. (2008). The p53-regulated Sestrin gene products inhibit mTOR signaling. *Cell* 134, 451–460.

van der Burg, S., R, A., F, O., T, van H., and Cj, M. (2016). Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion.

Burger, J.A., and Kipps, T.J. (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107, 1761–1767.

Burger, M.C., Zhang, C., Harter, P.N., Romanski, A., Strassheimer, F., Senft, C., Tonn, T., Steinbach, J.P., and Wels, W.S. (2019). CAR-Engineered NK Cells for the Treatment of Glioblastoma: Turning Innate Effectors Into Precision Tools for Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* 10.

Burgett, M.E., Lathia, J.D., Roth, P., Nowacki, A.S., Galileo, D.S., Pugacheva, E., Huang, P., Vasanji, A., Li, M., Byzova, T., et al. (2016). Direct contact with perivascular tumor cells enhances integrin $\alpha\beta3$ signaling and migration of endothelial cells. *Oncotarget* 7, 43852–43867.

Burnet (1971). Immunological surveillance in neoplasia.

Butowski, N., Colman, H., De Groot, J.F., Omuro, A.M., Nayak, L., Wen, P.Y., Cloughesy, T.F., Marimuthu, A., Haidar, S., Perry, A., et al. (2016). Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: an Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. *Neuro-Oncol.* 18, 557–564.

- Calabrese**, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., et al. (2007). A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell* 11, 69–82.
- Caligiuri**, M.A. (2008). Human natural killer cells. *Blood* 112, 461–469.
- Campisi**, J., and d’Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.
- Carlson**, T.R., Feng, Y., Maisonpierre, P.C., Mrksich, M., and Morla, A.O. (2001). Direct Cell Adhesion to the Angiopoietins Mediated by Integrins. *J. Biol. Chem.* 276, 26516–26525.
- Carmeliet**, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 6, 389–395.
- Carmeliet**, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653–660.
- Carmeliet**, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.
- Carmeliet**, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435–439.
- Carvalho da Fonseca**, A.C., and Badie, B. (2013). Microglia and Macrophages in Malignant Gliomas: Recent Discoveries and Implications for Promising Therapies. *Clin. Dev. Immunol.* 2013.
- Cascone**, I., Napione, L., Maniero, F., Serini, G., and Bussolino, F. (2005). Stable interaction between $\alpha 5\beta 1$ integrin and Tie2 tyrosine kinase receptor regulates endothelial cell response to Ang-1. *J. Cell Biol.* 170, 993–1004.
- Castedo**, M., Perfettini, J.-L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., and Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23, 2825–2837.
- Cervelli**, T., Panetta, D., Navarra, T., Andreassi, M.G., Basta, G., Galli, A., Salvadori, P.A., Picano, E., and Del Turco, S. (2014). Effects of single and fractionated low-dose irradiation on vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 235, 510–518.
- Chakhoyan**, A., Corroyer-Dulmont, A., Leblond, M.M., Gérald, A., Toutain, J., Chazaviel, L., Divoux, D., Petit, E., MacKenzie, E.T., Kauffmann, F., et al. (2017). Carbogen-induced increases in tumor oxygenation depend on the vascular status of the tumor: A multiparametric MRI study in two rat glioblastoma models. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 2270–2282.
- Chanmee**, T., Ontong, P., Konno, K., and Itano, N. (2014). Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers* 6, 1670–1690.
- Charles**, N.A., Holland, E.C., Gilbertson, R., Glass, R., and Kettenmann, H. (2011). The brain tumor microenvironment. *Glia* 59, 1169–1180.
- Chaurasia**, M., Bhatt, A.N., Das, A., Dwarakanath, B.S., and Sharma, K. (2016). Radiation-induced autophagy: mechanisms and consequences. *Free Radic. Res.* 50, 273–290.

- Chen, F.-H.,** Chiang, C.-S., Wang, C.-C., Tsai, C.-S., Jung, S.-M., Lee, C.-C., McBride, W.H., and Hong, J.-H. (2009). Radiotherapy Decreases Vascular Density and Causes Hypoxia with Macrophage Aggregation in TRAMP-C1 Prostate Tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 1721–1729.
- Chen, M.,** Sun, R., Shi, B., Wang, Y., Di, S., Luo, H., Sun, Y., Li, Z., Zhou, M., and Jiang, H. (2019). Antitumor efficacy of chimeric antigen receptor T cells against EGFRVIII-expressing glioblastoma in C57BL/6 mice. *Biomed. Pharmacother.* *113*, 108734.
- Chen, Z.,** Feng, X., Herting, C.J., Garcia, V.A., Nie, K., Pong, W.W., Rasmussen, R., Dwivedi, B., Seby, S., Wolf, S.A., et al. (2017). Cellular and molecular identity of tumor-associated macrophages in glioblastoma. *Cancer Res.* *77*, 2266–2278.
- Cheng, Y.,** Sk, U.H., Zhang, Y., Ren, X., Zhang, L., Huber-Keener, K.J., Sun, Y.-W., Liao, J., Amin, S., Sharma, A.K., et al. (2012). Rational Incorporation of Selenium into Temozolomide Elicits Superior Antitumor Activity Associated with Both Apoptotic and Autophagic Cell Death. *PLOS ONE* *7*, e35104.
- Chiang, C.-S.,** Fu, S.Y., Wang, S.-C., Yu, C.-F., Chen, F.-H., Lin, C.-M., and Hong, J.-H. (2012). Irradiation Promotes an M2 Macrophage Phenotype in Tumor Hypoxia. *Front. Oncol.* *2*.
- Chinot, O.L.,** Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., et al. (2014). Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma.
- Cho, H.R.,** Kumari, N., Thi Vu, H., Kim, H., Park, C.-K., and Choi, S.H. (2019). Increased Antiangiogenic Effect by Blocking CCL2-dependent Macrophages in a Rodent Glioblastoma Model: Correlation Study with Dynamic Susceptibility Contrast Perfusion MRI. *Sci. Rep.* *9*, 1–12.
- Choi, H.-J.,** Zhang, H., Park, H., Choi, K.-S., Lee, H.-W., Agrawal, V., Kim, Y.-M., and Kwon, Y.-G. (2015). Yes-associated protein regulates endothelial cell contact-mediated expression of angiopoietin-2. *Nat. Commun.* *6*, 6943.
- Chongsathidkiet, P.,** Jackson, C., Koyama, S., Loebel, F., Cui, X., Farber, S.H., Woroniecka, K., Elsamadicy, A.A., Dechant, C.A., Kemeny, H.R., et al. (2018). Sequestration of T cells in bone marrow in the setting of glioblastoma and other intracranial tumors. *Nat. Med.* *24*, 1459–1468.
- Clara, C.A.,** Marie, S.K.N., de Almeida, J.R.W., Wakamatsu, A., Oba-Shinjo, S.M., Uno, M., Neville, M., and Rosemberg, S. (2014). Angiogenesis and expression of PDGF-C, VEGF, CD105 and HIF-1 α in human glioblastoma. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* *34*, 343–352.
- Clavreul, A.,** Soulard, G., Lemée, J.-M., Rigot, M., Fabbro-Peray, P., Bauchet, L., Figarella-Branger, D., and Menei, P. (2019). The French glioblastoma biobank (FGB): a national clinicobiological database. *J. Transl. Med.* *17*, 133.
- Cleaver, O.,** and Melton, D.A. (2003). Endothelial signaling during development. *Nat. Med.* *9*, 661–668.
- Clément-Colmou, K.,** Potiron, V., Pietri, M., Guillonneau, M., Jouglar, E., Chiavassa, S., Delpon, G., Paris, F., and Supiot, S. (2020). Influence of Radiotherapy Fractionation Schedule on the Tumor Vascular Microenvironment in Prostate and Lung Cancer Models. *Cancers* *12*.
- Coffelt, S.B.,** Tal, A.O., Scholz, A., De Palma, M., Patel, S., Urbich, C., Biswas, S.K., Murdoch, C., Plate, K.H., Reiss, Y., et al. (2010). Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. *Cancer Res.* *70*, 5270–5280.

- Coffelt**, S.B., Chen, Y.-Y., Muthana, M., Welford, A.F., Tal, A.O., Scholz, A., Plate, K.H., Reiss, Y., Murdoch, C., Palma, M.D., et al. (2011). Angiopoietin 2 Stimulates TIE2-Expressing Monocytes To Suppress T Cell Activation and To Promote Regulatory T Cell Expansion. *J. Immunol.*
- Collado**, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer* 10, 51–57.
- Collin**, G., Huna, A., Warnier, M., Flaman, J.-M., and Bernard, D. (2018). Transcriptional repression of DNA repair genes is a hallmark and a cause of cellular senescence. *Cell Death Dis.* 9.
- Colombo**, F., Barzon, L., Franchin, E., Pacenti, M., Pinna, V., Danieli, D., Zanusso, M., and Palù, G. (2005). Combined HSV-TK/IL-2 gene therapy in patients with recurrent glioblastoma multiforme: biological and clinical results. *Cancer Gene Ther.* 12, 835–848.
- Colwell**, N., Larion, M., Giles, A.J., Seldomridge, A.N., Sizardkhani, S., Gilbert, M.R., and Park, D.M. (2017). Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. *Neuro-Oncol.* 19, 887–896.
- Coman**, D., Huang, Y., Rao, J.U., De Feyter, H.M., Rothman, D.L., Juchem, C., and Hyder, F. (2016). Imaging the intratumoral-peritumoral extracellular pH gradient of gliomas. *NMR Biomed.* 29, 309–319.
- Coniglio**, S.J., Eugenin, E., Dobrenis, K., Stanley, E.R., West, B.L., Symons, M.H., and Segall, J.E. (2012). Microglial Stimulation of Glioblastoma Invasion Involves Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Colony Stimulating Factor 1 Receptor (CSF-1R) Signaling. *Mol. Med.* 18, 519–527.
- Cooke**, V.G., LeBleu, V.S., Keskin, D., Khan, Z., O’Connell, J.T., Teng, Y., Duncan, M.B., Xie, L., Maeda, G., Vong, S., et al. (2012). Pericyte Depletion Results in Hypoxia-Associated Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis Mediated by Met Signaling Pathway. *Cancer Cell* 21, 66–81.
- Coppé**, J.-P., Kauser, K., Campisi, J., and Beauséjour, C.M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.* 281, 29568–29574.
- Corroyer-Dulmont**, A., Pérès, E.A., Petit, E., Guillamo, J.-S., Varoqueaux, N., Roussel, S., Toutain, J., Divoux, D., MacKenzie, E.T., Delamare, J., et al. (2013). Detection of glioblastoma response to temozolomide combined with bevacizumab based on μ MRI and μ PET imaging reveals [18F]-fluoro-l-thymidine as an early and robust predictive marker for treatment efficacy. *Neuro-Oncol.* 15, 41–56.
- Cortes-Santiago**, N., Hossain, M.B., Gabrusiewicz, K., Fan, X., Gumin, J., Marini, F.C., Alonso, M.M., Lang, F., Yung, W.K., Fueyo, J., et al. (2016). Soluble Tie2 overrides the heightened invasion induced by anti-angiogenesis therapies in gliomas. *Oncotarget* 7, 16146–16157.
- Corzo**, C.A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M.J., Youn, J.-I., Cheng, P., Cho, H.-I., Celis, E., Quiceno, D.G., Padhya, T., et al. (2010). HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J. Exp. Med.* 207, 2439–2453.
- Cossutta**, M., Darche, M., Carpentier, G., Houppé, C., Ponzio, M., Raineri, F., Vallée, B., Gilles, M.-E., Villain, D., Picard, E., et al. (2019). Weibel-Palade Bodies Orchestrate Pericytes During Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 39, 1843–1858.
- Coutelle**, O., Schiffmann, L.M., Liwschitz, M., Brunold, M., Goede, V., Hallek, M., Kashkar, H., and Hacker, U.T. (2015). Dual targeting of Angiopoietin-2 and VEGF potentiates effective vascular

normalisation without inducing empty basement membrane sleeves in xenograft tumours. *Br. J. Cancer* *112*, 495–503.

Crespo, I., Vital, A.L., Gonzalez-Tablas, M., Patino, M. del C., Otero, A., Lopes, M.C., de Oliveira, C., Domingues, P., Orfao, A., and Tabernero, M.D. (2015). Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am. J. Pathol.* *185*, 1820–1833.

Crittenden, M.R., Cottam, B., Savage, T., Nguyen, C., Newell, P., and Gough, M.J. (2012). Expression of NF- κ B p50 in Tumor Stroma Limits the Control of Tumors by Radiation Therapy. *PLOS ONE* *7*, e39295.

Cuddapah, V.A., Robel, S., Watkins, S., and Sontheimer, H. (2014). A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 455–465.

Cui, X., Morales, R.-T.T., Qian, W., Wang, H., Gagner, J.-P., Dolgalev, I., Placantonakis, D., Zagzag, D., Cimmino, L., Snuderl, M., et al. (2018). Hacking macrophage-associated immunosuppression for regulating glioblastoma angiogenesis. *Biomaterials* *161*, 164–178.

Curiel, T.J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K.L., Daniel, B., Zimmermann, M.C., et al. (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* *9*, 562–567.

Curran, C.S., Evans, M.D., and Bertics, P.J. (2011). GM-CSF production by glioblastoma cells has a functional role in eosinophil survival, activation and growth factor production for enhanced tumor cell proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 1254–1263.

Dai, B., Qi, N., Li, J., and Zhang, G. (2018). Temozolomide combined with PD-1 Antibody therapy for mouse orthotopic glioma model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *501*, 871–876.

Daly, C., Wong, V., Burova, E., Wei, Y., Zabski, S., Griffiths, J., Lai, K.-M., Lin, H.C., Ioffe, E., Yancopoulos, G.D., et al. (2004). Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). *Genes Dev.* *18*, 1060–1071.

Daly, C., Pasnikowski, E., Burova, E., Wong, V., Aldrich, T.H., Griffiths, J., Ioffe, E., Daly, T.J., Fandl, J.P., Papadopoulos, N., et al. (2006). Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 15491–15496.

Daniel, P., Sabri, S., Chaddad, A., Meehan, B., Jean-Claude, B., Rak, J., and Abdulkarim, B.S. (2019). Temozolomide Induced Hypermutation in Glioma: Evolutionary Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Front. Oncol.* *9*.

Daumas-Duport, C., Tucker, M.-L., Kolles, H., Cervera, P., Beuvon, F., Varlet, P., Udo, N., Koziak, M., and Chodkiewicz, J.-P. (1997). Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria. *J. Neurooncol.* *34*, 61–78.

Davis, M.E. (2018). Epidemiology and Overview of Gliomas. *Semin. Oncol. Nurs.* *34*, 420–429.

Davis, S., Aldrich, T.H., Jones, P.F., Acheson, A., Compton, D.L., Jain, V., Ryan, T.E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P.C., et al. (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* *87*, 1161–1169.

Davis, S., Papadopoulos, N., Aldrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Huang, T., Kovac, L., Xu, A., Leidich, R., Radziejewska, E., Rafique, A., et al. (2003). Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 38–44.

- De Palma, M., Venneri, M.A., Galli, R., Sergi Sergi, L., Politi, L.S., Sampaolesi, M., and Naldini, L. (2005).** Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8, 211–226.
- Derer, A., Spiljar, M., Bäuml, M., Hecht, M., Fietkau, R., Frey, B., and Gaipl, U.S. (2016).** Chemoradiation Increases PD-L1 Expression in Certain Melanoma and Glioblastoma Cells. *Front. Immunol.* 7.
- Dewhirst, M.W. (2007).** Intermittent hypoxia furthers the rationale for hypoxia-inducible factor-1 targeting. *Cancer Res.* 67, 854–855.
- Dillman, R.O. (2011).** Cancer Immunotherapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* 26, 1–64.
- Dillon, M.T., Good, J.S., and Harrington, K.J. (2014).** Selective targeting of the G2/M cell cycle checkpoint to improve the therapeutic index of radiotherapy. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* 26, 257–265.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995).** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9363–9367.
- Ding, H., Roncari, L., Wu, X., Lau, N., Shannon, P., Nagy, A., and Guha, A. (2001).** Expression and hypoxic regulation of angiopoietins in human astrocytomas. *Neuro-Oncol.* 3, 1–10.
- Dodson, H., Wheatley, S.P., and Morrison, C.G. (2007).** Involvement of centrosome amplification in radiation-induced mitotic catastrophe. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 364–370.
- Du, R., Lu, K.V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegué, E., Song, H., VandenBerg, S., Johnson, R.S., Werb, Z., et al. (2008).** HIF1 α Induces the Recruitment of Bone Marrow-Derived Vascular Modulatory Cells to Regulate Tumor Angiogenesis and Invasion. *Cancer Cell* 13, 206–220.
- Dumont, D.J., Gradwohl, G., Fong, G.H., Puri, M.C., Gertsenstein, M., Auerbach, A., and Breitman, M.L. (1994).** Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev.* 8, 1897–1909.
- Dunn, I.F., Heese, O., and Black, P.M. (2000).** Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs. *J. Neurooncol.* 50, 121–137.
- Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M., and Dvorak, A.M. (1995).** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 146, 1029–1039.
- El Hallani, S., Boisselier, B., Peglion, F., Rousseau, A., Colin, C., Idbaih, A., Marie, Y., Mokhtari, K., Thomas, J.-L., Eichmann, A., et al. (2010).** A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain* 133, 973–982.
- Embree-Ku, M., Venturini, D., and Boekelheide, K. (2002).** Fas Is Involved in the p53-Dependent Apoptotic Response to Ionizing Radiation in Mouse Testis. *Biol. Reprod.* 66, 1456–1461.
- Emmanouilides, C., Sfakiotaki, G., Androulakis, N., Kalbakis, K., Christophylakis, C., Kalykaki, A., Vamvakas, L., Kotsakis, A., Agelaki, S., Diamandidou, E., et al. (2007).** Front-line Bevacizumab in combination with Oxaliplatin, Leucovorin and 5-Fluorouracil (FOLFOX) in patients with metastatic colorectal cancer: a multicenter phase II study. *BMC Cancer* 7, 91.

- Engelhardt, B. (2006).** Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood–brain barrier. *J. Neural Transm.* *113*, 477–485.
- Engelmann, D., and Pützer, B.M. (2010).** Translating DNA damage into cancer cell death—A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance. *Drug Resist. Updat.* *13*, 119–131.
- Engerman, R.L., Pfaffenbach, D., and Davis, M.D. (1967).** Cell turnover of capillaries. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *17*, 738–743.
- Erber, R., Thurnher, A., Katsen, A.D., Groth, G., Kerger, H., Hammes, H.-P., Menger, M.D., Ullrich, A., and Vajkoczy, P. (2004).** Combined inhibition of VEGF- and PDGF-signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J.* *18*, 1–25.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2000).** Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.* *343*, 1350–1354.
- Evans, S.M., Jenkins, K.W., Chen, H.I., Jenkins, W.T., Judy, K.D., Hwang, W.-T., Lustig, R.A., Judkins, A.R., Grady, M.S., Hahn, S.M., et al. (2010).** The Relationship among Hypoxia, Proliferation, and Outcome in Patients with De Novo Glioblastoma: A Pilot Study. *Transl. Oncol.* *3*, 160–169.
- Fadul, C.E., Fisher, J.L., Gui, J., Hampton, T.H., Côté, A.L., and Ernstoff, M.S. (2011).** Immune modulation effects of concomitant temozolomide and radiation therapy on peripheral blood mononuclear cells in patients with glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncol.* *13*, 393–400.
- Falcke, S.E., Rühle, P.F., Deloch, L., Fietkau, R., Frey, B., and Gaipl, U.S. (2018).** Clinically Relevant Radiation Exposure Differentially Impacts Forms of Cell Death in Human Cells of the Innate and Adaptive Immune System. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.
- Fan, Y., Ye, J., Shen, F., Zhu, Y., Yeghiazarians, Y., Zhu, W., Chen, Y., Lawton, M.T., Young, W.L., and Yang, G.-Y. (2008).** Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *28*, 90–98.
- Fantin, A., Vieira, J.M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhozhij, S., Peri, F., Wilson, S.W., and Ruhrberg, C. (2010).** Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* *116*, 829–840.
- Fantin, A., Vieira, J.M., Plein, A., Denti, L., Fruttiger, M., Pollard, J.W., and Ruhrberg, C. (2013).** NRP1 acts cell autonomously in endothelium to promote tip cell function during sprouting angiogenesis. *Blood* *121*, 2352–2362.
- Favier, B., Alam, A., Barron, P., Bonnin, J., Laboudie, P., Fons, P., Mandron, M., Herault, J.-P., Neufeld, G., Savi, P., et al. (2006).** Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* *108*, 1243–1250.
- Feistritzer, C., Mosheimer, B.A., Sturn, D.H., Bijuklic, K., Patsch, J.R., and Wiedermann, C.J. (2004).** Expression and function of the angiopoietin receptor Tie-2 in human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* *114*, 1077–1084.

- Felcht, M., Luck, R., Schering, A., Seidel, P., Srivastava, K., Hu, J., Bartol, A., Kienast, Y., Vettel, C., Loos, E.K., et al. (2012).** Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J. Clin. Invest.* *122*, 1991–2005.
- Ferrara, N. (2004).** Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *The Oncologist* *9 Suppl 1*, 2–10.
- Ferrara, N., and Adamis, A.P. (2016).** Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *15*, 385–403.
- Ferrara, N., and Henzel, W.J. (1989).** Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *161*, 851–858.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O’Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. (1996).** Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* *380*, 439–442.
- Ferrer, V.P., Moura Neto, V., and Mentlein, R. (2018).** Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators. *Glia* *66*, 1542–1565.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2006).** Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta* *1757*, 1371–1387.
- Fiedler, U., Krissl, T., Koidl, S., Weiss, C., Koblizek, T., Deutsch, U., Martiny-Baron, G., Marmé, D., and Augustin, H.G. (2003).** Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats. *J. Biol. Chem.* *278*, 1721–1727.
- Fiedler, U., Scharpfenecker, M., Koidl, S., Hegen, A., Grunow, V., Schmidt, J.M., Kriz, W., Thurston, G., and Augustin, H.G. (2004).** The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* *103*, 4150–4156.
- Fiedler, U., Reiss, Y., Scharpfenecker, M., Grunow, V., Koidl, S., Thurston, G., Gale, N.W., Witzenzath, M., Rosseau, S., Suttorp, N., et al. (2006).** Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat. Med.* *12*, 235–239.
- Filatova, A., Acker, T., and Garvalov, B.K. (2013).** The cancer stem cell niche(s): the crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta* *1830*, 2496–2508.
- Findley, H.W., Gu, L., Yeager, A.M., and Zhou, M. (1997).** Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *89*, 2986–2993.
- Folkman, J. (1971).** Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* *285*, 1182–1186.
- Folkman, J., and D’Amore, P.A. (1996).** Blood Vessel Formation: What Is Its Molecular Basis? *Cell* *87*, 1153–1155.
- Fong, G.H., Zhang, L., Bryce, D.M., and Peng, J. (1999).** Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* *126*, 3015–3025.

- Forster**, J.C., Harriss-Phillips, W.M., Douglass, M.J., and Bezak, E. (2017). A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment. *Hypoxia Auckl. NZ* 5, 21–32.
- Foulquier**, S., Daskalopoulos, E.P., Lluri, G., Hermans, K.C.M., Deb, A., and Blankesteyn, W.M. (2018). WNT Signaling in Cardiac and Vascular Disease. *Pharmacol. Rev.* 70, 68–141.
- Fukuhara**, S., Sako, K., Minami, T., Noda, K., Kim, H.Z., Kodama, T., Shibuya, M., Takakura, N., Koh, G.Y., and Mochizuki, N. (2008). Differential function of Tie2 at cell–cell contacts and cell–substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat. Cell Biol.* 10, 513–526.
- Fukumura**, D., Xu, L., Chen, Y., Gohongi, T., Seed, B., and Jain, R.K. (2001). Hypoxia and Acidosis Independently Up-Regulate Vascular Endothelial Growth Factor Transcription in Brain Tumors in Vivo. *Cancer Res.* 61, 6020–6024.
- Fulci**, G., Dmitrieva, N., Gianni, D., Fontana, E.J., Pan, X., Lu, Y., Kaufman, C.S., Kaur, B., Lawler, S.E., Lee, R.J., et al. (2007). Depletion of Peripheral Macrophages and Brain Microglia Increases Brain Tumor Titters of Oncolytic Viruses. *Cancer Res.* 67, 9398–9406.
- Funahashi**, Y., Shawber, C.J., Sharma, A., Kanamaru, E., Choi, Y.K., and Kitajewski, J. (2011). Notch modulates VEGF action in endothelial cells by inducing Matrix Metalloprotease activity. *Vasc. Cell* 3, 2.
- Gabrilovich**, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 162–174.
- Gabrusiewicz**, K., Hossain, M.B., Cortes-Santiago, N., Fan, X., Kaminska, B., Marini, F.C., Fueyo, J., and Gomez-Manzano, C. (2015). Macrophage Ablation Reduces M2-Like Populations and Jeopardizes Tumor Growth in a MAFIA-Based Glioma Model. *Neoplasia N. Y. N* 17, 374–384.
- Gabrusiewicz**, K., Li, X., Wei, J., Hashimoto, Y., Marisetty, A.L., Ott, M., Wang, F., Hawke, D., Yu, J., Healy, L.M., et al. (2018). Glioblastoma stem cell-derived exosomes induce M2 macrophages and PD-L1 expression on human monocytes. *Oncolmmunology* 7, e1412909.
- Galluzzi**, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541.
- Gao**, F., Cui, Y., Jiang, H., Sui, D., Wang, Y., Jiang, Z., Zhao, J., and Lin, S. (2016). Circulating tumor cell is a common property of brain glioma and promotes the monitoring system. *Oncotarget* 7, 71330–71340.
- García**, S., Krausz, S., Ambarus, C.A., Fernández, B.M., Hartkamp, L.M., van Es, I.E., Hamann, J., Baeten, D.L., Tak, P.P., and Reedquist, K.A. (2014). Tie2 Signaling Cooperates with TNF to Promote the Pro-Inflammatory Activation of Human Macrophages Independently of Macrophage Functional Phenotype. *PLoS ONE* 9.
- Garris**, C., and Pittet, M.J. (2013). Therapeutically reeducating macrophages to treat GBM. *Nat. Med.* 19, 1207–1208.
- Gasteiger**, G., D’Osualdo, A., Schubert, D.A., Weber, A., Bruscia, E.M., and Hartl, D. (2017). Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *J. Innate Immun.* 9, 111–125.
- Gaugler**, M.-H., Vereycken-Holler, V., Squiban, C., and Aigueperse, J. (2004). PECAM-1 (CD31) is required for interactions of platelets with endothelial cells after irradiation. *J. Thromb. Haemost.* 2, 2020–2026.

- Gavard, J., and Gutkind, J.S. (2006).** VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1223–1234.
- Gavard, J., Patel, V., and Gutkind, J.S. (2008).** Angiopoietin-1 Prevents VEGF-Induced Endothelial Permeability by Sequestering Src through mDia. *Dev. Cell* **14**, 25–36.
- Gérault, A. (2015).** Stratégies d’optimisation de la radiothérapie pour les glioblastomes : évaluations in vitro et in vivo. These de doctorat. Caen.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., et al. (2003).** VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* **161**, 1163–1177.
- Ghiringhelli, F., Puig, P.E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B., and Zitvogel, L. (2005).** Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.* **202**, 919–929.
- Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M.E., and Westphal, M. (2003).** Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 1624–1636.
- Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., et al. (2014).** A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **370**, 699–708.
- Gillen, J., Richardson, D., and Moore, K. (2019).** Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 Inhibitors: Clinical Development. *Curr. Oncol. Rep.* **21**, 22.
- Ginhoux, F., and Merad, M. (2011).** Les cellules de la microglie - Leurs origines extra-embryonnaires enfin révélées. *médecine/sciences* **27**, 719–724.
- Ginhoux, F., and Prinz, M. (2015).** Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**.
- Gjorgjevski, M., Hannen, R., Carl, B., Li, Y., Landmann, E., Buchholz, M., Bartsch, J.W., and Nimsy, C. (2019).** Molecular profiling of the tumor microenvironment in glioblastoma patients: correlation of microglia/macrophage polarization state with metalloprotease expression profiles and survival. *Biosci. Rep.* **39**.
- Goda, N., Ryan, H.E., Khadivi, B., McNulty, W., Rickert, R.C., and Johnson, R.S. (2003).** Hypoxia-inducible factor 1 α is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 359–369.
- Goede, V., Schmidt, T., Kimmina, S., Kozian, D., and Augustin, H.G. (1998).** Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **78**, 1385–1394.
- Gogineni, V.R., Nalla, A.K., Gupta, R., Dinh, D.H., Klopfenstein, J.D., and Rao, J.S. (2011).** Chk2-mediated G2/M Cell Cycle Arrest Maintains Radiation Resistance in Malignant Meningioma Cells. *Cancer Lett.* **313**, 64–75.
- Golstein, P., and Kroemer, G. (2007).** Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 37–43.

- Gonzalez-Meljem**, J.M., Apps, J.R., Fraser, H.C., and Martinez-Barbera, J.P. (2018). Paracrine roles of cellular senescence in promoting tumourigenesis. *Br. J. Cancer* *118*, 1283–1288.
- Goswami**, D., and Vestweber, D. (2016). How leukocytes trigger opening and sealing of gaps in the endothelial barrier. *F1000Research* *5*.
- Gough**, N.R. (2017). Making Immune “Cold” Tumors Hot | BioSerendipity.
- Grabowski**, M.M., Sankey, E.W., Ryan, K.J., Chongsathidkiet, P., Lorrey, S.J., Wilkinson, D.S., and Fecci, P.E. (2020). Immune suppression in gliomas. *J. Neurooncol.*
- Greene-Schloesser**, D., Robbins, M.E., Peiffer, A.M., Shaw, E.G., Wheeler, K.T., and Chan, M.D. (2012). Radiation-induced brain injury: A review. *Front. Oncol.* *2*.
- Grégoire**, H., Roncali, L., Rousseau, A., Chérel, M., Delneste, Y., Jeannin, P., Hindré, F., and Garcion, E. (2020). Targeting Tumor Associated Macrophages to Overcome Conventional Treatment Resistance in Glioblastoma. *Front. Pharmacol.* *11*.
- Grenga**, I., Kwilas, A.R., Donahue, R.N., Farsaci, B., and Hodge, J.W. (2015). Inhibition of the angiopoietin/Tie2 axis induces immunogenic modulation, which sensitizes human tumor cells to immune attack. *J. Immunother. Cancer* *3*.
- Grisanti**, S., Ferrari, V.D., Buglione, M., Agazzi, G.M., Liserre, R., Poliani, L., Buttolo, L., Gipponi, S., Pedersini, R., Consoli, F., et al. (2019). Second line treatment of recurrent glioblastoma with sunitinib: results of a phase II study and systematic review of literature. *J. Neurosurg. Sci.* *63*.
- de Groot**, J.F., Lamborn, K.R., Chang, S.M., Gilbert, M.R., Cloughesy, T.F., Aldape, K., Yao, J., Jackson, E.F., Lieberman, F., Robins, H.I., et al. (2011). Phase II Study of Aflibercept in Recurrent Malignant Glioma: A North American Brain Tumor Consortium Study. *J. Clin. Oncol.* *29*, 2689–2695.
- Habberstad**, A.H., Lind-Landström, T., Sundstrøm, S., and Torp, S.H. (2012). Primary human glioblastomas - prognostic value of clinical and histopathological parameters. *Clin. Neuropathol.* *31*, 361–368.
- Hachiya**, M., Shimizu, S., Osawa, Y., and Akashi, M. (1997). Endogenous production of tumour necrosis factor is required for manganese superoxide dismutase expression by irradiation in the human monocytic cell line THP-1. *Biochem. J.* *328*, 615–623.
- Hagemann**, T., Lawrence, T., McNeish, I., Charles, K.A., Kulbe, H., Thompson, R.G., Robinson, S.C., and Balkwill, F.R. (2008). “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF- κ B. *J. Exp. Med.* *205*, 1261–1268.
- Haibe**, Y., Kreidieh, M., El Hajj, H., Khalifeh, I., Mukherji, D., Temraz, S., and Shamseddine, A. (2020). Resistance Mechanisms to Anti-angiogenic Therapies in Cancer. *Front. Oncol.* *10*.
- Hambardzumyan**, D., and Bergers, G. (2015). Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends Cancer* *1*, 252–265.
- Hambardzumyan**, D., Gutmann, D.H., and Kettenmann, H. (2016). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat. Neurosci.* *19*, 20–27.
- Han**, S., Zhang, C., Li, Q., Dong, J., Liu, Y., Huang, Y., Jiang, T., and Wu, A. (2014). Tumour-infiltrating CD4 + and CD8 + lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br. J. Cancer* *110*, 2560–2568.

- Hanahan, D. (1997).** Signaling Vascular Morphogenesis and Maintenance. *Science* 277, 48–50.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000).** The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hara, S., Nakashima, S., Kiyono, T., Sawada, M., Yoshimura, S., Iwama, T., Banno, Y., Shinoda, J., and Sakai, N. (2004).** p53-Independent ceramide formation in human glioma cells during γ -radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 11, 853–861.
- Hardee, M.E., and Zagzag, D. (2012).** Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization. *Am. J. Pathol.* 181, 1126–1141.
- Harfouche, R., and Hussain, S.N.A. (2006).** Signaling and regulation of endothelial cell survival by angiopoietin-2. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 291, H1635–H1645.
- Hasmim, M., Messai, Y., Noman, M.Z., and Chouaib, S. (2014).** L'hypoxie tumorale - Un déterminant clé de la réactivité stromale et de la réponse antitumorale. *médecine/sciences* 30, 422–428.
- Hattermann, K., Sebens, S., Helm, O., Schmitt, A.D., Mentlein, R., Mehdorn, H.M., and Held-Feindt, J. (2014).** Chemokine expression profile of freshly isolated human glioblastoma-associated macrophages/microglia. *Oncol. Rep.* 32, 270–276.
- Heckmann, M., Douwes, K., Peter, R., and Degitz, K. (1998).** Vascular Activation of Adhesion Molecule mRNA and Cell Surface Expression by Ionizing Radiation. *Exp. Cell Res.* 238, 148–154.
- Hegen, A., Koidl, S., Weindel, K., Marmé, D., Augustin, H.G., and Fiedler, U. (2004).** Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive and negative regulatory promoter elements. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1803–1809.
- Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., et al. (2005).** MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 997–1003.
- Hellström, M., Phng, L.-K., Hofmann, J.J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A.-K., Karlsson, L., Gaiano, N., et al. (2007).** Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 445, 776–780.
- Henze, A.-T., and Acker, T. (2010).** Feedback regulators of hypoxia-inducible factors and their role in cancer biology. *Cell Cycle* 9, 2821–2835.
- Heynckes, S., Daka, K., Franco, P., Gaebelein, A., Frenking, J.H., Doria-Medina, R., Mader, I., Delev, D., Schnell, O., and Heiland, D.H. (2019).** Crosslink between Temozolomide and PD-L1 immune-checkpoint inhibition in glioblastoma multiforme. *BMC Cancer* 19.
- Hida, K., Ohga, N., Akiyama, K., Maishi, N., and Hida, Y. (2013).** Heterogeneity of tumor endothelial cells. *Cancer Sci.* 104, 1391–1395.
- Hildebrandt, G., Radlingmayr, A., Rosenthal, S., Rothe, R., Jahns, J., Hindemith, M., Rödel, F., and Kamprad, F. (2003).** Low-dose radiotherapy (LD-RT) and the modulation of iNOS expression in adjuvant-induced arthritis in rats. *Int. J. Radiat. Biol.* 79, 993–1001.
- Hirose, Y., Berger, M.S., and Pieper, R.O. (2001).** Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 61, 5843–5849.

- Holash, J.,** Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (1999). Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF. *Science* 284, 1994–1998.
- Holash, J.,** Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S.D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., et al. (2002). VEGF-Trap: A VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11393–11398.
- Holmes, K.,** Roberts, O.L., Thomas, A.M., and Cross, M.J. (2007). Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell. Signal.* 19, 2003–2012.
- Hong, T.-M.,** Teng, L.-J., Shun, C.-T., Peng, M.-C., and Tsai, J.-C. (2009). Induced interleukin-8 expression in gliomas by tumor-associated macrophages. *J. Neurooncol.* 93, 289–301.
- Hu, F.,** Vishwanath, K., Salama, J.K., Erkanli, A., Peterson, B., Oleson, J.R., Lee, W.T., Brizel, D.M., Ramanujam, N., and Dewhirst, M.W. (2016). Oxygen and perfusion kinetics in response to fractionated radiotherapy in FaDu head and neck cancer xenografts are related to treatment outcome. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 96, 462–469.
- Huang, P.,** Rani, M.R.S., Ahluwalia, M.S., Bae, E., Prayson, R.A., Weil, R.J., Nowacki, A.S., Hedayat, H., Sloan, A.E., Lathia, J.D., et al. (2012). Endothelial Expression of TNF Receptor-1 Generates a Pro-apoptotic Signal Inhibited by Integrin $\alpha 6\beta 1$ in Glioblastoma. *Cancer Res.* 72, 1428–1437.
- Hughes D.P.,** Marron M.B., and Brindle N.P.J. (2003). The Antiinflammatory Endothelial Tyrosine Kinase Tie2 Interacts With a Novel Nuclear Factor- κ B Inhibitor ABIN-2. *Circ. Res.* 92, 630–636.
- Hussain, S.F.,** Yang, D., Suki, D., Aldape, K., Grimm, E., and Heimberger, A.B. (2006). The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro-Oncol.* 8, 261–279.
- Hyman, D.M.,** Rizvi, N., Natale, R., Armstrong, D.K., Birrer, M., Recht, L., Dotan, E., Makker, V., Kaley, T., Kuruvilla, D., et al. (2018). Phase I Study of MEDI3617, a Selective Angiopoietin-2 Inhibitor Alone and Combined with Carboplatin/Paclitaxel, Paclitaxel, or Bevacizumab for Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 24, 2749–2757.
- Ignatova, T.N.,** Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., and Steindler, D.A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39, 193–206.
- Intlekofer, A.M.,** Dematteo, R.G., Venneti, S., Finley, L.W.S., Lu, C., Judkins, A.R., Rustenburg, A.S., Grinaway, P.B., Chodera, J.D., Cross, J.R., et al. (2015). Hypoxia Induces Production of L-2-Hydroxyglutarate. *Cell Metab.* 22, 304–311.
- Ishii, N.,** Tada, M., Sakuma, S., Sawamura, Y., Shinohe, Y., and Abe, H. (1998). Human astrocytoma cells are capable of producing macrophage inflammatory protein-1B. *J. Neurooncol.* 37, 17–23.
- Jackson, M.,** Hassiotou, F., and Nowak, A. (2015). Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis* 36, 177–185.
- Jain, R.K** (2005). Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* 307, 58–62.

- Jain, R.K., Sahoo, P., Tyagi, R., Mehta, A., Patir, R., Vaishya, S., Prakash, N., Vasudev, N., and Gupta, R.K. (2015).** Prospective glioma grading using single-dose dynamic contrast-enhanced perfusion MRI. *Clin. Radiol.* *70*, 1128–1135.
- Jakobsson, L., Kreuger, J., Holmborn, K., Lundin, L., Eriksson, I., Kjellén, L., and Claesson-Welsh, L. (2006).** Heparan Sulfate in trans Potentiates VEGFR-Mediated Angiogenesis. *Dev. Cell* *10*, 625–634.
- Janssen, M.H.M., Aerts, H.J.W.L., Kierkels, R.G.J., Backes, W.H., Öllers, M.C., Buijsen, J., Lambin, P., and Lammering, G. (2010).** Tumor perfusion increases during hypofractionated short-course radiotherapy in rectal cancer: Sequential perfusion-CT findings. *Radiother. Oncol.* *94*, 156–160.
- Jeon, H.-Y., Kim, J.-K., Ham, S.W., Oh, S.-Y., Kim, J., Park, J.-B., Lee, J.-Y., Kim, S.-C., and Kim, H. (2016).** Irradiation induces glioblastoma cell senescence and senescence-associated secretory phenotype. *Tumor Biol.* *37*, 5857–5867.
- Jetten, N., Verbruggen, S., Gijbels, M.J., Post, M.J., De Winther, M.P.J., and Donners, M.M.P.C. (2014).** Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* *17*, 109–118.
- Kachikwu, E.L., Iwamoto, K.S., Liao, Y.-P., DeMarco, J.J., Agazaryan, N., Economou, J.S., McBride, W.H., and Schae, D. (2011).** Radiation Enhances Regulatory T Cell Representation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *81*, 1128–1135.
- Kalish, S.V., Lyamina, S.V., Usanova, E.A., Manukhina, E.B., Larionov, N.P., and Malyshev, I.Y. (2015).** Macrophages Reprogrammed In Vitro Towards the M1 Phenotype and Activated with LPS Extend Lifespan of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* *21*, 226–234.
- Kallio, P., Jokinen, E., Högström, J., Das, S., Heino, S., Lähde, M., Brodtkin, J., Korhonen, E.A., and Alitalo, K. (2020).** Blocking Angiopoietin-2 Promotes Vascular Damage and Growth Inhibition in Mouse Tumors Treated with Small Doses of Radiation. *Cancer Res.* *80*, 2639–2650.
- Kanzawa, T., Germano, I.M., Kondo, Y., Ito, H., Kyo, S., and Kondo, S. (2003).** Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. *Br. J. Cancer* *89*, 922–929.
- Kärre, K. (2008).** Natural killer cell recognition of missing self. *Nat. Immunol.* *9*, 477–480.
- Kawai, N., Lin, W., Cao, W.-D., Ogawa, D., Miyake, K., Haba, R., Maeda, Y., Yamamoto, Y., Nishiyama, Y., and Tamiya, T. (2014).** Correlation between 18F-fluoromisonidazole PET and expression of HIF-1 α and VEGF in newly diagnosed and recurrent malignant gliomas. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* *41*, 1870–1878.
- Kawashima, T., Yashiro, M., Kasashima, H., Terakawa, Y., Uda, T., Nakajo, K., Umaba, R., Tanoue, Y., Tamrakar, S., and Ohata, K. (2019).** Oligodendrocytes Up-regulate the Invasive Activity of Glioblastoma Cells via the Angiopoietin-2 Signaling Pathway. *Anticancer Res.* *39*, 577–584.
- Keith, B., Johnson, R.S., and Simon, M.C. (2012).** HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 9–22.
- Kempf, H., Bleicher, M., and Meyer-Hermann, M. (2015).** Spatio-Temporal Dynamics of Hypoxia during Radiotherapy. *PLoS ONE* *10*.
- Kerbel, R.S. (2008).** Tumor angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* *358*, 2039–2049.

- Kernytsky, A., Wang, F., Hansen, E., Schalm, S., Straley, K., Gliser, C., Yang, H., Travins, J., Murray, S., Dorsch, M., et al. (2015).** IDH2 mutation-induced histone and DNA hypermethylation is progressively reversed by small-molecule inhibition. *Blood* *125*, 296–303.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972).** Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* *26*, 239–257.
- Kienast, Y., Klein, C., Scheuer, W., Raemsch, R., Lorenzon, E., Bernicke, D., Herting, F., Yu, S., The, H.H., Martarello, L., et al. (2013).** Ang-2-VEGF-A CrossMab, a Novel Bispecific Human IgG1 Antibody Blocking VEGF-A and Ang-2 Functions Simultaneously, Mediates Potent Antitumor, Antiangiogenic, and Antimetastatic Efficacy. *Clin. Cancer Res.* *19*, 6730–6740.
- Kim, Y.Z. (2014).** Altered Histone Modifications in Gliomas. *Brain Tumor Res. Treat.* *2*, 7–21.
- Kim, I., Kim, J.-H., Moon, S.-O., Kwak, H.J., Kim, N.-G., and Koh, G.Y. (2000a).** Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene* *19*, 4549–4552.
- Kim, I., Kim, H.G., So, J.N., Kim, J.H., Kwak, H.J., and Koh, G.Y. (2000b).** Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ. Res.* *86*, 24–29.
- Kim, Y.-H., Jung, T.-Y., Jung, S., Jang, W.-Y., Moon, K.-S., Kim, I.-Y., Lee, M.-C., and Lee, J.-J. (2012).** Tumour-infiltrating T-cell subpopulations in glioblastomas. *Br. J. Neurosurg.* *26*, 21–27.
- Kim, Y.-H., Yoo, K.-C., Cui, Y.-H., Uddin, N., Lim, E.-J., Kim, M.-J., Nam, S.-Y., Kim, I.-G., Suh, Y., and Lee, S.-J. (2014).** Radiation promotes malignant progression of glioma cells through HIF-1 α stabilization. *Cancer Lett.* *354*, 132–141.
- Kioi, M., Vogel, H., Schultz, G., Hoffman, R.M., Harsh, G.R., and Brown, J.M. (2010).** Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 694–705.
- Kleibeuker, E.A., Fokas, E., Allen, P.D., Kersemans, V., Griffioen, A.W., Beech, J., Im, J.H., Smart, S.C., Castricum, K.C., van den Berg, J., et al. (2016).** Low dose angiostatic treatment counteracts radiotherapy-induced tumor perfusion and enhances the anti-tumor effect. *Oncotarget* *7*, 76613–76627.
- Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2000).** Phenotype vs Genotype in the Evolution of Astrocytic Brain Tumors. *Toxicol. Pathol.* *28*, 164–170.
- Kleinberg, L., Sloan, L., Grossman, S., and Lim, M. (2019).** Radiotherapy, Lymphopenia, and Host Immune Capacity in Glioblastoma: A Potentially Actionable Toxicity Associated With Reduced Efficacy of Radiotherapy. *Neurosurgery* *85*, 441–453.
- Klopper, J., Riedemann, L., Amoozgar, Z., Seano, G., Susek, K., Yu, V., Dalvie, N., Amelung, R.L., Datta, M., Song, J.W., et al. (2016).** Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 4476–4481.

- Klug, F., Prakash, H., Huber, P.E., Seibel, T., Bender, N., Halama, N., Pfirschke, C., Voss, R.H., Timke, C., Umansky, L., et al. (2013).** Low-Dose Irradiation Programs Macrophage Differentiation to an iNOS+/M1 Phenotype that Orchestrates Effective T Cell Immunotherapy. *Cancer Cell* 24, 589–602.
- Knizhnik, A.V., Roos, W.P., Nikolova, T., Quiros, S., Tomaszowski, K.-H., Christmann, M., and Kaina, B. (2013).** Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS One* 8, e55665.
- Koch, S., and Claesson-Welsh, L. (2012).** Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
- Koch, C.J., Scheuermann, J.S., Divgi, C., Judy, K.D., Kachur, A.V., Freifelder, R., Reddin, J.S., Karp, J., Stubbs, J.B., Hahn, S.M., et al. (2010).** Biodistribution and dosimetry of 18F-EF5 in cancer patients with preliminary comparison of 18F-EF5 uptake versus EF5 binding in human glioblastoma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37, 2048–2059.
- Koga, K., Todaka, T., Morioka, M., Hamada, J., Kai, Y., Yano, S., Okamura, A., Takakura, N., Suda, T., and Ushio, Y. (2001).** Expression of angiopoietin-2 in human glioma cells and its role for angiogenesis. *Cancer Res.* 61, 6248–6254.
- Koh, M.Y., and Powis, G. (2012).** Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem. Sci.* 37, 364–372.
- Koh, Y.J., Kim, H.-Z., Hwang, S.-I., Lee, J.E., Oh, N., Jung, K., Kim, M., Kim, K.E., Kim, H., Lim, N.-K., et al. (2010).** Double Antiangiogenic Protein, DAAP, Targeting VEGF-A and Angiopoietins in Tumor Angiogenesis, Metastasis, and Vascular Leakage. *Cancer Cell* 18, 171–184.
- Koivunen, P., Lee, S., Duncan, C.G., Lopez, G., Lu, G., Ramkissoon, S., Losman, J.A., Joensuu, P., Bergmann, U., Gross, S., et al. (2012).** Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature* 483, 484–488.
- Kolesnick, R., and Fuks, Z. (2003).** Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 22, 5897–5906.
- Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J., and Takeya, M. (2008).** Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J. Pathol.* 216, 15–24.
- Korhonen, E.A., Lampinen, A., Giri, H., Anisimov, A., Kim, M., Allen, B., Fang, S., D’Amico, G., Sipilä, T.J., Lohela, M., et al. (2016).** Tie1 controls angiopoietin function in vascular remodeling and inflammation. *J. Clin. Invest.* 126, 3495–3510.
- Kozin, S.V., Kamoun, W.S., Huang, Y., Dawson, M.R., Jain, R.K., and Duda, D.G. (2010).** Recruitment of myeloid but not endothelial precursor cells facilitates tumor re-growth after local irradiation. *Cancer Res.* 70, 5679–5685.
- Kruse, C.A., Cepeda, L., Owens, B., Johnson, S.D., Stears, J., and Lillehei, K.O. (1997).** Treatment of recurrent glioma with intracavitary alloreactive cytotoxic T lymphocytes and interleukin-2. *Cancer Immunol. Immunother.* 45, 77–87.
- Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V., and Kastan, M.B. (1992).** Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7491–7495.

- Kvisten**, M., Mikkelsen, V.E., Stensjøen, A.L., Solheim, O., van der Want, J., and Torp, S.H. (2019). Microglia and macrophages in human glioblastomas: A morphological and immunohistochemical study. *Mol. Clin. Oncol.* *11*, 31–36.
- Kwak**, H.J., Lee, S.J., Lee, Y.-H., Ryu, C.H., Koh, K.N., Choi, H.Y., and Koh, G.Y. (2000). Angiopoietin-1 Inhibits Irradiation- and Mannitol-Induced Apoptosis in Endothelial Cells. *Circulation* *101*, 2317–2324.
- Labussière**, M., Cheneau, C., Prahst, C., Pérez-Larraya, J.G., Farina, P., Lombardi, G., Mokhtari, K., Rahimian, A., Delattre, J.-Y., Eichmann, A., et al. (2016). Angiopoietin-2 May Be Involved in the Resistance to Bevacizumab in Recurrent Glioblastoma. *Cancer Invest.* *34*, 39–44.
- Lafargue**, A., Degorre, C., Corre, I., Alves-Guerra, M.-C., Gaugler, M.-H., Vallette, F., Pecqueur, C., and Paris, F. (2017). Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation. *Free Radic. Biol. Med.* *108*, 750–759.
- Lai**, Y.-S., Wahyuningtyas, R., Aui, S.-P., and Chang, K.-T. (2019). Autocrine VEGF signalling on M2 macrophages regulates PD-L1 expression for immunomodulation of T cells. *J. Cell. Mol. Med.* *23*, 1257–1267.
- Lauber**, K., Ernst, A., Orth, M., Herrmann, M., and Belka, C. (2012). Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Front. Oncol.* *2*.
- Leblond**, M.M., Gérault, A.N., Corroyer-Dulmont, A., MacKenzie, E.T., Petit, E., Bernaudin, M., and Valable, S. (2015). Hypoxia induces macrophage polarization and re-education toward an M2 phenotype in U87 and U251 glioblastoma models. *Oncoimmunology* *5*.
- Leblond**, M.M., Pérès, E.A., Helaine, C., Gérault, A.N., Moulin, D., Anfray, C., Divoux, D., Petit, E., Bernaudin, M., and Valable, S. (2017). M2 macrophages are more resistant than M1 macrophages following radiation therapy in the context of glioblastoma. *Oncotarget* *8*, 72597–72612.
- Lee**, O.-H., Xu, J., Fueyo, J., Fuller, G.N., Aldape, K.D., Alonso, M.M., Piao, Y., Liu, T.-J., Lang, F.F., Bekele, B.N., et al. (2006a). Expression of the receptor tyrosine kinase Tie2 in neoplastic glial cells is associated with integrin beta1-dependent adhesion to the extracellular matrix. *Mol. Cancer Res. MCR* *4*, 915–926.
- Lee**, O.-H., Fueyo, J., Xu, J., Yung, W.K.A., Lemoine, M.G., Lang, F.F., Bekele, B.N., Zhou, X., Alonso, M.A., Aldape, K.D., et al. (2006b). Sustained Angiopoietin-2 Expression Disrupts Vessel Formation and Inhibits Glioma Growth. *Neoplasia N. Y. N* *8*, 419–428.
- Lee**, S., Jilani, S.M., Nikolova, G.V., Carpizo, D., and Iruela-Arispe, M.L. (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J. Cell Biol.* *169*, 681–691.
- Lee**, W.H., Cho, H.J., Sonntag, W.E., and Lee, Y.W. (2011). Radiation Attenuates Physiological Angiogenesis by Differential Expression of VEGF, Ang-1, Tie-2 and Ang-2 in Rat Brain. *Radiat. Res.* *176*, 753–760.
- Lee**, W.H., Warrington, J.P., Sonntag, W.E., and Lee, Y.W. (2012). IRRADIATION ALTERS MMP-2/TIMP-2 SYSTEM AND COLLAGEN TYPE IV DEGRADATION IN BRAIN. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *82*, 1559–1566.

- Lemieux, C., Maliba, R., Favier, J., Théorêt, J.-F., Merhi, Y., and Sirois, M.G. (2005).** Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood* *105*, 1523–1530.
- Leon, S.P., Folkherth, R.D., and Black, P.M. (1996).** Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer* *77*, 362–372.
- Leppänen, V.-M., Saharinen, P., and Alitalo, K. (2017).** Structural basis of Tie2 activation and Tie2/Tie1 heterodimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 4376–4381.
- Leung, S.Y., Wong, M.P., Chung, L.P., Chan, A.S.Y., and Yuen, S.T. (1997).** Monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *93*, 518–527.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007).** Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 678–689.
- Li, H., Li, J., Cheng, G., Zhang, J., and Li, X. (2016).** IDH mutation and MGMT promoter methylation are associated with the pseudoprogression and improved prognosis of glioblastoma multiforme patients who have undergone concurrent and adjuvant temozolomide-based chemoradiotherapy. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *151*, 31–36.
- Li, M., You, L., Xue, J., and Lu, Y. (2018).** Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review. *Front. Pharmacol.* *9*.
- Liao, E.-C., Hsu, Y.-T., Chuah, Q.-Y., Lee, Y.-J., Hu, J.-Y., Huang, T.-C., Yang, P.-M., and Chiu, S.-J. (2014).** Radiation induces senescence and a bystander effect through metabolic alterations. *Cell Death Dis.* *5*, e1255–e1255.
- Lin, P., Buxton, J.A., Acheson, A., Radziejewski, C., Maisonpierre, P.C., Yancopoulos, G.D., Channon, K.M., Hale, L.P., Dewhirst, M.W., George, S.E., et al. (1998).** Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 8829–8834.
- Lino, M.M., Merlo, A., and Boulay, J.-L. (2010).** Notch signaling in glioblastoma: a developmental drug target? *BMC Med.* *8*, 72.
- Liu, D., and Hornsby, P.J. (2007).** Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res.* *67*, 3117–3126.
- Liu, J., Liu, Y., Xie, T., Luo, L., Xu, C., Gao, Q., Shen, L., Wan, F., Lei, T., and Ye, F. (2018a).** Radiation-induced G2/M arrest rarely occurred in glioblastoma stem-like cells. *Int. J. Radiat. Biol.* *94*, 394–402.
- Liu, X., Zhang, Q., Mu, Y., Zhang, X., Sai, K., Pang, J.C.-S., Ng, H.-K., and Chen, Z. (2011).** Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas. *J. Neurooncol.* *105*, 173–179.
- Liu, Z., Kuang, W., Zhou, Q., and Zhang, Y. (2018b).** TGF- β 1 secreted by M2 phenotype macrophages enhances the stemness and migration of glioma cells via the SMAD2/3 signalling pathway. *Int. J. Mol. Med.* *42*, 3395–3403.
- Louis, D.N. (2006).** Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *1*, 97–117.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016).** The 2016 World Health Organization

Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 803–820.

Loureiro, L.V.M., Neder, L., Callegaro-Filho, D., de Oliveira Koch, L., Stavale, J.N., and Malheiros, S.M.F. (2020). The immunohistochemical landscape of the VEGF family and its receptors in glioblastomas. *Surg. Exp. Pathol.* 3, 9.

Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Kevin, S.L., et al. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatics. *Nature* 523, 337–341.

Lu-Emerson, C., Snuderl, M., Kirkpatrick, N.D., Goveia, J., Davidson, C., Huang, Y., Riedemann, L., Taylor, J., Ivy, P., Duda, D.G., et al. (2013). Increase in tumor-associated macrophages after antiangiogenic therapy is associated with poor survival among patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 15, 1079–1087.

Lugade, A.A., Sorensen, E.W., Gerber, S.A., Moran, J.P., Frelinger, J.G., and Lord, E.M. (2008). Radiation-Induced IFN- γ Production within the Tumor Microenvironment Influences Antitumor Immunity. *J. Immunol.* 180, 3132–3139.

Lumniczky, K., Desaknai, S., Mangel, L., Szende, B., Hamada, H., Hidvegi, E.J., and Safrany, G. (2002). Local tumor irradiation augments the antitumor effect of cytokine-producing autologous cancer cell vaccines in a murine glioma model. *Cancer Gene Ther.* 9, 44–52.

Machein, M.R., Knedla, A., Knoth, R., Wagner, S., Neuschl, E., and Plate, K.H. (2004). Angiopoietin-1 Promotes Tumor Angiogenesis in a Rat Glioma Model. *Am. J. Pathol.* 165, 1557–1570.

Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., and Herskind, C. (2016). Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int. J. Mol. Sci.* 17.

Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., et al. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277, 55–60.

Makinde, T., and Agrawal, D.K. (2008). Intra and extravascular transmembrane signalling of angiopoietin-1-Tie2 receptor in health and disease. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 810–828.

Malmer, B., Henriksson, R., and Grönberg, H. (2003). Familial brain tumours-genetics or environment? A nationwide cohort study of cancer risk in spouses and first-degree relatives of brain tumour patients. *Int. J. Cancer* 106, 260–263.

Maloney, J.P., and Gao, L. (2015). Proinflammatory Cytokines Increase Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Alveolar Epithelial Cells.

Mandriota, S.J., and Pepper, M.S. (1998). Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ. Res.* 83, 852–859.

Mann, J., Ramakrishna, R., Magge, R., and Wernicke, A.G. (2018). Advances in Radiotherapy for Glioblastoma. *Front. Neurol.* 8.

Mantovani, A., Bussolino, F., and Dejana, E. (1992). Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J.* 6, 2591–2599.

- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002).** Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* *23*, 549–555.
- Marques, F.G., Carvalho, L., Sousa, J.S., Rino, J., Diegues, I., Poli, E., Pina, F., Saúde, L., and Constantino Rosa Santos, S. (2020).** Low doses of ionizing radiation enhance angiogenesis and consequently accelerate post-embryonic development but not regeneration in zebrafish. *Sci. Rep.* *10*.
- Marquez, R.T., and Xu, L. (2012).** Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am. J. Cancer Res.* *2*, 214–221.
- Marteau, L., Valable, S., Divoux, D., Roussel, S.A., Touzani, O., MacKenzie, E.T., Bernaudin, M., and Petit, E. (2013).** Angiopoietin-2 is vasoprotective in the acute phase of cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *33*, 389–395.
- Martinez-Lage, M., Lynch, T.M., Bi, Y., Cocito, C., Way, G.P., Pal, S., Haller, J., Yan, R.E., Ziober, A., Nguyen, A., et al. (2019).** Immune landscapes associated with different glioblastoma molecular subtypes. *Acta Neuropathol. Commun.* *7*, 203.
- Masoud, G.N., and Li, W. (2015).** HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* *5*, 378–389.
- Mathivet, T., Bouletti, C., Van Woensel, M., Stanchi, F., Verschuere, T., Phng, L., Dejaegher, J., Balcer, M., Matsumoto, K., Georgieva, P.B., et al. (2017).** Dynamic stroma reorganization drives blood vessel dysmorphia during glioma growth. *EMBO Mol. Med.* *9*, 1629–1645.
- Maus, M.V., and Levine, B.L. (2016).** Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for the Community Oncologist. *The Oncologist* *21*, 608–617.
- McRobb, L.S., McKay, M.J., Gamble, J.R., Grace, M., Moutrie, V., Santos, E.D., Lee, V.S., Zhao, Z., Molloy, M.P., and Stoodley, M.A. (2017).** Ionizing radiation reduces ADAM10 expression in brain microvascular endothelial cells undergoing stress-induced senescence. *Aging* *9*, 1248–1262.
- Meadows, K.N., Bryant, P., and Pumiglia, K. (2001).** Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J. Biol. Chem.* *276*, 49289–49298.
- Meng, Y., Efimova, E.V., Hamzeh, K.W., Darga, T.E., Mauceri, H.J., Fu, Y.-X., Kron, S.J., and Weichselbaum, R.R. (2012).** Radiation-inducible immunotherapy for cancer: senescent tumor cells as a cancer vaccine. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *20*, 1046–1055.
- Migliorini, D., Dietrich, P.-Y., Stupp, R., Linette, G.P., Posey, A.D., and June, C.H. (2018).** CAR T-Cell Therapies in Glioblastoma: A First Look. *Clin. Cancer Res.* *24*, 535–540.
- Mittelbronn, M., Simon, P., Löffler, C., Capper, D., Bunz, B., Harter, P., Schlaszus, H., Schleich, A., Tabatabai, G., Goepfert, B., et al. (2007).** Elevated HLA-E levels in human glioblastomas but not in grade I to III astrocytomas correlate with infiltrating CD8⁺ cells. *J. Neuroimmunol.* *189*, 50–58.
- Mogensen, T.H. (2009).** Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* *22*, 240–273.
- Mollà, M., Gironella, M., Miquel, R., Tovar, V., Engel, P., Biete, A., Piqué, J.M., and Panés, J. (2003).** Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. *Int. J. Radiat. Oncol.* *57*, 264–273.

- Mori, H., Yao, Y., Learman, B.S., Kurozumi, K., Ishida, J., Ramakrishnan, S.K., Overmyer, K.A., Xue, X., Cawthorn, W.P., Reid, M.A., et al. (2016).** Induction of WNT11 by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 α regulates cell proliferation, migration and invasion. *Sci. Rep.* 6, 21520.
- Mrugala, M.M., and Chamberlain, M.C. (2008).** Mechanisms of disease: temozolomide and glioblastoma--look to the future. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 5, 476–486.
- Murakami, M. (2012).** Signaling Required for Blood Vessel Maintenance: Molecular Basis and Pathological Manifestations. *Int. J. Vasc. Med.* 2012.
- Murdoch, C., Giannoudis, A., and Lewis, C.E. (2004).** Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 104, 2224–2234.
- Murdoch, C., Tazzyman, S., Webster, S., and Lewis, C.E. (2007).** Expression of Tie-2 by Human Monocytes and Their Responses to Angiopoietin-2. *J. Immunol.* 178, 7405–7411.
- Najafi, M., Fardid, R., Hadadi, G., and Fardid, M. (2014).** The Mechanisms of Radiation-Induced Bystander Effect. *J. Biomed. Phys. Eng.* 4, 163–172.
- Nakada, M., Nambu, E., Furuyama, N., Yoshida, Y., Takino, T., Hayashi, Y., Sato, H., Sai, Y., Tsuji, T., Miyamoto, K.–., et al. (2013).** Integrin α 3 is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *Br. J. Cancer* 108, 2516–2524.
- Nambiar, D., Rajamani, P., and Singh, R.P. (2011).** Effects of phytochemicals on ionization radiation-mediated carcinogenesis and cancer therapy. *Mutat. Res.* 728, 139–157.
- Nduom, E.K., Wei, J., Yaghi, N.K., Huang, N., Kong, L.-Y., Gabrusiewicz, K., Ling, X., Zhou, S., Ivan, C., Chen, J.Q., et al. (2016).** PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 18, 195–205.
- Nelson, G., Kucheryavenko, O., Wordsworth, J., and von Zglinicki, T. (2018).** The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF- κ B signalling. *Mech. Ageing Dev.* 170, 30–36.
- Newcomb, E.W., and Zagzag, D. (2009).** The Murine GL261 Glioma Experimental Model to Assess Novel Brain Tumor Treatments. In *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets, and Therapeutic Approaches*, E.G. Meir, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 227–241.
- Nguyen, H.Q., To, N.H., Zadigue, P., Kerbrat, S., De La Taille, A., Le Gouvello, S., and Belkacemi, Y. (2018).** Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 129, 13–26.
- Niaudet, C., Bonnaud, S., Guillonneau, M., Gouard, S., Gaugler, M.-H., Dutoit, S., Ripoche, N., Dubois, N., Trichet, V., Corre, I., et al. (2017).** Plasma membrane reorganization links acid sphingomyelinase/ceramide to p38 MAPK pathways in endothelial cells apoptosis. *Cell. Signal.* 33, 10–21.
- Nübel, T., Dippold, W., Kaina, B., and Fritz, G. (2004).** Ionizing radiation-induced E-selectin gene expression and tumor cell adhesion is inhibited by lovastatin and all-trans retinoic acid. *Carcinogenesis* 25, 1335–1344.
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., and Weinert, T.A. (2002).** Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* 36, 617–656.

- Okubo**, M., Kioi, M., Nakashima, H., Sugiura, K., Mitsudo, K., Aoki, I., Taniguchi, H., and Tohnai, I. (2016). M2-polarized macrophages contribute to neovasculogenesis, leading to relapse of oral cancer following radiation. *Sci. Rep.* 6.
- Oliner**, J., Min, H., Leal, J., Yu, D., Rao, S., You, E., Tang, X., Kim, H., Meyer, S., Han, S.J., et al. (2004). Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer Cell* 6, 507–516.
- Olsson**, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 359–371.
- Orrego**, E., Castaneda, C.A., Castillo, M., Bernabe, L.A., Casavilca, S., Chakravarti, A., Meng, W., Garcia-Corrochano, P., Villa-Robles, M.R., Zevallos, R., et al. (2018). Distribution of tumor-infiltrating immune cells in glioblastoma. *CNS Oncol.* 7, CNS21.
- Oshige**, H., Yamahara, T., Oishi, T., Li, Y., Zhen, Y., Numa, Y., and Kawamoto, K. (2010). Flow cytometric analysis for the mechanism of the new antineoplastic agent temozolomide in glioma cells. *Brain Tumor Pathol.* 27, 7–15.
- Oshima**, Y., Oshima, S., Nambu, H., Kachi, S., Takahashi, K., Umeda, N., Shen, J., Dong, A., Apte, R.S., Duh, E., et al. (2005). Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds in the eye: new vessels are most sensitive. *FASEB J.* 19, 963–965.
- Osswald**, M., Solecki, G., Wick, W., and Winkler, F. (2015). A malignant cellular network in gliomas: potential clinical implications. *Neuro-Oncol.* 18, 479–485.
- Osterberg**, N., Ferrara, N., Vacher, J., Gaedicke, S., Niedermann, G., Weyerbrock, A., Doostkam, S., Schaefer, H.-E., Plate, K.H., and Machein, M.R. (2016). Decrease of VEGF-A in myeloid cells attenuates glioma progression and prolongs survival in an experimental glioma model. *Neuro-Oncol.* 18, 939–949.
- Ostrom**, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., et al. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncol.* 16, 896–913.
- Otomo**, T., Hishii, M., Arai, H., Sato, K., and Sasai, K. (2004). Microarray analysis of temporal gene responses to ionizing radiation in two glioblastoma cell lines: up-regulation of DNA repair genes. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 45, 53–60.
- Oyama**, T., Ran, S., Ishida, T., Nadaf, S., Kerr, L., Carbone, D.P., and Gabilovich, D.I. (1998). Vascular Endothelial Growth Factor Affects Dendritic Cell Maturation Through the Inhibition of Nuclear Factor- κ B Activation in Hemopoietic Progenitor Cells. *J. Immunol.* 160, 1224–1232.
- Padhani**, A.R., Krohn, K.A., Lewis, J.S., and Alber, M. (2007). Imaging oxygenation of human tumours. *Eur. Radiol.* 17, 861–872.
- Parati**, E.A., Bez, A., Ponti, D., de Grazia, U., Corsini, E., Cova, L., Sala, S., Colombo, A., Alessandri, G., and Pagano, S.F. (2002). Human neural stem cells express extra-neural markers. *Brain Res.* 925, 213–221.
- Paris**, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodiceci, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., and Kolesnick, R. (2001). Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293, 293–297.

- Paris, F., Lafargue, A., Pecqueur, C., and Vallette, F. (2014).** OC-0050: Radiation-induced endothelial senescence is under the control of p53 and mitochondrial dysfunction. *Radiother. Oncol.* *111*, S18–S19.
- Park, J.-S., Kim, I.-K., Han, S., Park, I., Kim, C., Bae, J., Oh, S.J., Lee, S., Kim, J.H., Woo, D.-C., et al. (2016a).** Normalization of Tumor Vessels by Tie2 Activation and Ang2 Inhibition Enhances Drug Delivery and Produces a Favorable Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* *30*, 953–967.
- Park, Y.S., Kim, G., Jin, Y.M., Lee, J.Y., Shin, J.W., and Jo, I. (2016b).** Expression of angiopoietin-1 in hypoxic pericytes: Regulation by hypoxia-inducible factor-2 α and participation in endothelial cell migration and tube formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *469*, 263–269.
- Pawlus, M.R., and Hu, C.-J. (2013).** Enhanceosomes as integrators of hypoxia inducible factor (HIF) and other transcription factors in the hypoxic transcriptional response. *Cell. Signal.* *25*, 1895–1903.
- Pelegrin, P., and Surprenant, A. (2009).** Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphates. *EMBO J.* *28*, 2114–2127.
- Peña, L.A., Fuks, Z., and Kolesnick, R.N. (2000).** Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res.* *60*, 321–327.
- Pérès, E.A., Gérault, A.N., Valable, S., Roussel, S., Toutain, J., Divoux, D., Guillamo, J.-S., Sanson, M., Bernaudin, M., and Petit, E. (2014).** Silencing erythropoietin receptor on glioma cells reinforces efficacy of temozolomide and X-rays through senescence and mitotic catastrophe. *Oncotarget* *6*, 2101–2119.
- Perrio, C. (2018).** [18F]FLUSONIM : un nouveau radiotraceur pour l'imagerie TEP de l'hypoxie à fort contraste et délai ultra-court. p.
- Persano, L., Rampazzo, E., Basso, G., and Viola, G. (2013).** Glioblastoma cancer stem cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem. Pharmacol.* *85*, 612–622.
- Peters, S., Cree, I.A., Alexander, R., Turowski, P., Ockrim, Z., Patel, J., Boyd, S.R., Jousen, A.M., Ziemssen, F., Hykin, P.G., et al. (2007).** Angiopoietin modulation of vascular endothelial growth factor: Effects on retinal endothelial cell permeability. *Cytokine* *40*, 144–150.
- Peterson, T.E., Kirkpatrick, N.D., Huang, Y., Farrar, C.T., Marijt, K.A., Kloepper, J., Datta, M., Amoozgar, Z., Seano, G., Jung, K., et al. (2016).** Dual inhibition of Ang-2 and VEGF receptors normalizes tumor vasculature and prolongs survival in glioblastoma by altering macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 4470–4475.
- Piao, Y., Liang, J., Holmes, L., Zurita, A.J., Henry, V., Heymach, J.V., and de Groot, J.F. (2012).** Glioblastoma resistance to anti-VEGF therapy is associated with myeloid cell infiltration, stem cell accumulation, and a mesenchymal phenotype. *Neuro-Oncol.* *14*, 1379–1392.
- Pichiule, P., Chavez, J.C., and LaManna, J.C. (2004).** Hypoxic regulation of angiopoietin-2 expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 12171–12180.
- Ping, Y.-F., and Bian, X.-W. (2011).** Concise Review: Contribution of Cancer Stem Cells to Neovascularization. *STEM CELLS* *29*, 888–894.

- Pituch**, K.C., Miska, J., Krenciute, G., Panek, W.K., Li, G., Rodriguez-Cruz, T., Wu, M., Han, Y., Lesniak, M.S., Gottschalk, S., et al. (2018). Adoptive Transfer of IL13R α 2-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells Creates a Pro-inflammatory Environment in Glioblastoma. *Mol. Ther.* 26, 986–995.
- Plate**, K.H., Breier, G., Weich, H.A., and Risau, W. (1992). Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 359, 845–848.
- Plate**, K.H., Breier, G., Millauer, B., Ullrich, A., and Risau, W. (1993). Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Cognate Receptors in a Rat Glioma Model of Tumor Angiogenesis. *Cancer Res.* 53, 5822–5827.
- Plouët**, J., Schilling, J., and Gospodarowicz, D. (1989). Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* 8, 3801–3806.
- te Poele**, R.H., Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S.P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 62, 1876–1883.
- Popkov**, M., Jendreyko, N., McGavern, D.B., Rader, C., and Barbas, C.F. (2005). Targeting Tumor Angiogenesis with Adenovirus-Delivered Anti-Tie-2 Intrabody. *Cancer Res.* 65, 972–981.
- Potiron**, V.A., Abderrahmani, R., Clément-Colmou, K., Marionneau-Lambot, S., Oullier, T., Paris, F., and Supiot, S. (2013). Improved Functionality of the Vasculature during Conventionally Fractionated Radiation Therapy of Prostate Cancer. *PLoS ONE* 8.
- Prasetyanti**, P.R., and Medema, J.P. (2017). Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol. Cancer* 16.
- Prins**, R.M., Soto, H., Konkankit, V., Odesa, S.K., Eskin, A., Yong, W.H., Nelson, S.F., and Liao, L.M. (2011). Gene expression profile correlates with T cell infiltration and relative survival in glioblastoma patients vaccinated with dendritic cell immunotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 1603–1615.
- Prior**, B.M., Yang, H.T., and Terjung, R.L. (2004). What makes vessels grow with exercise training? *J. Appl. Physiol.* 97, 1119–1128.
- Prośniak**, M., Harshyne, L.A., Andrews, D.W., Kenyon, L.C., Bedelbaeva, K., Apanasovich, T.V., Heber-Katz, E., Curtis, M.T., Cotzia, P., and Hooper, D.C. (2013). Glioma Grade Is Associated with the Accumulation and Activity of Cells Bearing M2 Monocyte Markers. *Clin. Cancer Res.* 19, 3776–3786.
- Qi**, L., Yu, H., Zhang, Y., Zhao, D., Lv, P., Zhong, Y., and Xu, Y. (2016). IL-10 secreted by M2 macrophage promoted tumorigenesis through interaction with JAK2 in glioma. *Oncotarget* 7, 71673–71685.
- Qiao**, J, L., Lj, L., Bj, N., P, L., F, X., and Zm, Z. (2018). The effects of interleukin 2 and rAd-p53 as a treatment for glioblastoma.
- Qin**, T., Wang, C., Chen, X., Duan, C., Zhang, X., Zhang, J., Chai, H., Tang, T., Chen, H., Yue, J., et al. (2015). Dopamine induces growth inhibition and vascular normalization through reprogramming M2-polarized macrophages in rat C6 glioma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 286, 112–123.
- Qiu**, B., Zhang, D., Wang, C., Tao, J., Tie, X., Qiao, Y., Xu, K., Wang, Y., and Wu, A. (2011). IL-10 and TGF- β 2 are overexpressed in tumor spheres cultured from human gliomas. *Mol. Biol. Rep.* 38, 3585–3591.

- Rampling, R., Cruickshank, G., Lewis, A.D., Fitzsimmons, S.A., and Workman, P. (1994).** Direct measurement of pO₂ distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *29*, 427–431.
- Rampling, R., Peoples, S., Mulholland, P.J., James, A., Al-Salihi, O., Twelves, C.J., McBain, C., Jefferies, S., Jackson, A., Stewart, W., et al. (2016).** A Cancer Research UK First Time in Human Phase I Trial of IMA950 (Novel Multi Peptide Therapeutic Vaccine) in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma. *Clin. Cancer Res.*
- Rao, S.G., and Jackson, J.G. (2016).** SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes! *Trends Cancer* *2*, 676–687.
- Raychaudhuri, B., Rayman, P., Ireland, J., Ko, J., Rini, B., Borden, E.C., Garcia, J., Vogelbaum, M.A., and Finke, J. (2011).** Myeloid-derived suppressor cell accumulation and function in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro-Oncol.* *13*, 591–599.
- Reap, E.A., Roof, K., Maynor, K., Borrero, M., Booker, J., and Cohen, P.L. (1997).** Radiation and stress-induced apoptosis: A role for Fas/Fas ligand interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 5750–5755.
- Reardon, D.A., Lassman, A.B., Schiff, D., Yunus, S.A., Gerstner, E.R., Cloughesy, T.F., Lee, E.Q., Gaffey, S.C., Barrs, J., Bruno, J., et al. (2018).** Phase 2 and biomarker study of trebananib, an angiopoietin-blocking peptibody, with and without bevacizumab for patients with recurrent glioblastoma. *Cancer* *124*, 1438–1448.
- Reichert, M., Steinbach, J.P., Supra, P., and Weller, M. (2002).** Modulation of growth and radiochemosensitivity of human malignant glioma cells by acidosis. *Cancer* *95*, 1113–1119.
- Reiss, Y., Machein, M.R., and Plate, K.H. (2005).** The Role of Angiopoietins During Angiogenesis in Gliomas. *Brain Pathol.* *15*, 311–317.
- Rello-Varona, S., Lissa, D., Shen, S., Niso-Santano, M., Senovilla, L., Mariño, G., Vitale, I., Jemaá, M., Harper, F., Pierron, G., et al. (2012).** Autophagic removal of micronuclei. *Cell Cycle Georget. Tex* *11*, 170–176.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E.A., Stassi, G., Larocca, L.M., et al. (2010).** Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* *468*, 824–828.
- Risau, W. (1997).** Mechanisms of angiogenesis. *Nature* *386*, 671–674.
- Risau, W. (1998).** Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int.* *54*, S3–S6.
- Risau, W., and Flamme, I. (1995).** Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *11*, 73–91.
- Rivera, L.B., and Bergers, G. (2015).** Myeloid cell-driven angiogenesis and immune regulation in tumors. *Trends Immunol.* *36*, 240–249.
- Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009).** Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* *11*, 973–979.
- Roesch, S., Rapp, C., Dettling, S., and Herold-Mende, C. (2018).** When Immune Cells Turn Bad—Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.

- Roos**, W.P., Batista, L.F.Z., Naumann, S.C., Wick, W., Weller, M., Menck, C.F.M., and Kaina, B. (2007). Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O⁶-methylguanine. *Oncogene* 26, 186–197.
- Rubartelli**, A., Lotze, M.T., Latz, E., and Manfredi, A. (2013). Mechanisms of Sterile Inflammation. *Front. Immunol.* 4.
- Ryan**, K.M. (2011). p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 47, 44–50.
- Saha**, D., Martuza, R.L., and Rabkin, S.D. (2017). Macrophage polarization contributes to glioblastoma eradication by combination immunovirotherapy and immune checkpoint blockade. *Cancer Cell* 32, 253–267..
- Salminen**, A., Kauppinen, A., and Kaarniranta, K. (2012). Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell. Signal.* 24, 835–845.
- Sayour**, E.J., McLendon, P., McLendon, R., De Leon, G., Reynolds, R., Kresak, J., Sampson, J.H., and Mitchell, D.A. (2015). Increased proportion of FoxP3⁺ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 64, 419–427.
- Scavelli**, C., Nico, B., Cirulli, T., Ria, R., Di Pietro, G., Mangieri, D., Bacigalupo, A., Mangialardi, G., Coluccia, A.M.L., Caravita, T., et al. (2008). Vasculogenic mimicry by bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Oncogene* 27, 663–674.
- Scholz**, A., Harter, P.N., Cremer, S., Yalcin, B.H., Gurnik, S., Yamaji, M., Di Tacchio, M., Sommer, K., Baumgarten, P., Bähr, O., et al. (2016). Endothelial cell-derived angiopoietin-2 is a therapeutic target in treatment-naïve and bevacizumab-resistant glioblastoma. *EMBO Mol. Med.* 8, 39–57.
- Seano**, G., and Jain, R.K. (2020). Vessel co-option in glioblastoma: emerging insights and opportunities. *Angiogenesis* 23, 9–16.
- Seifert**, L., Werba, G., Tiwari, S., Ly, N.N.G., Nguy, S., Allothman, S., Alqunaibit, D., Avanzi, A., Daley, D., Barilla, R., et al. (2016). Radiation Therapy Induces Macrophages to Suppress T-Cell Responses Against Pancreatic Tumors in Mice. *Gastroenterology* 150, 1659–1672.e5.
- Semenza**, G.L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 51–56.
- Semenza**, G.L., and Wang, G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5447–5454.
- Senger**, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., and Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983–985.
- Senger**, D.R., Connolly, D.T., Van de Water, L., Feder, J., and Dvorak, H.F. (1990). Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res.* 50, 1774–1778.

- Sennino, B., Falcón, B.L., McCauley, D., Le, T., McCauley, T., Kurz, J.C., Haskell, A., Epstein, D.M., and McDonald, D.M. (2007).** Sequential Loss of Tumor Vessel Pericytes and Endothelial Cells after Inhibition of Platelet-Derived Growth Factor B by Selective Aptamer AX102. *Cancer Res.* 67, 7358–7367.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. (1995).** Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62–66.
- Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, P.S., Choi, D., and Funk, W.D. (1999).** Microarray analysis of replicative senescence. *Curr. Biol.* CB 9, 939–945.
- Shevach, E.M. (2009).** Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. *Immunity* 30, 636–645.
- Shibuya, M., and Claesson-Welsh, L. (2006).** Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* 312, 549–560.
- Sielska, M., Przanowski, P., Wylot, B., Gabrusiewicz, K., Maleszewska, M., Kijewska, M., Zawadzka, M., Kucharska, J., Vinnakota, K., Kettenmann, H., et al. (2013).** Distinct roles of CSF family cytokines in macrophage infiltration and activation in glioma progression and injury response. *J. Pathol.* 230, 310–321.
- Simon, M.C. (2016).** The Hypoxia Response Pathways — Hats Off! *N. Engl. J. Med.* 375, 1687–1689.
- Simon, M.-P., Tournaire, R., and Pouyssegur, J. (2008).** The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. *J. Cell. Physiol.* 217, 809–818.
- Singh, H., Hansen, T.M., Patel, N., and Brindle, N.P.J. (2012).** The molecular balance between receptor tyrosine kinases Tie1 and Tie2 is dynamically controlled by VEGF and TNF α and regulates Angiopoietin signalling. *PLoS ONE* 7.
- Smith-Pearson, P.S., Kooshki, M., Spitz, D.R., Poole, L.B., Zhao, W., and Robbins, M.E. (2008).** Decreasing peroxiredoxin II expression decreases glutathione, alters cell cycle distribution, and sensitizes glioma cells to ionizing radiation and H₂O₂. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1178–1189.
- Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R.D., Engh, J., Iwama, T., Kunisada, T., Kassam, A.B., et al. (2009).** Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α . *Oncogene* 28, 3949–3959.
- Sofia Vala, I., Martins, L.R., Imaizumi, N., Nunes, R.J., Rino, J., Kuonen, F., Carvalho, L.M., Rüegg, C., Grillo, I.M., Barata, J.T., et al. (2010).** Low Doses of Ionizing Radiation Promote Tumor Growth and Metastasis by Enhancing Angiogenesis. *PLoS ONE* 5.
- Solecki, G., Osswald, M., Weber, D., Glock, M., Ratliff, M., Müller, H.-J., Krieter, O., Kienast, Y., Wick, W., and Winkler, F. (2019).** Differential Effects of Ang-2/VEGF-A Inhibiting Antibodies in Combination with Radio- or Chemotherapy in Glioma. *Cancers* 11.
- Somanath, P.R., Malinin, N.L., and Byzova, T.V. (2009).** Cooperation between integrin $\alpha\beta$ 3 and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis* 12, 177–185.

- Son**, M.J., Kim, J.-S., Kim, M.H., Song, H.S., Kim, J.T., Kim, H., Shin, T., Jeon, H.J., Lee, D.-S., Park, S.-Y., et al. (2006). Combination treatment with temozolomide and thalidomide inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic glioma model. *Int. J. Oncol.* *28*, 53–59.
- Soubéran**, A., Brustlein, S., Gouarné, C., Chasson, L., Tchoghandjian, A., Malissen, M., and Rougon, G. (2019). Effects of VEGF blockade on the dynamics of the inflammatory landscape in glioblastoma-bearing mice. *J. Neuroinflammation* *16*, 191.
- Souma**, T., Thomson, B.R., Heinen, S., Carota, I.A., Yamaguchi, S., Onay, T., Liu, P., Ghosh, A.K., Li, C., Eremina, V., et al. (2018). Context-dependent functions of angiopoietin 2 are determined by the endothelial phosphatase VEPTP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, 1298–1303.
- Spasic**, E., Buchheit, I., Bernier, V., and Noël, A. (2011). [Dosimetry comparison of irradiation with conformal radiotherapy, intensity modulated radiotherapy, conformal radiotherapy in stereotactic conditions and robotic stereotactic radiotherapy for benign brain tumours]. *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* *15*, 287–293.
- Spence**, A.M., Muzi, M., Swanson, K.R., O’Sullivan, F., Rockhill, J.K., Rajendran, J.G., Adamsen, T.C.H., Link, J.M., Swanson, P.E., Yagle, K.J., et al. (2008). Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 2623–2630.
- Stafford**, J.H., Hirai, T., Deng, L., Chernikova, S.B., Urata, K., West, B.L., and Brown, J.M. (2016). Colony stimulating factor 1 receptor inhibition delays recurrence of glioblastoma after radiation by altering myeloid cell recruitment and polarization. *Neuro-Oncol.* *18*, 797–806.
- Stessin**, A.M., Clausi, M.G., Zhao, Z., Lin, H., Hou, W., Jiang, Z., Duong, T.Q., Tsirka, S.E., and Ryu, S. (2020). Repolarized macrophages, induced by intermediate stereotactic dose radiotherapy and immune checkpoint blockade, contribute to long-term survival in glioma-bearing mice. *J. Neurooncol.* *147*, 547–555.
- Stiles**, C.D., and Rowitch, D.H. (2008). Glioma stem cells: a midterm exam. *Neuron* *58*, 832–846.
- Stratmann**, A., Risau, W., and Plate, K.H. (1998). Cell Type-Specific Expression of Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 Suggests a Role in Glioblastoma Angiogenesis. *Am. J. Pathol.* *153*, 1459–1466.
- Stupp**, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 987–996.
- Stupp**, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* *10*, 459–466.
- Sundberg**, C., Kowanetz, M., Brown, L.F., Detmar, M., and Dvorak, H.F. (2002). Stable Expression of Angiopoietin-1 and Other Markers by Cultured Pericytes: Phenotypic Similarities to a Subpopulation of Cells in Maturing Vessels During Later Stages of Angiogenesis In Vivo. *Lab. Invest.* *82*, 387–401.

- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., and Yancopoulos, G.D. (1996).** Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87, 1171–1180.
- Suri, C., McClain, J., Thurston, G., McDonald, D.M., Zhou, H., Oldmixon, E.H., Sato, T.N., and Yancopoulos, G.D. (1998).** Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 282, 468–471.
- Surova, O., and Zhivotovsky, B. (2013).** Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* 32, 3789–3797.
- Swartz, M.A., Iida, N., Roberts, E.W., Sangaletti, S., Wong, M.H., Yull, F.E., Coussens, L.M., and DeClerck, Y.A. (2012).** Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res.* 72, 2473–2480.
- Swift, M.R., and Weinstein, B.M. (2009).** Arterial-venous specification during development. *Circ. Res.* 104, 576–588.
- Szatmári, T., Lumniczky, K., Désaknai, S., Trajcevski, S., Hídvégi, E.J., Hamada, H., and Sáfrány, G. (2006).** Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci.* 97, 546–553.
- Szmitko, P.E., Wang Chao-Hung, Weisel Richard D., de Almeida John R., Anderson Todd J., and Verma Subodh (2003).** New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation. *Circulation* 108, 1917–1923.
- Tacchio, M.D., Macas, J., Weissenberger, J., Sommer, K., Bähr, O., Steinbach, J.P., Senft, C., Seifert, V., Glas, M., Herrlinger, U., et al. (2019).** Tumor Vessel Normalization, Immunostimulatory Reprogramming, and Improved Survival in Glioblastoma with Combined Inhibition of PD-1, Angiopoietin-2, and VEGF. *Cancer Immunol. Res.* 7, 1910–1927.
- Tait, C.R., and Jones, P.F. (2004).** Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. *J. Pathol.* 204, 1–10.
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., and Shibuya, M. (2001).** A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 20, 2768–2778.
- Tateishi, K., Tateishi, U., Sato, M., Yamanaka, S., Kanno, H., Murata, H., Inoue, T., and Kawahara, N. (2013).** Application of ^{62}Cu -diacetyl-bis (N4-methylthiosemicarbazone) PET imaging to predict highly malignant tumor grades and hypoxia-inducible factor-1 α expression in patients with glioma. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 34, 92–99.
- Teichert-Kuliszewska, K., Maisonpierre, P.C., Jones, N., Campbell, A.I.M., Master, Z., Bendeck, M.P., Alitalo, K., Dumont, D.J., Yancopoulos, G.D., and Stewart, D.J. (2001).** Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc. Res.* 49, 659–670.
- Teresa Pinto, A., Laranjeiro Pinto, M., Patrícia Cardoso, A., Monteiro, C., Teixeira Pinto, M., Filipe Maia, A., Castro, P., Figueira, R., Monteiro, A., Marques, M., et al. (2016).** Ionizing radiation modulates human macrophages towards a pro-inflammatory phenotype preserving their pro-invasive and pro-angiogenic capacities. *Sci. Rep.* 6, 1–15.

- Thomas, L. (1982).** On immunosurveillance in human cancer. *Yale J. Biol. Med.* *55*, 329–333.
- Thurston, G. (2002).** Complementary actions of VEGF and Angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *J. Anat.* *200*, 575–580.
- Tomita, M., and Maeda, M. (2015).** Mechanisms and biological importance of photon-induced bystander responses: do they have an impact on low-dose radiation responses. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *56*, 205–219.
- Torre, F.R.-D.L., Rodriguez-Baeza, A., and Sahuquillo-Barris, J. (1998).** Morphological characteristics and distribution pattern of the arterial vessels in human cerebral cortex: A scanning electron microscope study. *Anat. Rec.* *251*, 87–96.
- Trikha, P., and Carson, W.E. (2014).** Signaling pathways involved in MDSC regulation. *Biochim. Biophys. Acta* *1846*, 55–65.
- Tsuzuki, Y., Fukumura, D., Oosthuysen, B., Koike, C., Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000).** Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Modulation by Targeting Hypoxia-inducible Factor-1 α \rightarrow Hypoxia Response Element \rightarrow VEGF Cascade Differentially Regulates Vascular Response and Growth Rate in Tumors. *Cancer Res.* *60*, 6248–6252.
- Turkowski, K., Brandenburg, S., Mueller, A., Kremenetskaia, I., Bungert, A.D., Blank, A., Felsenstein, M., and Vajkoczy, P. (2018).** VEGF as a modulator of the innate immune response in glioblastoma. *Glia* *66*, 161–174.
- Turpin, A., Sharif, A., Stoven, L., Blond, S., Maurage, C.-A., and Le Rhun, É. (2015).** La niche des cellules souches tumorales dans le glioblastome : des aspects fondamentaux au ciblage thérapeutique. *Bull. Cancer (Paris)* *102*, 24–33.
- Uemura, A., Ogawa, M., Hirashima, M., Fujiwara, T., Koyama, S., Takagi, H., Honda, Y., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G.D., and Nishikawa, S.-I. (2002).** Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J. Clin. Invest.* *110*, 1619–1628.
- Ungvari, Z., Podlutzky, A., Sosnowska, D., Tucsek, Z., Toth, P., Deak, F., Gautam, T., Csiszar, A., and Sonntag, W.E. (2013).** Ionizing radiation promotes the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype and impairs angiogenic capacity in cerebrovascular endothelial cells: role of increased DNA damage and decreased DNA repair capacity in microvascular radiosensitivity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *68*, 1443–1457.
- Valable, S., Bellail, A., Lesné, S., Liot, G., Mackenzie, E.T., Vivien, D., Bernaudin, M., and Petit, E. (2003).** Angiopoietin-1-induced PI3-kinase activation prevents neuronal apoptosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 443–445.
- Valable, S., Eddi, D., Constans, J.-M., Guillamo, J.-S., Bernaudin, M., Roussel, S., and Petit, E. (2009).** MRI assessment of hemodynamic effects of angiopoietin-2 overexpression in a brain tumor model. *Neuro-Oncol.* *11*, 488–502.
- Valable, S., Petit, E., Roussel, S., Marteau, L., Toutain, J., Divoux, D., Sobrio, F., Delamare, J., Barré, L., and Bernaudin, M. (2011).** Complementary information from magnetic resonance imaging and ¹⁸F-fluoromisonidazole positron emission tomography in the assessment of the response to an antiangiogenic treatment in a rat brain tumor model. *Nucl. Med. Biol.* *38*, 781–793.

- Van Meir**, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.-K., Wen, P.Y., and Olson, J.J. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA. Cancer J. Clin.* 60, 166–193.
- Vander Heiden**, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324, 1029–1033.
- Vaupel**, P. (2010). Metabolic microenvironment of tumor cells: a key factor in malignant progression. *Exp. Oncol.* 32, 125–127.
- Vaupel**, P., and Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 225–239.
- Venneri**, M.A., De Palma, M., Ponzoni, M., Pucci, F., Scielzo, C., Zonari, E., Mazzieri, R., Doglioni, C., and Naldini, L. (2007). Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 109, 5276–5285.
- Verhaak**, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell* 17, 98.
- Vetter**, M., Hofer, M.J., Roth, E., Pircher, H.-P., and Pagenstecher, A. (2009). Intracerebral Interleukin 12 Induces Glioma Rejection in the Brain Predominantly by CD8+ T Cells and Independently of Interferon- γ . *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 525–534.
- Vicente**, R., Mausset-Bonnefont, A.-L., Jorgensen, C., Louis-Plence, P., and Brondello, J.-M. (2016). Cellular senescence impact on immune cell fate and function. *Aging Cell* 15, 400–406.
- Vidyarathi**, A., Agnihotri, T., Khan, N., Singh, S., Tewari, M.K., Radotra, B.D., Chatterjee, D., and Agrewala, J.N. (2019). Predominance of M2 macrophages in gliomas leads to the suppression of local and systemic immunity. *Cancer Immunol. Immunother.* 68, 1995–2004.
- Villeneuve**, J., Galarneau, H., Beaudet, M.-J., Tremblay, P., Chernomoretz, A., and Vallières, L. (2008). Reduced Glioma Growth Following Dexamethasone or Anti-Angiopoietin 2 Treatment. *Brain Pathol.* 18, 401–414.
- Virrey**, J.J., Golden, E.B., Sivakumar, W., Wang, W., Pen, L., Schönthal, A.H., Hofman, F.M., and Chen, T.C. (2009). Glioma-associated endothelial cells are chemoresistant to temozolomide. *J. Neurooncol.* 95, 13–22.
- Vogel**, C., Hager, C., and Bastians, H. (2007). Mechanisms of mitotic cell death induced by chemotherapy-mediated G2 checkpoint abrogation. *Cancer Res.* 67, 339–345.
- Vredenburgh**, J.J., Desjardins, A., Herndon, J.E., Marcello, J., Reardon, D.A., Quinn, J.A., Rich, J.N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Sampson, J., et al. (2007). Bevacizumab Plus Irinotecan in Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J. Clin. Oncol.* 25, 4722–4729.
- Vrij**, J. de, Maas, S.L.N., Kwappenberg, K.M.C., Schnoor, R., Kleijn, A., Dekker, L., Luiders, T.M., Witte, L.D. de, Litjens, M., Strien, M.E. van, et al. (2015). Glioblastoma-derived extracellular vesicles modify the phenotype of monocytic cells. *Int. J. Cancer* 137, 1630–1642.

- Wachsberger, P.R.,** Burd, R., Cardi, C., Thakur, M., Daskalakis, C., Holash, J., Yancopoulos, G.D., and Dicker, A.P. (2007). VEGF Trap in Combination With Radiotherapy Improves Tumor Control in U87 Glioblastoma. *Int. J. Radiat. Oncol.* 67, 1526–1537.
- Wang, H.U.,** Chen, Z.F., and Anderson, D.J. (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93, 741–753.
- Wang, J.,** Wang, H., Li, Z., Wu, Q., Lathia, J.D., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., and Rich, J.N. (2008). c-Myc Is Required for Maintenance of Glioma Cancer Stem Cells. *PLoS ONE* 3.
- Wang, J.-B.,** Dong, D.-F., Wang, M.-D., and Gao, K. (2014). IDH1 overexpression induced chemotherapy resistance and IDH1 mutation enhanced chemotherapy sensitivity in Glioma cells in vitro and in vivo. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 15, 427–432.
- Wang, Q.,** He, Z., Huang, M., Liu, T., Wang, Y., Xu, H., Duan, H., Ma, P., Zhang, L., Zamvil, S.S., et al. (2018). Vascular niche IL-6 induces alternative macrophage activation in glioblastoma through HIF-2 α . *Nat. Commun.* 9.
- Wang, S.-C.,** Hong, J.-H., Hsueh, C., and Chiang, C.-S. (2012). Tumor-secreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model. *Lab. Invest.* 92, 151–162.
- Warrington, J.P.,** Csiszar, A., Johnson, D.A., Herman, T.S., Ahmad, S., Lee, Y.W., and Sonntag, W.E. (2011). Cerebral microvascular rarefaction induced by whole brain radiation is reversible by systemic hypoxia in mice. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 300, H736–H744.
- Watanabe, T.,** Dohgu, S., Takata, F., Nishioku, T., Nakashima, A., Futagami, K., Yamauchi, A., and Kataoka, Y. (2013). Paracellular Barrier and Tight Junction Protein Expression in the Immortalized Brain Endothelial Cell Lines bEND.3, bEND.5 and Mouse Brain Endothelial Cell 4. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 492–495.
- Weller, M.,** Felsberg, J., Hartmann, C., Berger, H., Steinbach, J.P., Schramm, J., Westphal, M., Schackert, G., Simon, M., Tonn, J.C., et al. (2009). Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 5743–5750.
- Weller, M.,** Roth, P., Preusser, M., Wick, W., Reardon, D.A., Platten, M., and Sampson, J.H. (2017). Vaccine-based immunotherapeutic approaches to gliomas and beyond. *Nat. Rev. Neurol.* 13, 363–374.
- Welti, J.,** Loges, S., Dimmeler, S., and Carmeliet, P. (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J. Clin. Invest.* 123, 3190–3200.
- Wen, P.Y.,** Weller, M., Lee, E.Q., Alexander, B.A., Barnholtz-Sloan, J.S., Barthel, F.P., Batchelor, T.T., Bindra, R.S., Chang, S.M., Chiocca, E.A., et al. (2020). Glioblastoma in Adults: A Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) Consensus Review on Current Management and Future Directions. *Neuro-Oncol.*
- Weninger, W.,** Biro, M., and Jain, R. (2014). Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 232–246.

- Wheeler, K.C., Jena, M.K., Pradhan, B.S., Nayak, N., Das, S., Hsu, C.-D., Wheeler, D.S., Chen, K., and Nayak, N.R. (2018).** VEGF may contribute to macrophage recruitment and M2 polarization in the decidua. *PLoS ONE* 13.
- Wick, W., Gorlia, T., Bendszus, M., Taphoorn, M., Sahm, F., Harting, I., Brandes, A.A., Taal, W., Domont, J., Idbaih, A., et al. (2017).** Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 377, 1954–1963.
- Wijaya, J., Fukuda, Y., and Schuetz, J.D. (2017).** Obstacles to Brain Tumor Therapy: Key ABC Transporters. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Willam, K.P., Jürgensen J.S, Gräfe M, Wagner K.D, Bachmann S, Frei U, and Eckardt K.U (2000).** Tie2 Receptor Expression Is Stimulated by Hypoxia and Proinflammatory Cytokines in Human Endothelial Cells. *Circ. Res.* 87, 370–377.
- Winkler, F., Kozin, S.V., Tong, R.T., Chae, S.-S., Booth, M.F., Garkavtsev, I., Xu, L., Hicklin, D.J., Fukumura, D., di Tomaso, E., et al. (2004).** Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: Role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* 6, 553–563.
- Winkler, F., Kienast, Y., Fuhrmann, M., Baumgarten, L.V., Burgold, S., Mitteregger, G., Kretschmar, H., and Herms, J. (2009).** Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. *Glia* 57, 1306–1315.
- Winning, S., Splettstoesser, F., Fandrey, J., and Frede, S. (2010).** Acute Hypoxia Induces HIF-Independent Monocyte Adhesion to Endothelial Cells through Increased Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression: The Role of Hypoxic Inhibition of Prolyl Hydroxylase Activity for the Induction of NF- κ B. *J. Immunol.* 185, 1786–1793.
- Wiranowska, M., and Vrionis, F.D. (2013).** Gliomas: Symptoms, Diagnosis and Treatment Options. Nova Science Publishers, Inc.
- Wu, A., Wei, J., Kong, L.-Y., Wang, Y., Priebe, W., Qiao, W., Sawaya, R., and Heimberger, A.B. (2010).** Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro-Oncol.* 12, 1113–1125.
- Wu, C.-J., Tsai, Y.-T., Lee, I.-J., Wu, P.-Y., Lu, L.-S., Tsao, W.-S., Huang, Y.-J., Chang, C.-C., Ka, S.-M., and Tao, M.-H. (2018).** Combination of radiation and interleukin 12 eradicates large orthotopic hepatocellular carcinoma through immunomodulation of tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 7.
- Wu, X., Giobbie-Hurder, A., Liao, X., Connelly, C., Connolly, E.M., Li, J., Manos, M.P., Lawrence, D., McDermott, D., Severgnini, M., et al. (2017).** Angiopoietin-2 as a biomarker and target for immune checkpoint therapy. *Cancer Immunol. Res.* 5, 17–28.
- Xiao, L., McCann, J.V., and Dudley, A.C. (2015).** Isolation and Culture Expansion of Tumor-specific Endothelial Cells. *J. Vis. Exp. JoVE.*
- Xu, Y., and Yu, Q. (2001).** Angiopoietin-1, unlike angiopoietin-2, is incorporated into the extracellular matrix via its linker peptide region. *J. Biol. Chem.* 276, 34990–34998.

- Xu, S., Wang, J., Ding, N., Hu, W., Zhang, X., Wang, B., Hua, J., Wei, W., and Zhu, Q. (2015).** Exosome-mediated microRNA transfer plays a role in radiation-induced bystander effect. *RNA Biol.* *12*, 1355–1363.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007).** Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* *445*, 656–660.
- Yan, D., Wang, X., Li, D., Qu, Z., and Ruan, Q. (2011).** Macrophages overexpressing VEGF, transdifferentiate into endothelial-like cells in vitro and in vivo. *Biotechnol. Lett.* *33*, 1751–1758.
- Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., et al. (2009).** IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N. Engl. J. Med.* *360*, 765–773.
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., and Holash, J. (2000).** Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* *407*, 242–248.
- Yang, J., Yan, J., and Liu, B. (2018).** Targeting VEGF/VEGFR to Modulate Antitumor Immunity. *Front. Immunol.* *9*.
- Yao, Y., Kubota, T., Sato, K., Kitai, R., Takeuchi, H., and Arishima, H. (2001).** Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors Flt-1 and Flk-1 in Astrocytic Tumours. *Acta Neurochir. (Wien)* *143*, 159–166.
- Ye, C., Zhang, X., Wan, J., Chang, L., Hu, W., Bing, Z., Zhang, S., Li, J., He, J., Wang, J., et al. (2013).** Radiation-induced cellular senescence results from a slippage of long-term G2 arrested cells into G1 phase. *Cell Cycle* *12*, 1424–1432.
- Yeom, C.J., Goto, Y., Zhu, Y., Hiraoka, M., and Harada, H. (2012).** Microenvironments and Cellular Characteristics in the Micro Tumor Cords of Malignant Solid Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* *13*, 13949–13965.
- Yeung, Y., McDonald, K., Grewal, T., and Munoz, L. (2013).** Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy. *Br. J. Pharmacol.* *168*, 591–606.
- Yu, X., Seegar, T.C.M., Dalton, A.C., Tzvetkova-Robev, D., Goldgur, Y., Rajashankar, K.R., Nikolov, D.B., and Barton, W.A. (2013).** Structural basis for angiotensin-1-mediated signaling initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 7205–7210.
- Yuan, H.T., Khankin, E.V., Karumanchi, S.A., and Parikh, S.M. (2009).** Angiotensin 2 Is a Partial Agonist/Antagonist of Tie2 Signaling in the Endothelium. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 2011–2022.
- Zadeh, G., Qian, B., Okhowat, A., Sabha, N., Kontos, C.D., and Guha, A. (2004).** Targeting the Tie2/Tek Receptor in Astrocytomas. *Am. J. Pathol.* *164*, 467–476.
- Zagzag, D., Hooper, A., Friedlander, D.R., Chan, W., Holash, J., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G.D., and Grumet, M. (1999).** In Situ Expression of Angiopoietins in Astrocytomas Identifies Angiopoietin-2 as an Early Marker of Tumor Angiogenesis. *Exp. Neurol.* *159*, 391–400.
- Zagzag, D., Esencay, M., Mendez, O., Yee, H., Smirnova, I., Huang, Y., Chiriboga, L., Lukyanov, E., Liu, M., and Newcomb, E.W. (2008).** Hypoxia- and Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Stromal Cell-Derived Factor-1 α /CXCR4 Expression in Glioblastomas. *Am. J. Pathol.* *173*, 545–560.

Zeiner, P.S., Preusse, C., Blank, A.-E., Zachskorn, C., Baumgarten, P., Caspary, L., Braczynski, A.K., Weissenberger, J., Bratzke, H., Reiß, S., et al. (2015). MIF Receptor CD74 is Restricted to Microglia/Macrophages, Associated with a M1-Polarized Immune Milieu and Prolonged Patient Survival in Gliomas. *Brain Pathol.* 25, 491–504.

Zenkoh, J., Gerelchuluun, A., Wang, Y., Miwa, Y., Ohno, T., and Tsuboi, K. (2017). The abscopal effect induced by in situ -irradiated peripheral tumor cells in a murine GL261 brain tumor model. *Transl. Cancer Res.* 6, 136-148–148.

Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B.M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., and Herold-Mende, C.C. (2008). Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 123–129.

Zhou, B.-B.S., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439.

Zhu, C., Kros, J.M., Cheng, C., and Mustafa, D. (2017). The contribution of tumor-associated macrophages in glioma neo-angiogenesis and implications for anti-angiogenic strategies. *Neuro-Oncol.* 19, 1435–1446.

Zong, J., Keskinov, A.A., Shurin, G.V., and Shurin, M.R. (2016). Tumor-derived factors modulating dendritic cell function. *Cancer Immunol. Immunother.* 65, 821–833.

Zouaoui, S., Rigau, V., Mathieu-Daudé, H., Darlix, A., Bessaoud, F., Fabbro-Peray, P., Bauchet, F., Kerr, C., Fabbro, M., Figarella-Branger, D., et al. (2012). [French brain tumor database: general results on 40,000 cases, main current applications and future prospects]. *Neurochirurgie.* 58, 4–13.

Annexes

Annexe 1 : Leblond et al., 2017

M2 macrophages are more resistant than M1 macrophages following radiation therapy in context of glioblastoma

M2 macrophages are more resistant than M1 macrophages following radiation therapy in the context of glioblastoma

Marine M. Leblond¹, Elodie A. Pérès¹, Charly Helaine¹, Aurélie N. Géralt¹, Damien Moulin¹, Clément Anfray¹, Didier Divoux¹, Edwige Petit¹, Myriam Bernaudin¹ and Samuel Valable¹

¹Normandie Université, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy Group, 14000 Caen, France

Correspondence to: Samuel Valable, email: valable@cyceron.fr

Keywords: macrophages, irradiation, glioblastoma, radioresistance, phenotypic selection

Received: December 21, 2016 Accepted: July 23, 2017 Published: August 07, 2017

Copyright: Leblond et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

In some highly inflammatory tumors, such as glioblastoma (GB), macrophages (MΦ) represent the most abundant population of reactive cells. MΦ, initially denoted as M0 MΦ, can be polarized into two further phenotypes: the antitumor M1 MΦ, and the protumor M2 MΦ. The three phenotypes can reside simultaneously in the tumor mass and various external factors may influence MΦ polarization. Radiotherapy is a common modality of cancer treatment aiming to target tumor cells. However, the specific effects of X-ray radiation on the inflammatory cells are, so far, controversial and not fully understood. In the present investigation, we have first analyzed, *in vivo*, the effect of X-ray radiation on MΦ present in GB tumors. We have observed a decrease in MΦ number paralleled by an increase in the proportion of M2 MΦ. To understand this phenomenon, we then evaluated, *in vitro*, the effects of X-rays on the MΦ phenotypes and survival. We have found that X-ray radiation failed to modify the phenotype of the different MΦ. However, M1 MΦ were more sensitive to ionizing radiation than M2 MΦ, both in normoxia and in hypoxia, which could explain the *in vivo* observations. To conclude, M2 MΦ are more radioresistant than M0 and M1 MΦ and the present study allows us to propose that X-ray radiotherapy could contribute, along with other phenomena, to the increased density in the protumor M2 MΦ in GB.

INTRODUCTION

Glioblastoma (GB) are the most frequent and aggressive form of the primary malignant brain tumors in adults [1]. Conventional therapy consists of surgery associated with X-ray radiotherapy (5x2Gy per week for 6 weeks, for a total dose of 60Gy) with concomitant and adjuvant chemotherapy based on temozolomide [2]. Despite this therapeutic arsenal, recurrence inevitably occurs and the median survival of GB patients remains around 15 months [3].

GB are highly heterogeneous tumors in which various cell types coexist, such as tumor cells, endothelial cells, fibroblasts and different cell types of the immune system [4]. Of all the different cell types colonizing

GB, macrophages (MΦ) are the most abundant infiltrating immune cells and are named tumor associated macrophages (TAM) [5]. Circulating monocytes can migrate towards the tumor and once in the tissue, monocytes differentiate into MΦ, called M0 MΦ, under the influence of cytokines [6]. In GB, the myeloid population is the major player of the innate immune system and represents up to 30% of the tumor mass [7]. Interestingly, the number of MΦ retrieved in the tumor is inversely correlated to the overall survival of GB patients [8].

Once differentiated, M0 MΦ exhibit a considerable degree of plasticity and can be polarized into two well established functional phenotypes, termed M1 and M2 MΦ [9]. M1 MΦ, characterized in part by the expression

of the inducible type of nitric oxide synthase (iNOS), are classically activated M Φ implicated in an antitumor activity, exemplified by their phagocytic properties and their capacity to activate the synthesis of pro-inflammatory cytokines [10]. In contradistinction, M2 M Φ are essentially characterized by a potent arginase-1 (Arg1) activity and the CD206 marker. These activated M Φ are known to promote tumor development by tissue remodeling, cell proliferation, immunoregulation and angiogenesis [11]. As we reported recently, within the tumor mass, the three M Φ phenotypes are observed with the predominance of the M0 and M1 phenotypes in the most oxygenated area of the tumor whereas the M2 M Φ are found in the hypoxic/necrotic areas [12]. Beyond its involvement in tumor growth, the M Φ phenotype is also suspected to be associated with a poor response to GB treatments [8].

Ionizing radiations (IR), such as X- and γ -radiations, can also influence the tropism of M Φ in the tumor by an increased production of chemokines at the origin of M Φ migration. In support of the above, studies have demonstrated that irradiation promotes the recruitment of M Φ in brain tumors approximately 20 days post-radiation [13] by increasing the stromal cell derived factor-1 (SDF-1) production [13, 14].

With respect to the phenotype of M Φ following exposure to IR, an increase in M2 markers has been observed, *in vivo*, in various tumor types [13, 15, 16], including GB [17]. Others studies have reported that radiation therapy can also increase M1 markers [18] while others failed to observe any change in cytokine production [19]. X-ray exposure also induces a local reoxygenation [20] which could in turn modulate the M Φ phenotype [12].

Due to the controversial findings in the literature, it is necessary to clarify the M Φ response to irradiation. As of present, the effects of IR exposure on the three M Φ phenotypes have never been analyzed *in vitro* and require investigations not only on the polarization of M Φ but also on their fate.

A better understanding of the effects of X-rays on M Φ phenotype is essential to tailor therapeutic approaches since attention has recently been focused on the role of TAM in the mechanisms of resistance to treatment [21]. Two main hypotheses may be advanced to elucidate as to whether irradiation influences the proportion of one phenotype compared to the others: i) X-ray exposure polarizes or re-educates M Φ ; or ii) one phenotype is more sensitive to radiation-induced cell death than the others. To test these hypotheses, we have first evaluated, *in vivo*, the effect of IR on TAM present in GB. In a second stage, we have investigated, *in vitro*, whether X-ray radiation induces a change in the phenotype of M0, M1 and M2 M Φ or whether X-ray radiation is deleterious in the three different phenotypes. Cells were irradiated with either 2Gy or 8Gy of X-rays. 2Gy per day is a dose usually delivered in GB patients. However, as 2Gy produces only modest cell death, 8Gy was also delivered to amplify any

differences in the radiosensitivities of the different cell populations. Given the hypoxic nature of GB and that hypoxia represents a factor of poor prognosis and also influences inflammation [12], experiments were conducted under normoxic, moderate (1% O₂, the O₂ level commonly found in GB) [22] and severe (0.2% O₂, the O₂ level found around necrotic areas of GB) hypoxic conditions, to recapitulate the various oxygen level that are present in the tumor situation.

RESULTS

X-ray radiation induces a marked decrease in M Φ number but an increase in M2 M Φ proportion in GB

We first aimed to determine whether X-ray radiation could influence M Φ present in GB. For that, GL261 GB-bearing mice were exposed to X-rays 7 days after cells implantation. Early post-irradiation treated animals and their respective controls were euthanized 14 days after cells implantation (3 days after the last IR) and late post-irradiation animals were euthanized 27 days after cells implantation (16 days after the last IR) (Figure 1). M Φ were detected by CD68 immunostaining. CD68⁺ cells were observed in the tumor mass of both non-irradiated and irradiated mice (Figure 2A). In non-irradiated mice, the density of CD68⁺ cells present in the core of the tumor was about 29.5±6.5% of the tumor area. However, after X-ray radiation, a significant decrease in CD68⁺ cells was observed. The density of CD68⁺ cells was 7.2±3.8% and 11.4±2.4% in the tumor mass early and late after X-ray treatment, respectively. However, in the late post-irradiation tumors, we can detect the presence of CD68⁺ cells outside the tumor core (white arrows). This suggests that CD68⁺ cells start to be recruited within the tumor. We then evaluated the percentage of M2 M Φ before and after IR by CD206 immunostaining (Figure 2B). While CD206⁺ cells represented about 12.0 ± 2.4 % of the CD68⁺ cells in the non-irradiated group, it significantly increased to 50.7 ± 5.3% and 49.9 ± 6.1 % in the tumor mass early and late after radiation, respectively, without any change in the absolute number of M2 M Φ (Figure 2B).

These results indicate that X-ray radiation decreases the number of M Φ but favors an enrichment in M2 phenotype in GB. We then asked the question, using *in vitro* experiments, whether the present observations were the result of a change in the M Φ phenotype after X-ray treatment or whether the difference was the results of preferential radio-sensitivity between M Φ phenotypes.

X-ray radiation does not change the phenotype of M Φ

We then aimed to determine whether X-ray radiation could change the M Φ phenotype in normoxic or hypoxic

conditions. *In vitro*, M0, M1 and M2 MΦ were cultured in 20%, 1% or 0.2% O₂ and cells were irradiated with a dose of 2Gy. From microscopic observation, no change at the morphological level was observed in any of the MΦ phenotypes after exposure to X-ray radiation in normoxia and in hypoxia (Figure 3A). To confirm this observation, the NO production (used as a marker of M1 MΦ) and the Arg1 activity (used as a marker of M2 MΦ) were analyzed 24h and 72h post-radiation, as we previously provided evidence that these markers are robust markers to assess the phenotype of bone marrow derived MΦ [12]. As we published [12], NO was difficult to detect in M0 and M2 MΦ both in normoxia and hypoxia. In contrast, NO was easily detectable in M1 MΦ and the production decreased in hypoxia (Figure 3B). For all three phenotypes, X-ray radiation did not change NO production (Figure 3B). In parallel, Arg1 activity was weak in M0 and M1 MΦ in normoxia but was increased in both phenotypes when cultured under hypoxic conditions. There was a marked production of Arg1 in M2 MΦ in normoxia and, as expected, its activity was reinforced in hypoxia (Figure 3C) [12]. However, for the three phenotypes, X-ray radiation did not change the level of Arg1 activity either in normoxia or in hypoxia (Figure 3C). These results indicate that, in these experimental conditions, IR does not provoke direct changes in MΦ phenotypes under both normoxic and hypoxic conditions. Similar results were obtained with a high dose irradiation (8Gy) (data not shown).

M0 and M1 MΦ are more sensitive to X-ray radiation than M2 MΦ

The radiosensitivity of MΦ to X-rays was then evaluated by quantifying the cell number at different times post-radiation (2h, 24h and 72h) in 20%, 1% or 0.2% O₂ (Figure 4A). In the 20% O₂ condition (Figure 4Aa), the kinetic curves of M0 and M1 MΦ were significantly different from their respective control; an effect which

was not observed for the M2 MΦ. The difference between kinetic curves of M0 and M1 MΦ numbers was not significant while both curves were significantly different from the M2 MΦ population decrease. At 72h post-radiation, only 35.6±5.8% of M0 MΦ and 57.3±9.1% of M1 MΦ were viable while about 81.9±4.4% of M2 MΦ were still detected ($p < 0.001$ vs M0 and M1 MΦ). The changes in M0 and M1 MΦ survival, compared to M2 MΦ, were not due to a greater M2 MΦ proliferation (Supplementary Figure 1) but rather to a preferential cell death of M0 and M1 MΦ. Similar results were observed when the three phenotypes were irradiated with a dose of 8Gy (Supplementary Figure 2A). Furthermore, the decrease in M1 number following radiation was not influenced by hypoxia (1% and 0.2% O₂) (Figure 4Ab and 4Ac). Indeed, the number of irradiated M1 MΦ were significantly reduced in all conditions, whatever the level of oxygenation, compared to non-irradiated M1 MΦ (at 72h post-radiation, only 50.3±6.1% and 47.3±6.5% of M1 MΦ were still viable in 1% and 0.2% O₂, respectively). For M2 MΦ, all hypoxic conditions remained non-significant relative to non-irradiated conditions (85.4±11.7% and 92.9±6.5% of M2 MΦ were viable in 1% and 0.2% O₂, respectively, 72h post-irradiation) (Figure 4Ab and 4Ac). However, M0 MΦ appeared less sensitive to IR when they were cultured in severe hypoxia (0.2% O₂) since non-significant changes in cell survival were observed relative to M0 non-irradiated (at 72h post-irradiation, 88.5±15.2% of M0 MΦ were viable in 0.2% O₂ compared to 67.6±7.6% in 1% O₂) (Figure 4Ac). Hence, a hypoxia-dependent radioresistance was only highlighted for M0 MΦ while M2 MΦ remained resistant whatever oxygen concentration.

Cell death in normoxia in M0 and M1 MΦ was then confirmed by cell cycle studies performed by flow cytometry (Figure 4B). Only about 10% of non-irradiated M0 and M1 MΦ were found in the sub-G1 phase of the cell cycle, the cycle phase corresponding to cells with a

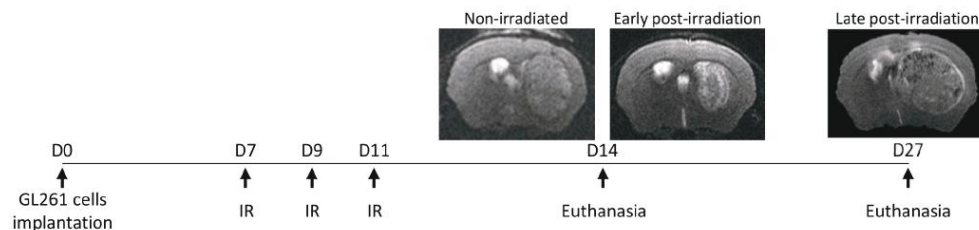


Figure 1: Experimental protocol of the GL261 glioma model with the representative MRI of the non-irradiated, early post-irradiation and late post-irradiation animals. Non-irradiated and early post-irradiation tumors were both arrested 14 days after the GL261 cells implantation (non-irradiated tumor volume≈40mm³; early post-irradiation tumor volume≈10mm³) to match in time and just before the complete regression of the irradiated tumors. Late post-irradiation tumors, corresponding to recurrence, were arrested when the tumor reached 50 mm³. This time point does not have non-irradiated tumors because the control tumors developed too rapidly without any treatments.

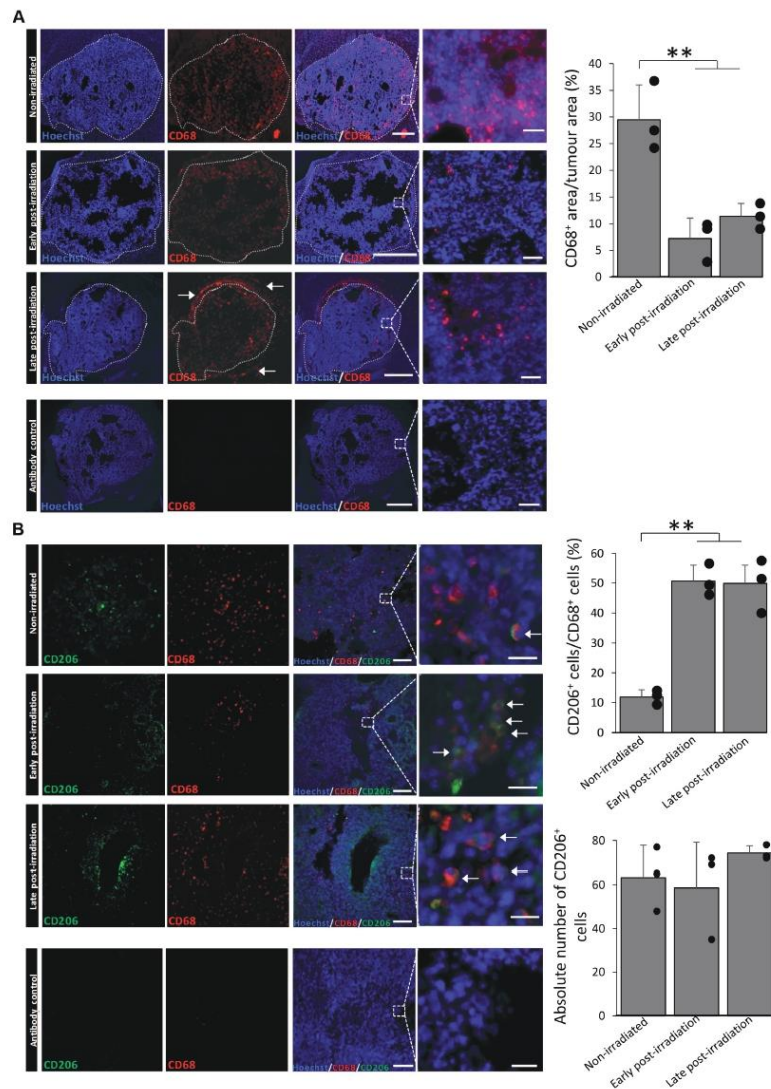


Figure 2: X-ray radiation increases the proportion of M2 M Φ in the GL261 GB model. (A) Representative CD68 (red) and Hoechst 33342 (blue) immunofluorescent images of the GL261 orthotopic tumor model and the quantification of the percentage of CD68⁺ pixels compared to the tumor area before and early (3 days) or late (16 days) after X-Ray treatment. Scale bars=1000 μ m or 50 μ m for low or high magnification, respectively. Dotted lines delimit the tumor areas from the brain tissue and they correspond to the areas of quantification. Black areas correspond to necrotic tissues and they are excluded from the quantification. White arrows indicate the CD68⁺ cells outside the tumor and which were not quantified. Antibody control images were used to confirm the specificity of the CD68 signal. **(B)** Representative CD206 (green), CD68 (red) and Hoechst 33342 (blue) immunofluorescent images of the GL261 orthotopic tumor and the quantification of CD206⁺ cells compared to CD68⁺ cells before and early (3 days) or late (16 days) after X-ray treatment. Scale bars=100 μ m for low magnification and scale bars=20 μ m for high magnification. Antibody control images were used to confirm the specificity of the CD206 and CD68 signals. Three sections for each animal and 3 animals per group were used (n=9 images per group, each point represent the mean of the 3 images), statistical significance was achieved when $p < 0.01$ (**).

DNA quantity inferior to 2n, which could be a reflection of cell death. However, a significant proportion of M0 (34.5±3.9%) and M1 (41.2±7.5%) MΦ was found in the sub-G1 phase of the cell cycle 72h after radiation. It could be noted that these changes in sub-G1 phase

after irradiation is to the detriment of M0 and M1 MΦ proportion in G0/G1 phase. Concerning M2 MΦ, the cytometry profile confirmed the absence of an effect of IR on the cell cycle. Similar results were obtained with a high dose irradiation (8Gy) (Supplementary Figure 2B).

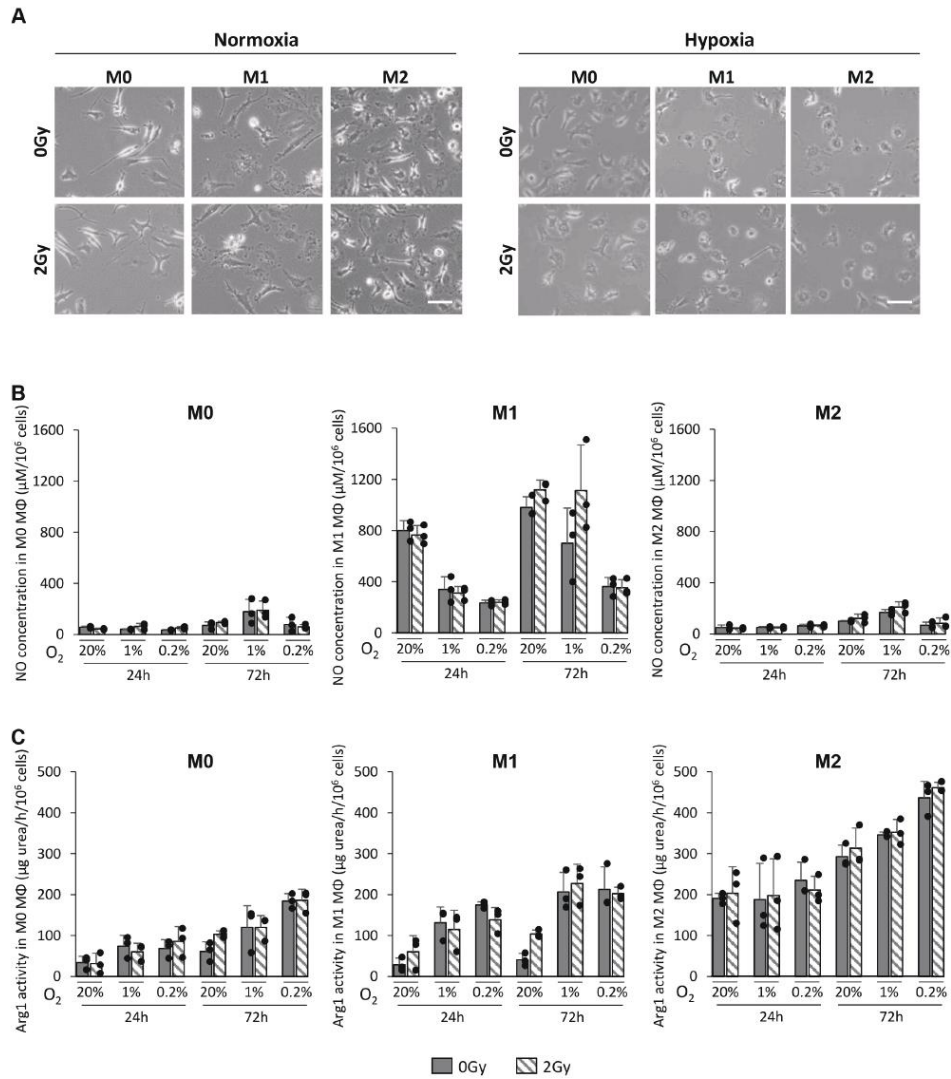


Figure 3: X-ray radiation does not change the phenotype of MΦ *in vitro*. (A) Representative phase contrast microscopy images of M0, M1 and M2 MΦ 24h after 0Gy and 2Gy radiation in 20% (normoxia) or 0.2% O₂ (hypoxia). Scale bar=20µm. (B) NO concentration (µM per 10⁶ cells) in M0, M1 and M2 MΦ 24h and 72h after 0Gy and 2Gy in 20%, 1% and 0.2% O₂. (C) Arg1 activity (µg urea/h per 10⁶ cells) in M0, M1 and M2 MΦ 24h and 72h after 0Gy and 2Gy radiation in 20%, 1% and 0.2% O₂. n=3 different experiments per condition.

M0 and M1 MΦ cell death were also confirmed by the increase in cell debris after IR (Supplementary Figure 3). These results support the hypothesis that M2 MΦ are more resistant to X-ray radiation compared to the M0 and M1 MΦ phenotypes. Given that 2Gy and 8Gy irradiations have similar effects on MΦ survival, only the results with the dose of 2Gy are presented thereafter.

X-ray radiation induces similar DNA double-strand breaks between the different MΦ phenotype

To decipher the mechanisms involved in the selective death of M0 and M1 MΦ, we analyzed the

formation of DNA double strand breaks (DSBs) after irradiation. We evaluated whether M0, M1 and M2 MΦ respond to X-ray radiation in a similar way, both in normoxia and hypoxia. To evaluate DNA DSBs in the three MΦ phenotypes, γ H2AX immunostaining was performed at different time post-radiation (2h, 24h and 72h) (Figure 5A) and the percentage of γ H2AX⁺ cells (i.e. cells with more than 10 foci) was quantified (Figure 5B). Under normoxia, for the three MΦ phenotypes, the percentage of γ H2AX⁺ cells was maximal 2h after 2Gy X-ray radiation (24.8±7.4% in M0 MΦ, 22.9±13.1% in M1 MΦ and 22.8±3.17% in M2 MΦ) and significantly different from the respective controls (0Gy, 0.6±0.5% of cells with DNA DSBs) (Figure 5Ba). While M1 MΦ

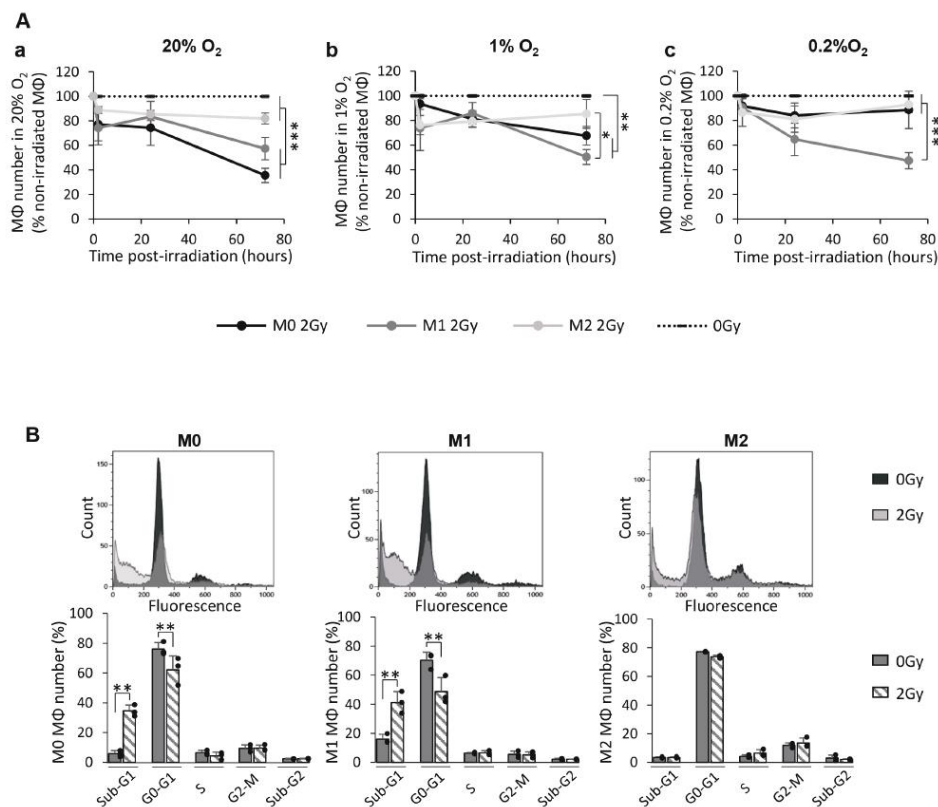


Figure 4: X-ray radiation induces cell death of M0 and M1 MΦ but not that of M2 MΦ *in vitro*. (A) Kinetics (2h, 24h and 72h post-radiation) of M0, M1 and M2 MΦ cell numbers expressed as a percentage of control (0Gy) after 2Gy in 20% (a), 1% (b) or 0.2% O₂ (c). Dotted lines correspond to non-irradiated M0, M1 and M2 MΦ. n=3 distinct experiments for each time point and each MΦ phenotype. Tukey's HSD test after significant one factor ANOVA (group) was used. Statistical significance was achieved when p<0.05(*), p<0.01(**) and p<0.001(***) (B) Cell cycle profiles and quantification of the cell distribution in different phases for M0, M1 and M2 MΦ 72h after 0Gy and 2Gy in 20% O₂. n=3 different experiments per condition. Statistical significance was p<0.01(**).

present more γ H2AX⁺ cells than M0 and M2 M Φ 24h after IR, this difference is not significant ($p=0.5717$ between M1 and M0 M Φ ; $p=0.3369$ between M1 and M2 M Φ). Moreover, for the three phenotypes, the number of γ H2AX⁺ cells decreases as a function of time to reach the level of the control cells 72h post-radiation. These results suggest that the genotoxicity induced by X-rays is similar between the three M Φ phenotypes and that they can repair DNA DSBs in normoxia.

In presence of 1% O₂ (Figure 5Bb), M0 M Φ present less γ H2AX⁺ cells ($12.9\pm 6.9\%$) than in the 20% O₂ condition but the difference is still significantly different from the control. M2 M Φ did not present significant number of γ H2AX⁺ cells ($10.5\pm 4.7\%$) compared to control.

However, the formation of DNA DSBs in M1 M Φ was not influenced by moderate hypoxia ($23.2\pm 8.2\%$ of cells) and the kinetic curve of M1 M Φ was significantly different from the ones of M0 and M2 M Φ . This phenomenon was more pronounced at 0.2% O₂ (Figure 5Bc). At 0.2% O₂, the formation of DSBs was almost absent in M0 M Φ and significantly different from the 20% O₂ condition ($p=0.0317$). These results suggest that in hypoxia, M1 M Φ are more sensitive to IR than M0 and M2 M Φ which present an important hypoxia-induced radioresistance.

To further elucidate the more pronounced radiosensitivity of M0 and M1 M Φ than M2 M Φ (Figure 4), we then focused on radio-induced cell death by studying apoptosis and mitotic catastrophe.

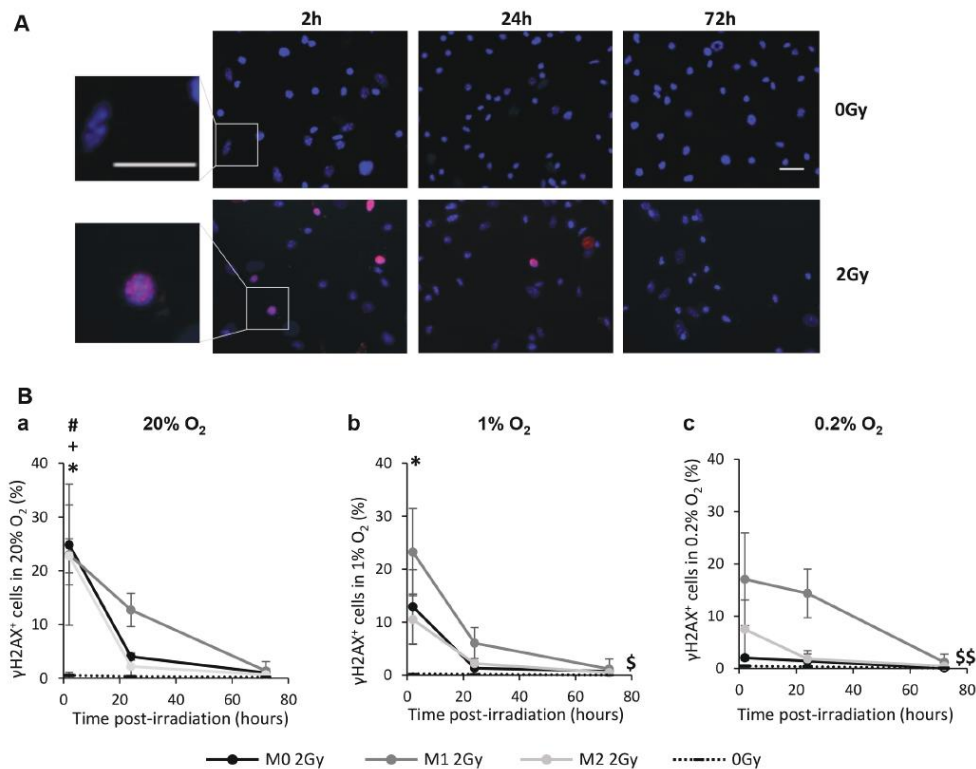


Figure 5: X-ray radiation generates DNA double strand breaks (DSBs) in the three M Φ phenotypes *in vitro*. (A) Representative γ H2AX and Hoechst 33342 immunofluorescence images of M0 M Φ 2h, 24h and 72h after 0Gy and 2Gy radiation in 20% O₂. Scale bars=20 μ m. (B) Kinetics (2h, 24h and 72h post-radiation) of DNA DSBs (γ H2AX⁺ cells) on M0, M1 and M2 M Φ after 2Gy in 20% (a), 1% (b) and 0.2% O₂ (c). Dotted lines correspond to the mean of γ H2AX⁺ cells in non-irradiated M0, M1 and M2 M Φ . n=3 experiments for each time point and each M Φ phenotype. Tukey's HSD test after significant one factor (group) or two factors ANOVA (time and group) were used. $p<0.05$ (*) M0 2Gy vs M0 0Gy, $p<0.05$ (#) M1 2Gy vs M1 0Gy and $p<0.05$ (+) M2 2Gy vs M2 0Gy only 2h post-radiation. $p<0.05$ (\$) and $p<0.01$ (\$\$) M1 kinetic curve vs M1 0Gy, M0 2Gy and M2 2Gy kinetics curves.

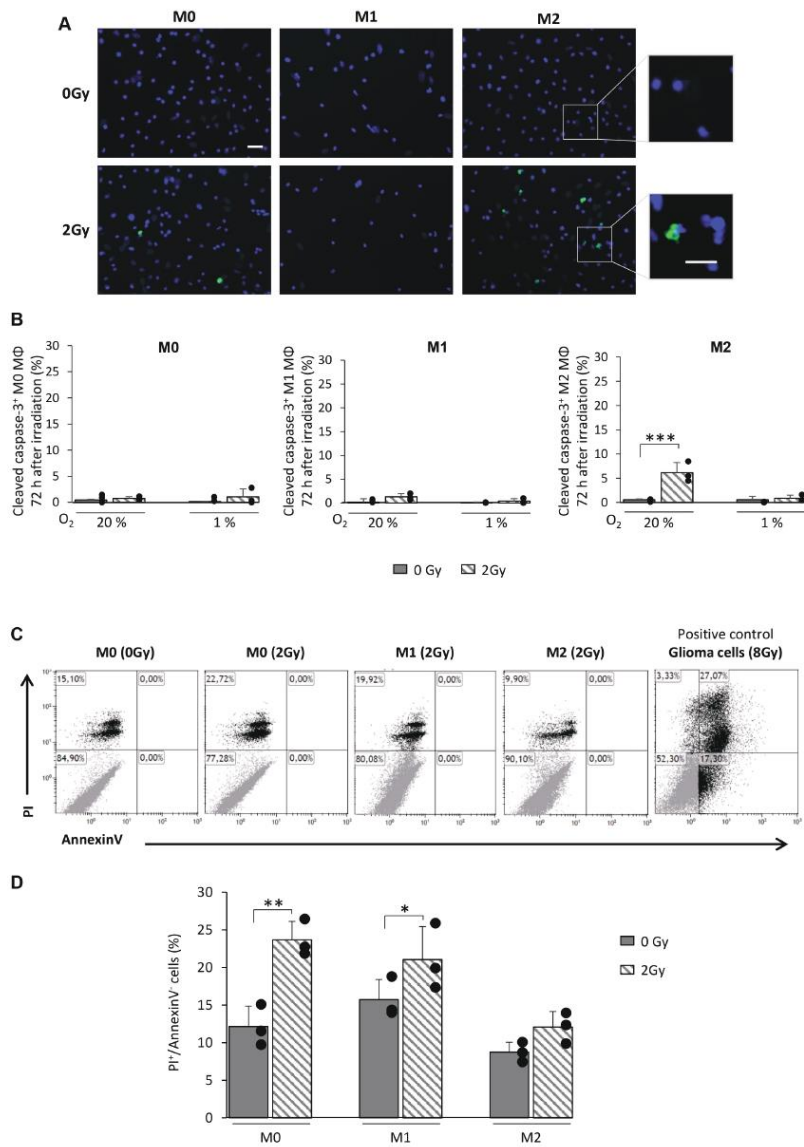


Figure 6: X-ray radiation fails to give rise to apoptosis in M0 and M1 MΦ *in vitro*. (A) Representative cleaved-caspase-3 and Hoechst 33342 immunofluorescence images of M0, M1 and M2 MΦ 72h after 0Gy and 2Gy radiation in 20% O₂. Scale bar=20μm for low magnification and scale bar=10μm for high magnification. (B) Quantification of cleaved-caspase-3 on M0, M1 and M2 MΦ 72h post-radiation (0Gy and 2Gy) in 20% and 1% O₂. n=3 experiments per condition. Statistical significance was seen with the irradiated M2 MΦ [p<0.001(***)], otherwise no significant changes were noted. (C) Representative propidium iodide (PI)/AnnexinV flow cytometry profiles of non-irradiated M0 MΦ (0Gy) and M0, M1 and M2 MΦ 72h after irradiation (2Gy). Irradiated glioma cells (8Gy) were used as positive control for AnnexinV staining. (D) Quantification of PI⁺/AnnexinV⁺ cells in M0, M1 and M2 MΦ 72h after 0Gy and 2Gy radiation. n=3 different experiments per condition. Statistical significance was achieved when p<0.05(*) and p<0.01(**).

M0 and M1 MΦ do not undergo apoptosis but manifest mitotic catastrophe after X-ray radiation

According to the cell cycle profiles of M0 and M1 MΦ after X-rays (Figure 4B), we first posed the question whether the increase in sub-G1 phase is an index of apoptosis. We analyzed the activation of the cleaved form of caspase-3 in the three MΦ phenotypes 72h post-radiation (Figure 6A). M0 and M1 MΦ failed to show a difference in the number of cleaved caspase-3⁺ cells after irradiation compared to control cells. However, a small population of M2 MΦ ($7.2 \pm 2.3\%$) showed a cleaved caspase-3⁺ after radiation but only when the cells were cultured in 20% O₂ (Figure 6B). To further reinforce this result, Propidium Iodide (PI)/AnnexinV flow cytometry

was performed on the three MΦ phenotypes (Figure 6C). No AnnexinV⁺ cells were detected following irradiation whatever the phenotype studied, supporting the absence of apoptotic death after IR. Increased PI staining in M0 and M1 MΦ is indeed in favor of a radio-induced mitotic catastrophe (Figure 6C and 6D).

To confirm the radio-induced mitotic catastrophe in M0 and M1 MΦ, we analyzed the formation of micronuclei (MN), as a reflection of aneuploidy following genomic instabilities [23] (Figure 7A). M0, M1 and M2 MΦ were irradiated in 20%, 1% and 0.2% O₂ and the MN were counted at different times post-radiation (2h, 24h and 72h) (Figure 7B). At 72h post-radiation, IR resulted in a significant increase in the percentage of MN positive cells (i.e. cells with at least one MN) for both M0 and M1 MΦ in 20% ($17.6 \pm 5.4\%$ for M0 MΦ and $8.9 \pm 0.7\%$ for M1 MΦ

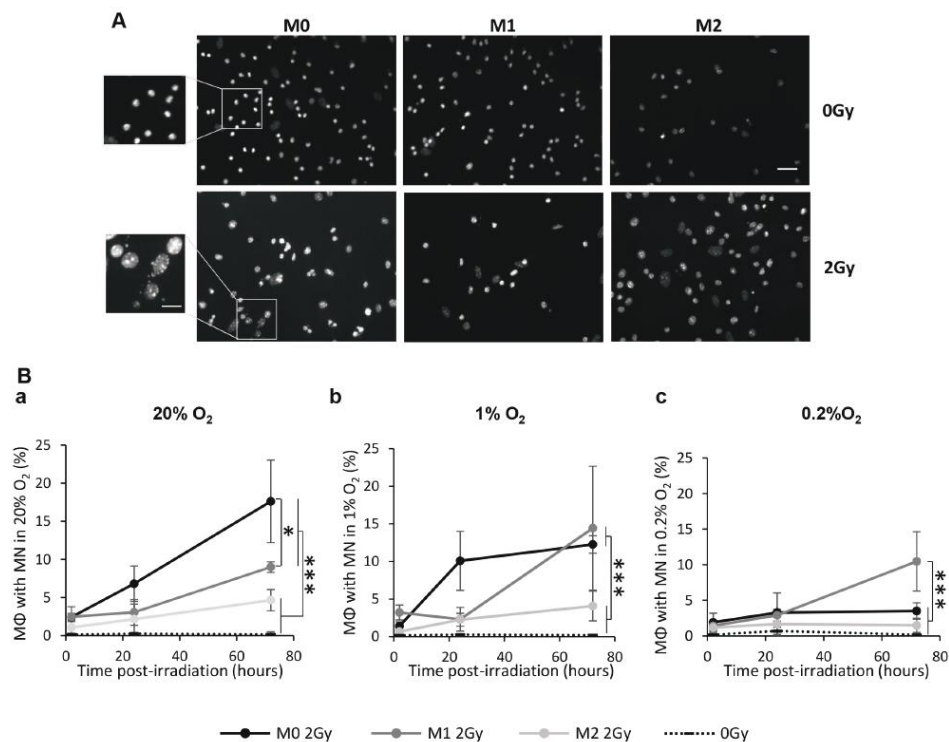


Figure 7: X-ray radiation induces the mitotic catastrophe in M0 and M1 MΦ *in vitro*. (A) Representative Hoechst 33342 immunofluorescence images of M0, M1 and M2 MΦ 72h after 0Gy and 2Gy radiation in 20% O₂. Scale bar=20μm for low magnification and scale bar=10μm for high magnification. (B) Kinetics (2h, 24h and 72h post-radiation) of percentage of M0, M1 and M2 MΦ with micronuclei (MN) after 2Gy radiation in 20% (a), 1% (b) and 0.2% O₂ (c). Dotted lines correspond to the mean of cells with MN in non-irradiated M0, M1 and M2 MΦ. n=3 experiments for each time point and each condition. Tukey's HSD test after significant one factor ANOVA (group) was used. Statistical significance were p<0.05(*) and p<0.001(***) , otherwise it was not significant.

with MN) (Figure 7Ba) and 1% O₂ (12.3±1.1% for M0 MΦ 14.4±8.2% for M1 MΦ) (Figure 7Bb) relative to non-irradiated cells. M2 MΦ presented only 4.6±1.4% of cells with MN at 20% O₂ and 4.0±1.9% at 1% O₂, differences which were not significantly different from control cells (Figure 7Ba and 7Bb). Interestingly and in line with previous results concerning the cell number, in M0 MΦ, the radiation-induced MN formation was significantly less when the cells were cultured at 0.2% O₂ compared to 20% and 1% O₂ (Figure 7Bc). However, M1 MΦ still present MN formation 72h post-irradiation at 0.2% O₂ (10.5±4.1% of cells with MN) which is significantly different to respective control, and irradiated M0 and M2 MΦ (Figure 7Bc).

Altogether, these results indicate that M0 and M1 MΦ do not undergo apoptosis following IR but rather radio-induced mitotic catastrophe. Moreover, it seems that M1 MΦ is the most radiosensitive phenotype since these cells react similarly in both normoxia and in hypoxia.

DISCUSSION

MΦ, the most abundant inflammatory cells found in GB [5], promote tumor development and represent a negative prognostic factor [24] notably because of the presence of the M2 phenotype [8]. However, the impact of conventional therapies, and particularly radiotherapy, on these cells is still not well understood. We have shown, *in vivo*, that radiotherapy with X-ray exposure induces a loss of MΦ present in GB. Interestingly, we have demonstrated that the proportion of M2 MΦ (CD206⁺ cells) relative to total MΦ (CD68⁺ cells) was increased after IR. *In vitro*, we have confirmed that these changes are not due to a modification of the MΦ phenotype but rather to an increase in the M2 MΦ population by preferentially inducing cell death of M0 and M1 MΦ. In contrast to M0 and M1 MΦ, M2 MΦ are less sensitive to irradiation.

We describe a decrease in MΦ number occurring early after IR as already mentioned in prostate cancer [17]. In the late time, the presence of CD68⁺ cells outside the tumor core was also observed suggesting that CD68⁺ cells start to be recruited within the GB tumor in good agreement with the literature in GB [13, 27] and other tumors [16].

Concerning the MΦ phenotype, several controversial investigations have analyzed the impact of IR on MΦ phenotype *in vivo*. For instance, an increase in M1 MΦ markers was noted after radiation therapy [25–27] while others have reported an increase in M2 MΦ markers [15, 28, 29]. Moreover, a lack of effect of radiation on cytokine production was observed *in vitro* [19, 30]. In contradistinction, we have shown that MΦ in GB change their morphology and an increase in M2 marker is observed after IR, as previously described [17]. However, in this study, we have found that X-ray treatment increased the M2 MΦ proportion in a GB model of recurrence. Two

main hypotheses have been proposed to elucidate how IR influences MΦ: i) X-ray exposure alters the phenotype of MΦ; or ii) one phenotype is more resistant to radio-induced cell death than the others.

Within the context of these two hypotheses, we have demonstrated *in vitro* that the phenotype of MΦ remained unchanged with X-ray radiation. NO and Arg1 were used as we previously provided evidence that these markers are sensitive markers of bone marrow derived MΦ [12]. These results led us to postulate that the sensitivity to X-ray radiation could be different depending on the MΦ phenotype.

Controversial and contradictory studies related to the impact of radiation therapy on MΦ fate have been published. While numerous studies have described MΦ as a radioresistant cell type [19, 30], other studies have found either an increase in MΦ in the tumor following X-ray or a decrease [15, 18]. However, no single investigation has differentiated the response of the three distinct phenotypes to direct radiation. In the present study, we have found that M0 and M1 MΦ were more sensitive to radiation than M2 MΦ.

An important decrease in the number of M0 and M1 MΦ was observed *in vitro* in 20% O₂, as these phenotypes are usually found in oxygenated areas of GB [12], following radiation. This observation was also noticed when the cells were cultured under moderate hypoxic condition (1% O₂). Although we have shown that M0 and M1 MΦ are able to repair DNA DSBs, their number also decreased post-radiation. This profile might suggest that M0 and M1 MΦ misrepair DNA DSBs leading to certain genomic instabilities. Both nuclear fragmentation (sub-G1 phase) and MN formation along with the absence of cleaved-caspase 3⁺ cells and AnnexinV⁺ cells favor to conclude for the presence of radio-induced mitotic catastrophe in these two phenotypes after IR. However, in severe hypoxia (0.2% O₂), M0 MΦ number remained stable after IR while M1 MΦ were still decreased. One possible explanation at the decrease in DNA DSBs for M0 MΦ at 0.2% O₂ could be that at these low O₂ pressure, M0 MΦ are already engaged toward an M2 phenotype, as already described [12]. For M1 MΦ, the DNA DSBs and the MN profiles confirm that these cells responded to IR in severe hypoxia. Considering the effect of X-rays on M0 MΦ 2h after treatment and the fact that irradiation is affected by hypoxia, these results would suggest a role of reactive oxygen species (ROS) in the process of radio-induced M0 MΦ death. Indeed, it was described that IR induced an important production of ROS, almost instantly after treatment, which could contribute to genomic instability [31]. Moreover, hypoxia is known to reduce ROS accumulation [32] which correlates with the decrease in M0 MΦ death in oxygen-deprived environment. However, this last phenomenon was not observed in M1 MΦ, suggesting another mechanism involved and more particularly the NO, as M1 MΦ are

known to produce large amount of NO [33]. Indeed, NO can induce radiosensitization of cells under hypoxic conditions [34–36], including GB cells [37, 38] by enhancing DNA DSBs [38], limiting DNA repair [39] and inducing mitotic catastrophe [37]. This could explain the mechanism involved in M1 radio-induced cell death as we have shown that M1 MΦ produced important quantity of NO which decreased in hypoxia, as already published [12], but still superior to the amount observed in M0 and M2 MΦ. This effect could correlate with the important M1 MΦ death observed in normoxia, which was reduced in hypoxia but still present.

Concerning M2 MΦ, their number was not impacted by radiation and MN formation was not found 72h post-radiation. While M2 MΦ exhibited DNA DSBs, these data allow us to suggest that M2 MΦ are able to faithfully repair DNA DSBs and are more radioresistant to X-rays. The proportion of apoptotic cells in the M2 phenotype was low (7%) and no AnnexinV⁺ cells were observed. All together, these results suggest that M2 MΦ are radioresistant. Interestingly, cell death failed to occur on M2 MΦ in hypoxic conditions, a situation in which M2 MΦ are formed to the detriment of M0 and M1 MΦ [12]. To understand why M2 MΦ are more radioresistant, we performed western blot analyses on P-Erk/pan-Erk and P-Akt/pan-Akt known to be two major players in radioresistance and observed increased expression of P-Erk and P-Akt only in M2 relative to M0 and M1 macrophages (not shown). However, at the present time, we cannot rule out that many other intracellular players could explain this resistance.

Altogether, our *in vitro* study supports the hypothesis that radiation therapy could increase the proportion of M2 MΦ in the tumor. These data concur with the observation of Chiang and colleagues who reported, on animals bearing brain tumors, an increased proportion of the M2 phenotype [17]. Based on our observations, we have made the hypothesis that such a selection may also occur due to the M0 and M1 MΦ death, in parallel to a synthesis of polarizing cytokines.

Despite various and vigorous treatments, recurrence always occurs in GB [40]. The presence of glioblastoma stem cells (GSC) has been proposed as a potential explanation for this recurrence [41]. Following our observations, one might propose that the enrichment of the M2 phenotype after radiotherapy could also promote GB recurrence. In accordance with this hypothesis, M2 MΦ are known to associate themselves with GSC in hypoxic areas [42, 43] to promote tumor development [44]. Moreover, it has been described that the recruitment of myeloid cells following radiation is also responsible for recurrence in different tumors [45, 46]. In the immediate phase after IR, the number of MΦ decreased before the recruitment, approximately 20 days post-radiation [13]. This MΦ repopulation has been, in part, explained by the fact that IR can induce endothelial cell death [47, 48]

which leads to the development of hypoxia [13, 49] and subsequently an increase in chemokines, such as SDF-1 [13, 14, 50]. The difference between our study and that of Chiang and collaborators [17] and Kioi and collaborators [13] is that they observed an increase in MΦ migration in parallel to an increase in M2 MΦ number after X-rays because their observations were made about 22 days after treatment, when MΦ are recruited in GB [13]. In our study, we observed an increase in the proportion of M2 MΦ (the phenotype relatively resistant to IR) after X-ray treatment just before MΦ recruitment.

The limits of this study are the lack of sensitive markers to differentiate M0, M1 and M2 MΦ on mouse brain slides but also the impossibility to perform clonogenic assays (standard colony formation or soft-agar colony formation assays). Another limitation of this study is the use of a single tumor model developed in the mice. It is however important to mention that this is a syngeneic immunodeficient model that also recapitulates various features of the human situation (hypoxia, invasion) [51–53]. Despite these caveats, the strength of this study relies on the first demonstration that the three MΦ phenotypes respond differentially to IR. This has led us to argue that the increase in M2 MΦ proportion in GB after X-ray treatment is not due to a switch in MΦ phenotypes but rather to the selective death of M0 and M1 MΦ. This pathophysiological process is important to take into account because M2 MΦ are known to promote tumor development and most recently, studies from the literature indicate that the different MΦ phenotypes can induce differential responses of tumor cells to various treatment options and, especially, different chemotherapies [21].

As a conclusion to our study, we have made the assumption that IR could differentially influence the three phenotype of MΦ found in tumors. We have demonstrated that the three phenotypes respond to radiation in a phenotype-specific manner. M0 and M1 MΦ phenotypes undergo a mitotic death following radiation thereby decreasing cell numbers while M2 MΦ were radioresistant especially in situations with low O₂, areas in which they are mainly enriched [12, 54]. X-ray radiotherapy can contribute, along with other phenomena, to the increased density of M2 MΦ in GB.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures

The murine GB cell line, GL261[NCI-DCTD (Division of Cancer Treatment and Diagnosis) Repository], was cultured in Roswell Park Memorial Institute media (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal calf serum (Eurobio), 1μg/ml penicillin/streptomycin (P/S, Sigma-Aldrich) and 2mM of glutamine (Gln, Sigma-Aldrich) at 37°C in a humidified atmosphere and in mycoplasma free conditions.

Bone marrow-derived MΦ were obtained from mice [20-22g, CURB, Univ. Caen, France] and were isolated from femora and tibiae by flushing the bones with 1ml of Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM, Sigma-Aldrich) containing 60% Fetal Clone II (FCII, Thermo Scientific) and 1μg/ml P/S. The marrow was passed through a 70μm strainer and MΦ (M0) were selected and cultured in IMDM enriched with 15% FCII, 1μg/ml P/S, 10 ng/ml recombinant mouse macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, Miltenyi Biotec) and 10 ng/ml recombinant mouse Fms-related tyrosine kinase 3-ligand (Flt3-ligand, Miltenyi Biotec) at 37°C in a humid atmosphere. M1 MΦ were obtained by culturing cells in 1g/l glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplied with 15% FCII, 1μg/ml P/S, 2mM Gln (Sigma-Aldrich), 100 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich) and 10U/ml recombinant mouse interferon-gamma (IFN-γ, eBioscience). M2 MΦ were obtained by culturing cells with 1g/l glucose DMEM supplemented with 15% FCII, 1% P/S, 2mM Gln (Sigma-Aldrich) and 50 ng/ml recombinant mouse interleukine 4 (IL4, Miltenyi Biotec).

GB preclinical model

Tumor models consist of an orthotopic injection of GL261 cells in C57/Bl6 mice (20-22g, Janvier laboratories). The animal investigations were performed under the current European directive (2010/63/EU). The license to investigate was given to SV (14-55) in authorized housing and laboratories (B14118001) and with the permission of the regional committee on animal ethics (N/04-01-13/04/01-16). Mice were operated under anaesthesia (induction in 5% and maintenance in 2% of isoflurane in 70% NO₂/30% O₂) and GL261 cells were injected [1.10⁵ cells in 3μl in 2mM Gln/phosphate buffer saline (PBS)] in the right caudate-putamen.

Hypoxic cell treatment

Normoxia (20% O₂) cells were cultured in a humidified 5% CO₂/air atmosphere. Moderate (1% O₂, the O₂ level commonly found in GB) [22] and severe (0.2% O₂, the O₂ level found around necrotic areas of GB) hypoxic cells were cultured in a humidified 5% CO₂/balance N₂ gas mixture in a hypoxic chamber (Invivo2 500, Ruskinn, Awel) at 37°C. For radiation treatment, M0 MΦ were cultured either in normoxia or in hypoxia 6h before radiation. M1 and M2 MΦ were activated for 24h and then cultured in normoxia or hypoxia 6h before radiation with their respective conditioning media. The hypoxic culture medium was equilibrated for 30 min with the gas mixture contained in the hypoxia chamber before add it to cell cultures.

Radiation treatments

All radiation experiments were performed on the XRad225Cx (PXi, CYCERON platform).

For *in vivo* experiments, the radiation of ipsilateral hemisphere was realized seven days after the implantation of GB cells (tumor volume around 10mm³). Mice were anaesthetized as described above and irradiated thrice with 4Gy dose every two days at a dose rate of 3.3Gy/min. The animals were sacrificed 15 days after implantation of tumor cells for the non-irradiated animals and 7 days and 20 days after the first irradiation for the irradiated animals (Figure 1). The tumor volume was evaluated by a T2w MRI scan (7T MRI, Bruker, CYCERON Imaging platform).

For *in vitro* experiments, cells were exposed at room temperature to X-ray to a unique dose of 2Gy (or 8Gy) at a dose rate of 2Gy/min. After radiation, cells were maintained under normoxic or hypoxic conditions until the end of the experiment.

Immunohistochemistry

At the end of the protocol, mice were deeply anaesthetized and were transcardially perfused with a 0.2M phosphate buffer (PB)/4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich). Brains were removed and placed in 30% sucrose for 48h and 30μm thick freezing microtome sections were realized. Slices were blocked with PBS, 0.5% Triton, 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) for 2h and then incubated overnight with anti-CD68 (1/800, Abcam, ab53444) and anti-CD206 (1/1000, Abcam, ab64693) antibodies in PBS, 0.5% Triton, 1% BSA at 4°C. Sections were then incubated with an Alexa-555-conjugated anti-rat (1/200, Invitrogen, A18744) or an Alexa-488-conjugated anti-rabbit (1/200, Invitrogen, 10424752) as secondary antibodies in PBS, 0.5% Triton, 1% BSA containing Hoechst 33342 (10μg/ml, Sigma-Aldrich).

Immunocytochemistry

MΦ were fixed with a 0.2M PB/4% PFA solution. Cells were blocked with PBS, 0.1% Tween, 3% BSA for 30min and the cells were firstly incubated overnight at 4°C with the primary antibody in PBS 0.1% Tween, 1% BSA at 4°C. The following primary antibodies were used: phosphorylated histone H2AX (ser139) (γH2AX; 1/200; Cell Signalling Technology, 2577S) and cleaved-caspase-3 (1/600; Cell Signaling Technology, 9661S). γH2AX and cleaved-caspase-3 are sensitive markers of DNA double-strand breaks [55] and apoptosis, respectively. Cells then were incubated with an Alexa-555-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1/200; Invitrogen, A31572) and Hoechst 33342 (10μg/ml) in PBS 0.1% Tween, 1% BSA for 2h at room temperature.

Cytotoxic assay

The effect of radiation on cell survival was measured by manually counting the cell number 2h, 24h and 72h

after radiation. MΦ were fixed as mentioned above and cell nuclei were stained with Hoechst 33342 (10μg/ml).

Image analysis

Images were acquired thanks to the time-lapse microscope (DMi8 S imaging system, Leitz LEICA) and then analyzed by ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>). For immunohistochemistry, MΦ density was determined as the number of positive area for CD68 divided by the total tumor area using an automatic thresholding. The percentage of M2 MΦ was determined by a manual counting of the number of cells that expressed both CD206 (M2 MΦ) and CD68 (MΦ). For immunocytochemistry, the number of cells was manually counted. For γH2AX immunostaining, cells with at least 10 foci in nucleus were considered as positive. The percentage of γH2AX⁺ cells was determined by the number of γH2AX compared to the total number of cells (Hoechst 33342). The percentage of cleaved-caspase 3⁺ cells was determined by the number of cleaved-caspase 3⁺ cells compared to the total number of cells (Hoechst 33342). The presence of micronuclei (MN, indicative of genomic instability followed by mitotic catastrophe [56]) was assessed by Hoechst 33342 staining and a cell with at least one MN was considered positive.

Cell cycle analysis

The cell cycle of MΦ was studied by flow cytometry with the DNA-prep reagents kit according to manufacturer's instructions (Beckman Coulter SAS, France). Propidium iodide staining was analyzed by the Gallios™ flow cytometer (Beckman Coulter SAS, France) with 20 000 events per determination. The analysis and determination of the cell distribution in each phase of the cell cycle was achieved based on the Kaluza® Flow Analysis software (Beckman Coulter SAS, France).

Propidium iodide (PI)/AnnexinV analysis

This experiment was performed using Annexin V-FITC Kit (Beckman Coulter), following the manufacturer's protocol. Briefly, cell samples (M0, M1 and M2 macrophages irradiated or not) were washed with cold PBS and cell pellet was resuspended in 1X binding buffer and immediately kept on ice. Annexin V-FITC solution and Propidium Iodide (PI) were added and incubated for 15 minutes on ice in the dark. Subsequently, cells were analyzed by flow cytometry, using Gallios™ flow cytometer and at least 20 000 events were collected per sample. Data was analyzed using Kaluza® Flow Analysis software.

Determination of nitric oxide (NO) production

NO measurement in the supernatant of MΦ cultures was performed by the Griess reaction [57]. Each sample

was assayed in duplicate, the absorbance was measured at 540 nm and the NO concentration was determined with sodium nitrite as a standard.

Determination of Arg1 activity

Arg1 activity was determined by a standard colorimetric method in cell lysates as published [57]. Each sample was assayed in duplicate, the absorbance was measured at 540 nm and urea production was determined with urea as the standard.

Online supplementary materials

Supplementary Materials about proliferation assay and cell debris analyses are available in the online version of the paper.

Statistical analyses

Data are represented by the mean±standard deviation (SD), the circles representing results of individual experiment. Statistical analyses were performed with the JMP® program (SAS institute, USA) and, unless otherwise stated, significances were calculated by the Tukey's HSD test after significant ANOVAs.

Abbreviations

Arg1: arginase 1; DSB: double strand breaks; GB: glioblastoma; GSC: glioblastoma stem cells; iNOS: inducible nitric oxide synthase; IR: ionizing radiation; MΦ: macrophages; MN: micronuclei; NO: nitric oxide; O₂: oxygen; PI: propidium iodide; SDF-1: stromal cell derived factor 1; TAM: tumor associated macrophages.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Eric T. MacKenzie for his English expertise on this article and the SFR ICORE (*Interaction Cellules-Organismes-Environnement*) platform localized in Caen (France) for the access to the materials used to perform the flow cytometry analyses.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflicts of interest were disclosed.

FINANCIAL SUPPORT

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université de Caen-Normandie (UNICAEN), the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), the Conseil Régional de Basse-Normandie (CRBN), the Advanced Resource Center for Hadrontherapy in Europe (Archade), the Fédération

pour la Recherche sur le Cerveau par l'opération Rotary "Espoir en tête" (FRC) and the French National Agency for Research called "Investissements d'Avenir" ANR-11-LABEX-0018-01 ; ANR-10-EQPX-1401 and ANR-11-INSB-0007.

REFERENCES

- Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol.* 2015; 17:iv1-iv62.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352:987–96.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009; 10:459–66.
- Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia.* 2011; 59:1169–80.
- Hussain SF, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger AB. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro Oncol.* 2006; 8:261–79.
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013; 496:445–55.
- Rossi ML, Hughes JT, Esiri MM, Coakham HB, Brownell DB. Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. *Acta Neuropathol.* 1987; 74:269–77.
- Lu-Emerson C, Snuderl M, Kirkpatrick ND, Goveia J, Davidson C, Huang Y, Riedemann L, Taylor J, Ivy P, Duda DG, Ancukiewicz M, Plotkin SR, Chi AS, et al. Increase in tumor-associated macrophages after antiangiogenic therapy is associated with poor survival among patients with recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2013; 15:1079–87.
- Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22:231–7.
- Kennedy BC, Showers CR, Anderson DE, Anderson L, Canoll P, Bruce JN, Anderson RC. Tumor-associated macrophages in glioma: friend or foe? *J Oncol.* 2013; 2013:486912.
- Chang CI, Liao JC, Kuo L. Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res.* 2001; 61:1100–6.
- Leblond MM, Gérault AN, Corroyer-Dulmont A, MacKenzie ET, Petit E, Bernaudin M, Valable S. Hypoxia induces macrophage polarization and re-education toward an M2 phenotype in U87 and U251 glioblastoma models. *Oncoimmunology.* 2015; 5:e1056442.
- Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffinan RM, Harsh GR, Brown JM. Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J Clin Invest.* 2010; 120:694–705.
- Wang SC, Yu CF, Hong JH, Tsai CS, Chiang CS. Radiation therapy-induced tumor invasiveness is associated with SDF-1-regulated macrophage mobilization and vasculogenesis. *PLoS One.* 2013; 8:e69182.
- Xu J, Escamilla J, Mok S, David J, Priceman S, West B, Bollag G, McBride W, Wu L. CSF1R signaling blockade stanches tumor-infiltrating myeloid cells and improves the efficacy of radiotherapy in prostate cancer. *Cancer Res.* 2013; 73:2782–94.
- Coates PJ, Rundle JK, Lorimore SA, Wright EG. Indirect macrophage responses to ionizing radiation: implications for genotype-dependent bystander signaling. *Cancer Res.* 2008; 68:450–6.
- Chiang CS, Fu SY, Wang SC, Yu CF, Chen FH, Lin CM, Hong JH. Irradiation promotes an M2 macrophage phenotype in tumor hypoxia. *Front Oncol.* 2012; 2:89.
- Dong C, He M, Ren R, Xie Y, Yuan D, Dang B, Li W, Shao C. Role of the MAPK pathway in the observed bystander effect in lymphocytes co-cultured with macrophages irradiated with γ -rays or carbon ions. *Life Sci.* 2015; 127:19–25.
- Conrad S, Ritter S, Fournier C, Nixdorff K. Differential effects of irradiation with carbon ions and x-rays on macrophage function. *J Radiat Res.* 2009; 50:223–31.
- Narita T, Aoyama H, Hirata K, Onodera S, Shiga T, Kobayashi H, Murata J, Terasaka S, Tanaka S, Houkin K. Reoxygenation of glioblastoma multiforme treated with fractionated radiotherapy concomitant with temozolomide: changes defined by ^{18}F -fluoromisonidazole positron emission tomography: two case reports. *Jpn J Clin Oncol.* 2012; 42:120–3.
- De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell.* 2013; 23:277–86.
- Hou H, Krishnamurthy Nemani V, Du G, Montano R, Song R, Gimi B, Swartz HM, Eastman A, Khan N. Monitoring oxygen levels in orthotopic human glioma xenograft following carbogen inhalation and chemotherapy by implantable resonator-based oximetry. *Int J Cancer.* 2014; 136:1688–96.

23. Russo A, Pacchierotti F, Cimmini D, Ganem NJ, Genescà A, Natarajan AT, Pavanello S, Valle G, Degrassi F. Genomic instability: crossing pathways at the origin of structural and numerical chromosome changes. *Environ Mol Mutagen.* 2015; 56:563–80.
24. Prośniak M, Harshyne LA, Andrews DW, Kenyon LC, Bedelbaeva K, Apanasovich TV, Heber-Katz E, Curtis MT, Cotzia P, Hooper DC. Glioma grade is associated with the accumulation and activity of cells bearing M2 monocyte markers. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:3776–86.
25. Klug F, Prakash H, Huber PE, Seibel T, Bender N, Halama N, Pfirsche C, Voss RH, Timke C, Umansky L, Klapproth K, Schälkel K, Garbi N, et al. Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS+/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. *Cancer Cell.* 2013; 24:589–602.
26. Xiao L, Liu W, Li J, Xie Y, He M, Fu J, Jin W, Shao C. Irradiated U937 cells trigger inflammatory bystander responses in human umbilical vein endothelial cells through the p38 pathway. *Radiat Res.* 2014; 182:111–21.
27. Prakash H, Klug F, Nadella V, Mazumdar V, Winnenthal HS, Umansky L. Low doses of gamma irradiation (LDR) potentially modifies immunosuppressive tumor microenvironment by retuning tumor-associated macrophages (TAM): lesson from insulinoma. *Carcinogenesis.* 2016; 37:301–13.
28. Ridnour LA, Cheng RY, Weiss JM, Kaur S, Soto-Pantoja DR, Basudhar D, Heinecke JL, Stewart CA, DeGraff W, Sowers AL, Thetford A, Kesarwala AH, Roberts DD, et al. NOS inhibition modulates immune polarization and improves radiation-induced tumor growth delay. *Cancer Res.* 2015; 75:2788–99.
29. Pinto AT, Pinto ML, Cardoso AP, Monteiro C, Pinto MT, Maia AF, Castro P, Figueira R, Monteiro A, Marques M, Mareel M, Gomes Dos Santos S, Seruca R, et al. Ionizing radiation modulates human macrophages towards a pro-inflammatory phenotype preserving their pro-invasive and pro-angiogenic capacities. *Sci Rep.* 2016; 6:18765.
30. Wunderlich R, Ernst A, Rödel F, Fietkau R, Ott O, Lauber K, Frey B, Gaipl US. Low and moderate doses of ionizing radiation up to 2 Gy modulate transmigration and chemotaxis of activated macrophages, provoke an anti-inflammatory cytokine milieu, but do not impact upon viability and phagocytic function. *Clin Exp Immunol.* 2015; 179:50–61.
31. Dayal R, Singh A, Pandey A, Mishra KP. Reactive oxygen species as mediator of tumor radiosensitivity. *J Cancer Res Ther.* 2014; 10:811–8.
32. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.
33. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002; 23:549–55.
34. Howard-Flanders P. Effect of nitric oxide on the radiosensitivity of bacteria. *Nature.* 1957; 180:1191–2.
35. Jiang H, De Ridder M, Verovski VN, Sonveaux P, Jordan BF, Law K, Monsaert C, Van den Berge DL, Verellen D, Feron O, Gallez B, Storme GA. Activated macrophages as a novel determinant of tumor cell radioresponse: the role of nitric oxide-mediated inhibition of cellular respiration and oxygen sparing. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010; 76:1520–7.
36. Yakovlev VA. Role of nitric oxide in the radiation-induced bystander effect. *Redox Biol.* 2015; 6:396–400.
37. Günzle J, Osterberg N, Saavedra JE, Weyerbrock A. Nitric oxide released from JS-K induces cell death by mitotic catastrophe as part of necrosis in glioblastoma multiforme. *Cell Death Dis.* 2016; 7:e2349.
38. Heckler M, Osterberg N, Guenzle J, Thiede-Stan NK, Reichardt W, Weidensteiner C, Saavedra JE, Weyerbrock A. The nitric oxide donor JS-K sensitizes U87 glioma cells to repetitive irradiation. *Tumor Biol.* 2017; 39:101042831770392.
39. Lomax ME, Folkes LK, O'Neill P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clin Oncol.* 2013; 25:578–85.
40. Steffens R, Semrau S, Lahmer G, Putz F, Lettmaier S, Eyüpoglu I, Buchfelder M, Fietkau R. Recurrent glioblastoma: who receives tumor specific treatment and how often? *J Neurooncol.* 2016; 128:85–92.
41. Jackson M, Hassiotou F, Nowak A. Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis.* 2015; 36:177–85.
42. Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, Persano L, Della Puppa A, Frasson C, Sarto E, Scienza R, D'Avella D, Basso G. Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells.* 2010; 28:851–62.
43. Tafani M, Di Vito M, Frati A, Pellegrini L, De Santis E, Sette G, Eramo A, Sale P, Mari E, Santoro A, Raco A, Salvati M, De Maria R, et al. Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *J Neuroinflammation.* 2011; 8:32.
44. Zhou W, Ke SQ, Huang Z, Flavahan W, Fang X, Paul J, Wu L, Sloan AE, McLendon RE, Li X, Rich JN, Bao S. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol.* 2015; 17:170–82.
45. Liu SC, Alonran R, Chemikova SB, Lartey F, Stafford J, Jang T, Merchant M, Zboralski D, Zöllner S, Kruschinski A, Klussmann S, Recht L, Brown JM. Blockade of SDF-1 after irradiation inhibits tumor recurrences of autochthonous brain tumors in rats. *Neuro Oncol.* 2014; 16:21–8.
46. Okubo M, Kioi M, Nakashima H, Sugiura K, Mitsudo K, Aoki I, Taniguchi H, Tolmai I. M2-polarized macrophages

- contribute to neovascuogenesis, leading to relapse of oral cancer following radiation. *Sci Rep.* 2016; 6:27548.
47. Bonnaud S, Niaudet C, Pottier G, Gaugler MH, Millour J, Barbet J, Sabatier L, Paris F. Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death. *Cancer Res.* 2007; 67:1803–11.
 48. Ungvari Z, Podlitsky A, Sosnowska D, Tucsek Z, Toth P, Deak F, Gautam T, Csiszar A, Sonntag WE. Ionizing radiation promotes the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype and impairs angiogenic capacity in cerebrovascular endothelial cells: role of increased DNA damage and decreased DNA repair capacity in microvascular radiosens. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013; 68:1443–57.
 49. Warrington JP, Csiszar A, Johnson DA, Herman TS, Ahmad S, Lee YW, Sonntag WE. Cerebral microvascular rarefaction induced by whole brain radiation is reversible by systemic hypoxia in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 300:H736–44.
 50. Zagzag D, Esencay M, Mendez O, Yee H, Smimova I, Huang Y, Chiriboga L, Lukyanov E, Liu M, Newcomb EW. Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. *Am J Pathol.* 2008; 173:545–60.
 51. Newcomb EW, Demaria S, Lukyanov Y, Shao Y, Schnee T, Kawashima N, Lan L, Dewyngaert JK, Zagzag D, McBride WH, Formenti SC. The combination of ionizing radiation and peripheral vaccination produces long-term survival of mice bearing established invasive GL261 gliomas. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:4730–7.
 52. Doblus S, He T, Saunders D, Hoyle J, Smith N, Pye Q, Lerner M, Jensen RL, Townner RA. *In vivo* characterization of several rodent glioma models by 1H MRS. *NMR Biomed.* 2012; 25:685–94.
 53. Bürgi S, Seuwen A, Keist R, Vom Berg J, Grandjean J, Rudin M. *in vivo* imaging of hypoxia-inducible factor regulation in a subcutaneous and orthotopic GL261 glioma tumor model using a reporter gene assay. *Mol Imaging.* 2014; 13:1–11.
 54. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, Van den Bossche J, Mack M, Pipeleers D, In't Veld P, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res.* 2010; 70:5728–39.
 55. Ivashkevich A, Redon CE, Nakamura AJ, Martin RF, Martin OA. Use of the γ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett.* 2012; 327:123–33.
 56. Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsière T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res.* 2008; 658:215–33.
 57. Reiner NE, editor. *Macrophages and Dendritic Cells: Methods and Protocols.* New York, NY: Humana Press; 2009.

Annexe 2 : Goldyn et al., 2019

Copper exchanged FAU nanozeolite as non-toxic nitric oxide and carbon dioxide gas carrier



Contents lists available at ScienceDirect

Microporous and Mesoporous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micromeso

Copper exchanged FAU nanozeolite as non-toxic nitric oxide and carbon dioxide gas carrier

Kamila Goldyn^a, Clément Anfray^b, Sarah Komaty^a, Valerie Ruaux^a, Charly H elaine^b, Richard Retoux^c, Samuel Valable^b, Valentin Valtchev^a, Svetlana Mintova^{a,*}^a Normandie Univ, ENSICAEN, CNRS, Laboratoire Catalyse et Spectrochimie, 14000, Caen, France^b Normandie Univ, CEA, CNRS, GIP, CYCERON, ISTCT/CERVOxy Group, 14000, Caen, France^c Normandie Univ, ENSICAEN, CNRS, CRISMAT, 14000, Caen, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Metal-exchanged nanozeolites
Gas adsorption
Non-toxic
Gas carrier
Biomedical applications

ABSTRACT

A growing interest is currently directed to find an efficient NO and CO₂ gas carriers for biomedical applications. The gas adsorption properties of sodium- (Na-X) and copper- (Cu-X) containing FAU nanozeolites toward nitric oxide and carbon dioxide were studied. The materials were fully characterised by XRD, TEM, ICP, DLS and *in-situ* FTIR. The as-prepared Na-X showed higher gas adsorption ability towards carbon dioxide, whereas the ion-exchanged Cu-X was more efficient adsorbent with regards to nitric oxide. In addition, the cytotoxicity tests disclosed that both nanozeolites have no toxicity making them suitable for further tests in biomedical field as gas transporters.

1. Introduction

The well-established activity of copper containing zeolites with nitric oxide (NO) and carbon dioxide (CO₂) have proved their functionality mainly as a de-NO_x catalyst, where the zeolites are used to perform selective catalytic reduction of nitric oxide (NO) [1–3], as well as CO₂ adsorbent for gas separation in industrial and environmental processes [4,5]. Based on this background we developed a new application where zeolites are employed to act as NO and CO₂ gas carriers for potential biomedical uses.

NO is an antibacterial, principal signalling molecule (generated within the body), that is involved in many biological processes, namely regulation of the blood flow, neurotransmission and immune response [6–8]. CO₂, also generated within the body as a result of aerobic respiration, is an essential moderator in human physiology, controlling blood circulation and pH. The extrinsic delivery of such biologically active molecules is an interesting and challenging way of therapy that could potentially be an effective remedy for major illnesses. As an example, when CO₂ is inhaled in the form of carbogen (mixture of O₂ 95% and 5% CO₂), it increases tissue perfusion and oxygenation, which is an important stage in improving tumour treatment efficacy [9,10]. However, the broad range of effects generated in the body by these two gases raised an issue about its specificity and targeted delivery, which complicated the progress for their applications in biomedicine.

Therefore, to overcome those uncertainties, the development of selective and most importantly non-toxic materials that can carry and release therapeutic gases is required.

Nowadays, there is a growing interest in finding suitable NO carriers to prevent perilous life conditions such as thrombosis (blood clot formation), at the surface of artificial blood vessels and medical devices. Currently, anticoagulants such as heparin are employed to overcome thrombosis, however, the use of latter can cause unexpected bleeding in other parts of the body, leading to loss of platelets and thus thrombocytopenia [11]. In the case of carbogen administration, the inhalation via nasal cannula or facemask showed insufficiency on tissue reoxygenation regarding progressive response to radio therapy [12]. As a result, a vast number of NO- and CO₂-carrying materials have been proposed, which are mainly based on synthetic polymers (PVC, PDMS) and fumed silica particles. For NO delivery purposes those materials have been functionalised with various amines, and upon reaction with NO, they form diazeniumdiolate ions. The latter, can hydrolyse in aqueous solution with suitable pH to release nitric oxide and thus act as a gas donor [13–17]. Over the years, it was demonstrated, namely by the group of Morris et al. that metal exchanged, highly crystalline porous materials, such as zeolites and metal organic framework (MOFs) type materials have the ability to adsorb and release nitric oxide [18–21]. The adsorption of CO₂ in zeolites was also studied widely and demonstrated they can be used for an efficient gas storage and delivery

* Corresponding author.

E-mail address: svetlana.mintova@ensicaen.fr (S. Mintova).<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2019.02.022>

Received 12 November 2018; Received in revised form 5 February 2019; Accepted 12 February 2019

Available online 13 February 2019

1387-1811/  2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

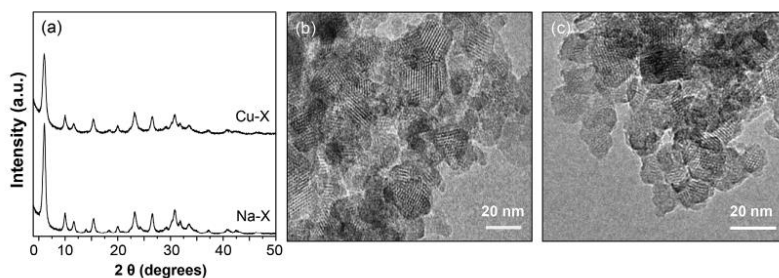


Fig. 1. (a) XRD patterns of samples Na-X and Cu-X, and TEM images of (b) Na-X and (c) Cu-X.

Table 1
The elemental analysis of Na-X and Cu-X zeolites determined by ICP.

Sample name	Na (wt. %)	Cu (wt. %)	Al (wt. %)	Si (wt. %)	Si/Al
Na-X	9.60	–	11.84	19.29	1.63
Cu-X	5.69	5.11	11.38	17.86	1.57

for both environmental and biomedical applications [18,22–24]. The characteristics of zeolites namely, well-defined porous structures, high specific surface area, and chemical/thermal stability render them as appropriate materials for selective gas adsorption purposes [25,26]. Additionally, the chemical properties of zeolites, enable to control the gas adsorption capacity, which can be accomplished by tuning the zeolite composition, in terms of the type of metal ion present in the structure. The introduction of various cations (Fe^{3+} , Ce^{3+} , Cu^{2+} , Gd^{3+}) in the zeolite is usually achieved via post-synthetic ion-exchange, to further functionalise the material for targeted application [27,28]. Other aspects influencing the gas sorption affinity are the zeolite physical features, such as size and framework type (more than 239), providing a great array of structures to choose from depending on desired use.

The low toxicity of zeolite plays a major role when it comes to biomedical applications. The modifications of zeolite crystal size, from micron to nanoscale, as well as the development of template-free synthesis, yielding biocompatible nanozeolites becomes of important research field. The cytotoxicity of nanozeolites does not just depend on crystal size but also on particle agglomeration and stability in colloidal suspension [29]. As a result of their low toxicity towards sensitive cells (such as cells from the central nervous system), nanocrystals have drawn particular attention of researchers working in the field of biomedical science, especially for contrast agents, controlled drug release [30–32], and gas delivery purposes [28,33,34]. Moreover, it has recently been reported that the copper containing FAU nanozeolite (in

form of stable suspension), can be used for direct sanitisation of medical surfaces against ESKAPE bacteria and thus act as antimicrobial agent to prevent life-threatening infections [35].

Here, we report the preparation of sodium and copper containing FAU-type nanozeolite (zeolite X) with high sorption capacity towards NO and CO_2 , which can be used as alternative way of gas delivery for biomedical applications. The sorption affinity of as prepared Na-containing FAU (Na-X) and Cu ion-exchanged zeolite (Cu-X) to NO and CO_2 was studied by *in-situ* IR spectroscopy. Moreover, the cytotoxicity tests using a selection of cells, including, human tumour, kidney and most sensitive primary culture of astrocytes to assess the biocompatibility of prepared nanozeolites were performed. We also demonstrated that the cation types in zeolites highly affect the gas adsorption properties, i.e., the Cu-X has greater adsorption capacity towards NO, whereas the as prepared Na-X has higher CO_2 sorption affinity. The high sorption capacity of non-toxic Cu-X, combined with antimicrobial properties, provide a platform for alternative therapies in the biomedical field.

2. Experimental

2.1. Preparation of Cu-FAU nanozeolite

The template-free, nanosized Na-X zeolite with FAU framework topology was synthesised following a previously reported procedure [36]. The aluminate solution consisted of 2.5 g of sodium hydroxide (NaOH, 97%, Sima-Aldrich) which was dissolved in 3.0 g double distilled water (dd H_2O), followed by slow addition of 0.297 g aluminum powder (325 mesh, 99.5%, Alfa Aesar). The mixture was stirred until a clear solution was obtained. The silicate solution was prepared by dissolving 1.1 g of NaOH in 1.0 g of dd H_2O , followed by the addition of 10 g colloidal silica (Ludox-HS 30, 30 wt % SiO_2 , Aldrich). The acquired white, turbid suspension was placed in the oven at 100 °C for 5 min to obtain a clear suspension. The aluminate solution was then added

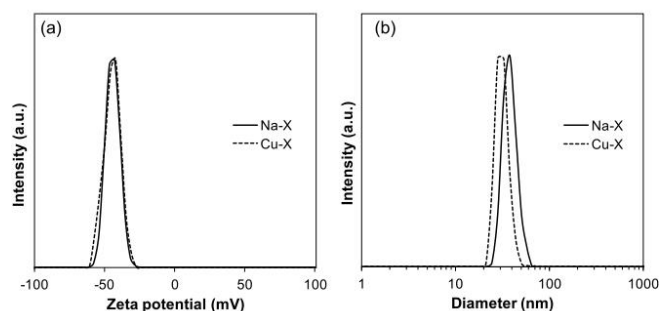


Fig. 2. (a) Zeta potential and (b) DLS curves for Na-X and Cu-X zeolite suspensions.

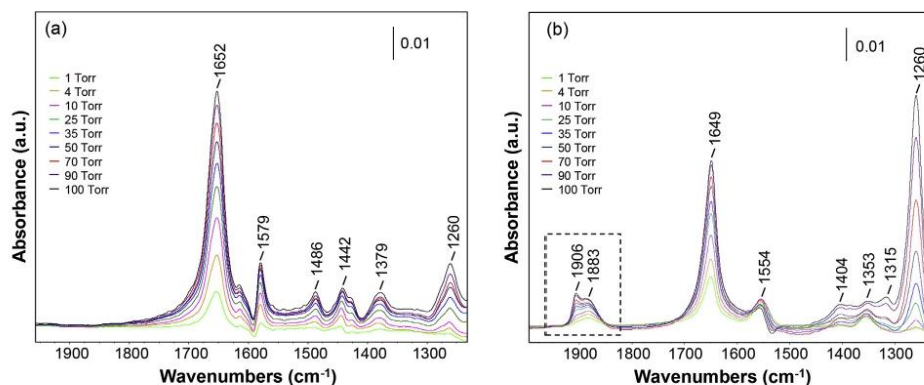


Fig. 3. FTIR spectra evolution of NO adsorbed on (a) Na-X and (b) Cu-X nanozeolites at gas pressure varying from 1 to 100 Torr.

Table 2

Assignment of the IR bands observed after NO adsorption on Na- and Cu-X [36,37].

IR bands (cm^{-1})	Structure	Notes
1906	NO on Cu^{2+}	on Cu^{2+} carrying extra lattice oxygen
1883	NO on Cu^{2+}	on isolated Cu^{2+} moved to accessible position
1652–1649	bridging nitrates	on Al sites
1579–1554	monodentate nitrates	on Si sites
1486	monodentate nitrate	–
1442	monodentate nitrito	–
1404	nitrate species	–
1379–1353	Nitro species	–
1315	Nitro/nitrate species	–
1260	Nitro species	on Na sites

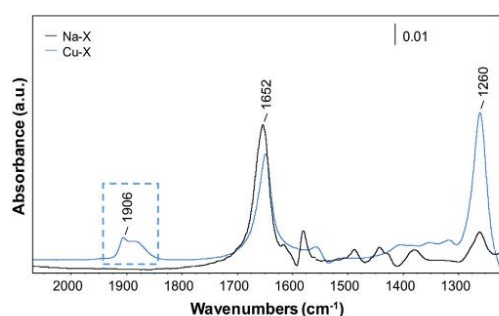


Fig. 4. FTIR bands after NO adsorption on Na-X (black) and Cu-X (blue) at 100 Torr in the range 2075–1225 cm^{-1} . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

dropwise to the latter placed in an ice-bath under vigorous stirring. As a result, a clear suspension with the starting molar composition $9 \text{ Na}_2\text{O} : 1.1 \text{ Al}_2\text{O}_3 : 10 \text{ SiO}_2 : 122\text{H}_2\text{O}$ was produced, then aged at room temperature for 24 h, followed by dehydration (to adjust the H_2O content to 45) and hydrothermal treatment at 50°C for 26 h. The crystalline product were recovered by centrifugation (20000 rpm, 25 min) and purified by washing with dd H_2O until reaching the pH = 7.

The Cu-X was prepared by ion-exchange of 2.4 wt % Na-X suspension with 0.004 M of copper nitrate ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) at room

temperature for 1 h (zeolite to copper suspension ratio 1:5). The sample was washed three times by centrifugation (20000 rpm, 25 min) and redispersed in dd H_2O . The final pH of the Cu-X suspension was 7.

2.2. Characterisation

The stability and particle size distribution of Na-X and Cu-X zeolite suspensions (pH = 7) was determined by zeta potential and dynamic light scattering (DLS) respectively, using a Malvern Zetasizer Nano instrument. The crystal structure of the parent Na-X and the ion-exchanged zeolite Cu-X was determined by X-ray diffraction. The analyses were performed with a PANalytical X'Pert PRO-MPD diffractometer with $\text{Cu K}\alpha$ radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). The samples were scanned in the 2θ range of $4\text{--}50^\circ$ with a step size of 0.016° . The size and morphology of zeolites were studied by scanning electron microscope (SEM, MIRA-LMH TESCAN) supplied with a field emission gun and a transmission electron microscopy (TEM, 200 kV JEOL 2010 FEG). The elemental composition was determined by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES) using an OPTIMA 4300 DV (PerkinElmer) instrument.

The adsorption capacities of self-supported zeolites wafers (2 cm^2 area, 20 mg) towards NO and CO_2 were determined using Nicolet Magna 550-FTIR spectrometer (4 cm^{-1} optical resolution and 128 scans) equipped with MCT detector. Prior to the adsorption measurements, each sample was activated at 120°C under oxygen for 4 h, followed by evacuation at the same temperature. The sample was further heated for 4 h at 300°C under vacuum (10^{-6} Torr). The NO and CO_2 were adsorbed at room temperature using various amounts introduced in small volumes; 1–100 Torr for NO and 10–180 Torr for CO_2 . All spectra were normalised to the sample weight.

2.3. Cytotoxicity tests: materials and methods

Cell lines: Human embryonic kidney (HEK 293) and human glioblastoma cells (U87-MG), were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich, France) prior the toxicity tests. The cell lines listed above were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) and maintained in culture at 37°C with 5% CO_2 and 95% humidity.

DMEM was supplemented with 10% foetal bovine serum (Eurobio, France), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich, France) and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, France).

Primary culture of astrocytes: Cerebral cortices (isolated from neonatal 1–3 days old mice, Swiss, CURB, France) were carefully stripped of the meninges and dissociated to generate a single-cell suspension. The cultures were left to grow in an incubator at 37°C

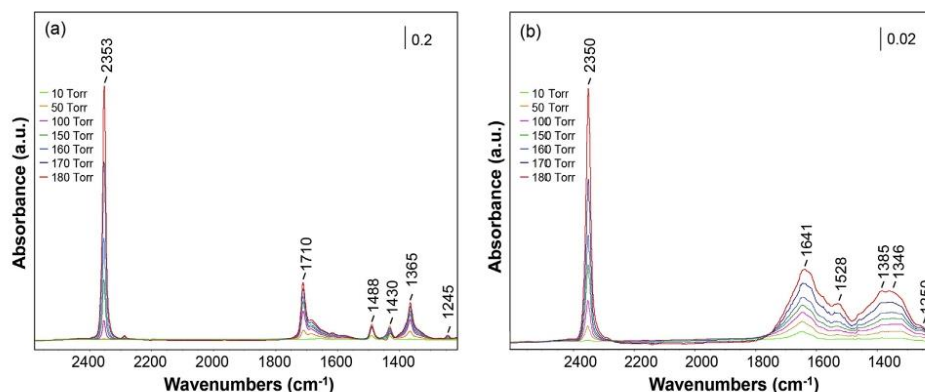


Fig. 5. FTIR spectra evolution after carbon dioxide adsorption on (a) Na-X and (b) Cu-X nanosized zeolites at room temperature.

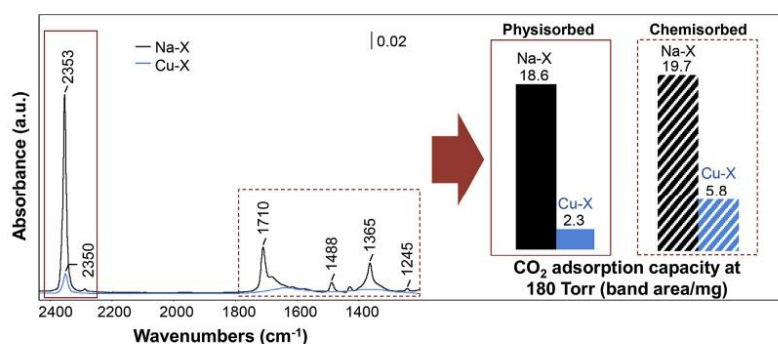


Fig. 6. FTIR spectra after carbon dioxide adsorption at 180 Torr (left) and CO₂ adsorption capacity for Na- and Cu-X zeolite samples measured at 180 Torr (right).

(humidified with 5% CO₂ to confluency up to 20 days) and supplemented with DMEM consisting of 10% foetal bovine serum (Eurobio, France), 10% horse serum (Eurobio, France), 2mM glutamine (Sigma-Aldrich, France) and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, France) prior use.

Cells exposure to nanosized zeolites: Before to cells exposure the Na-X and Cu-X nanozeolites were diluted in culture medium at concentrations: 1, 10, 50 or 100 µg/ml then added directly into the wells. Cells were exposed to nanozeolites for a period of 24, 48 and 72 h. The control tests were performed with distilled water under exactly the same conditions.

Cells viability: Cells were seeded in 24-wells plates to obtain 80% of confluence on the day of analysis and measured in compliance with manufacturer's manual (WST-1 assay, Roche, France).

3. Results and discussion

3.1. Properties of prepared nanozeolites

The synthesised Na-X nanosized zeolite sample is pure and highly crystalline Fig. 1 (a,b,c). After ion-exchange with copper the framework structure of the sample Cu-X is completely preserved. The X-ray diffraction patterns of Na-X and Cu-X are alike in nature and typical for FAU-type zeolite. Fig. 1a illustrates the Bragg peaks widening, which indicates the small size of zeolite crystals. The morphology of prepared samples was further assessed by TEM, which confirmed the nanosized

particle size with mean diameter < 40 nm (Fig. 1b and c). The homogeneous nanocrystals exhibit a typical octahedral morphology with fully crystalline and well-developed faces, which remained unchanged after the incorporation of copper.

The elemental composition of the samples is presented in Table 1. The ion-exchange process does not influence the Si/Al ratio, which was around 1.6 for both samples. Consequently, 59% of sodium was exchanged, leaving 5.11 wt % of copper present in the Cu-X sample.

The stability of colloidal zeolite suspensions is one of the prime factors considered for biomedical applications. The stability of Na-X and Cu-X samples is determined by evaluating the zeta potential values. This technique measures the surface charge of nanoparticles and it is influenced by pH/concentration of the zeolite suspension. Generally, the zeta potential limit value of ± 30 mV is employed to determine the stability of nanozeolites in suspension. The zeta potential values are -43.1 mV to -42.4 mV for Na-X and Cu-X nanozeolites, respectively, demonstrating the high colloidal stability of both zeolite suspensions (Fig. 2a). In addition, DLS results show narrow, monomodal particle size distribution, which are similar for both samples (Fig. 2b). This indicates that the ion-exchange does not influence the stability of zeolite nanocrystals.

3.2. In-situ FTIR measurements

In-situ IR spectroscopy was used to determine the sorption capacity of as-prepared Na-X and Cu-X samples toward NO and CO₂.

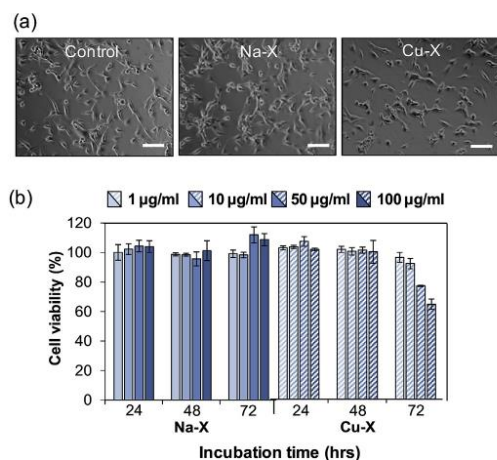


Fig. 7. (a) Representative photographs of U87-MG cells after 24 h exposure to 10 µg/ml of Na-X, Cu-X zeolites and control (H₂O), scale bar = 100 µm. (b) Quantification of cell viability of human glioblastoma after 24, 48 and 72 h exposure to Na-X and Cu-X zeolites with four different concentrations. Cell viability was assessed using the WST-1 test. Mean SD. n = 3.

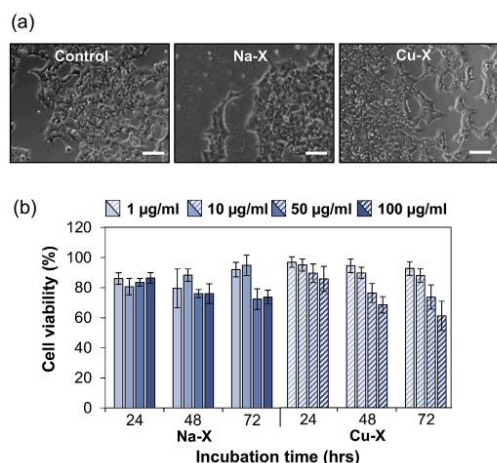


Fig. 8. (a) Representative photographs of HEK 293 cells after 24 h exposure to 10 µg/ml of Na-X, Cu-X zeolites and control (H₂O), scale bar = 100 µm. (b) Quantification of cell viability of human glioblastoma after 24, 48 and 72 h exposure to Na-X and Cu-X zeolites with four different concentrations. Cell viability was assessed using the WST-1 test. Mean SD. n = 3.

The adsorption of nitric oxide on zeolite samples after activation was performed at room temperature. The IR spectra of NO adsorbed on Na-X and Cu-X in the region of 1652–1260 cm⁻¹ are presented in Fig. 3. The spectra are similar with the exception of the bands at 1906 and 1883 cm⁻¹ clearly observed in the Cu-X sample (Fig. 3b).

According to previous studies the bands positioned in the 1652–1260 cm⁻¹ region correspond to surface species, in most cases nitrates, nitrites and nitro and/or nitrito compounds (Table 2) [37–40]. The bands at 1906 and 1883 cm⁻¹ are attributed to nitrosyls, which are formed upon nitric oxide adsorption on two different Cu²⁺ sites, giving

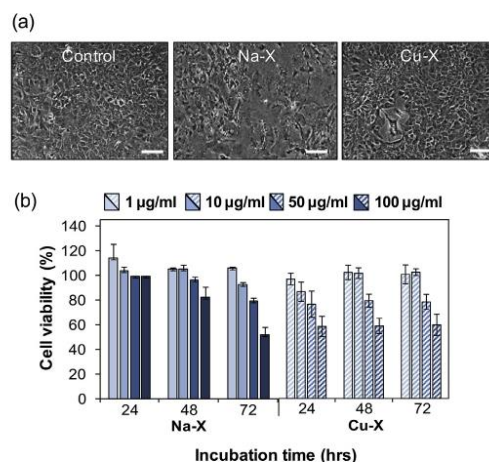


Fig. 9. (a) Representative photographs of astrocytes after 24 h exposure to 10 µg/ml of Na-X, Cu-X zeolites and control (H₂O), scale bar = 100 µm. (b) Quantification of cell viability of mice astrocytes after 24, 48 and 72 h exposure to Na-X and Cu-X zeolites with four different concentrations. Cell viability was assessed using the WST-1 test. Mean SD. n = 3.

rise to formation of Cu²⁺–NO species. No band at 1900 cm⁻¹ was observed for pure Na-X nanozeolite.

The adsorption capacity of zeolites towards NO was evaluated by measuring the intensity of the bands in the region of 1906–1883 cm⁻¹ at 100 Torr (Fig. 4). The results indicated that copper-containing nanozeolite has greater NO capacity in comparison to the Na-X. This can be explained by the stronger interactions of NO with the copper by the formation of new adsorption sites for NO.

The adsorption of carbon dioxide was carried out at room temperature on the readily activated Na- and Cu-X zeolite samples. Fig. 5a and b presents the evolution of FTIR spectra for Na-X and Cu-X nanozeolites. Two regions at 2400–2300 cm⁻¹ and 1800–1200 cm⁻¹ were evaluated. These regions are characteristic for physisorbed and chemisorbed CO₂ species, respectively. Accordingly, well-pronounced adsorption bands at 2353 cm⁻¹ and 2350 cm⁻¹ are present for Na-X and Cu-X, which are ascribed to the asymmetric stretching mode of physically adsorbed carbon dioxide on the zeolite surface [41].

The band intensity increases with increasing gas pressure, therefore the amount of physisorbed CO₂ was evaluated at constant pressure for both samples. The spectra of sodium and copper nanozeolites at 180 Torr are presented in Fig. 6 (left). The physisorbed CO₂ on the Na-X sample is eight times higher than on the Cu-X as shown in Fig. 6 (right).

The less pronounced bands in the 1800–1200 cm⁻¹ region are typical for carbonates [42]. These carbonate species include notably stable mono-, uni- and bidentate carbonates, which are formed as a result of CO₂ interaction with the oxygen bridging aluminium or silicon atoms [43]. It was previously reported that the carbonate formation can limit carbon dioxide adsorption due to decrease of accessibility to zeolite surface [44]. In the copper-containing sample the carbonate region is not very prominent, this made it difficult to distinguish between different types of carbonates present. The amount of chemisorbed CO₂ was measured at 180 Torr for Na-X and Cu-X, showing that sodium-containing nanosized zeolite has three times greater adsorption capacity in contrast to the copper one (Fig. 6). This result demonstrates that by simple ion-exchange the properties of zeolite can be readily modified depending on the desired application. As mentioned before the adsorption of both gases was performed in the absence of water which simplified the measurements. However, when a very hydrophilic

zeolite such as FAU is considered for a gas delivery in biological systems, the contact with water is unavoidable. Generally, the gas release in zeolites is stimulated by water diffusion, and other factors such as metal type, position and distribution in zeolites have to be considered. Therefore, the evaluation of gas adsorption in hydrated sample is a challenge that has to be taken into consideration for future studies.

3.3. Cytotoxicity tests of nanosized Na-X and Cu-X zeolites

In order to assess the biocompatibility of nanozeolites and thus prove their applicability in biomedicine, cytotoxicity measurements were performed. Different cell lines including human glioblastoma (U87-MG), human kidney (HEK 293) and mice astrocytes were exposed to zeolite samples at increasing concentrations (1–100 µg/ml) for 24–72 h, followed by cell viability measurements. It is important to note that in some cases the cell viability is greater than 100% due to cell proliferation (increase in cell number due to cell growth and division). As a result, no toxicity was observed for U87-MG cells which were subjected to both, Na-X and Cu-X nanosized zeolites (Fig. 7) whatever the concentration used until 48 h of exposure. The only exception is a small decrease in cell viability after 72 h of exposure to high concentration of copper-containing nanozeolites.

Human kidney cells display slightly higher sensitivity towards nanozeolites (Fig. 8). In general, both zeolites are harmless to the HEK 293 cells when exposed to low concentrations, however, a 40% decrease in cell viability was observed after 72 h at 100 µg/ml of Cu-X. For astrocytes cell lines exposed to zeolite nanocrystals a dose dependant cell death is observed. The cell viability decreased by ~43% after exposure to 50–100 µg/ml of zeolites as presented in Fig. 9.

4. Conclusions

The sodium- and copper-containing nanosized FAU zeolite crystals (Na-X and Cu-X) were prepared in the form of stable colloidal suspensions. The gas adsorption properties of both materials towards nitric oxide and carbon dioxide were evaluated; the materials are considered to be used for potential gas delivery systems in biomedicine. The copper ion-exchanged nanozeolites (Cu-X) show increased NO adsorption capacity due to the formation of new adsorption sites of NO in comparison to the sodium form. On the other hand the Na-X shows better adsorption affinity towards CO₂. Both, Na- and Cu-X nanozeolites, show no cytotoxicity towards human glioblastoma, kidney and mice astrocytes, confirming their biocompatibility and thus ability to be further employed as gas carriers for biomedical applications.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut National Du Cancer (PLBIO17 INCA_11699) and Conseil Régional de Basse-Normandie (Projet Emergence ZEOXY) France), and the European Union-Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)

References

- [1] M. Iwamoto, S. Yokoo, K. Sakai, S. Kagawa, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases 77 (1981) 1629–1638.
- [2] P. Ciambelli, P. Corbo, F. Migliardini, Catal. Today 59 (2000) 279–286.
- [3] G. Delahay, S. Kieger, N. Tanchoux, P. Trems, B. Coq, Appl. Catal. B Environ. 52 (2004) 251–257.
- [4] C. Boruban, E. Nalbant Esenturk, J. Mater. Res. 32 (2017) 3669–3678.
- [5] M.R. Hudson, W.L. Queen, J.A. Mason, D.W. Fickel, R.F. Lobo, C.M. Brown, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 1970–1973.
- [6] P.A. Bachmann, P.L. Luisi, J. Lang, Nature 357 (1992) 57–59.
- [7] V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D.A. Butterfield, A.M. Giuffrida Stella, Nat. Rev. Neurosci. 8 (2007) 766–775.
- [8] F.X. Guix, I. Urbisalgo, M. Coma, F.J. Muñoz, Prog. Neurobiol. 76 (2005) 126–152.
- [9] A. Chakhoyan, A. Corroyer-Dulmont, M.M. Leblond, A. Géralt, J. Toutain, L. Chazavil, D. Divoux, E. Petit, E.T. MacKenzie, F. Kauffmann, N. Delcroix, M. Bernaudin, O. Touzani, S. Valable, J. Cerebr. Blood Flow Metabol. 37 (2016) 2270–2282.
- [10] J.H. Kaanders, J. Bussink, A.J. Van der Kogel, Lancet Oncol. 3 (2002) 728–737.
- [11] Z. Cai, S.V. Yarovoi, Z. Zhu, L. Rauova, V. Hayes, T. Lebedeva, Q. Liu, M. Poncez, G. Arepally, D.B. Cines, M.I. Greene, Nat. Commun. 6 (2015) 1–10.
- [12] R.W.M. van der Maazen, H.O.M. Thijssen, J.H.A.M. Kaanders, A. de Koster, A. Keyser, M.J.J. Prick, J.A. Grotenhuis, P. Wesseling, A.J. van der Kogel, Radiother. Oncol. 35 (1995) 118–122.
- [13] R.S. Drago, B.R. Karstetter, J. Am. Chem. Soc. 83 (1961) 1819–1822.
- [14] K.M. Davies, D.A. Wink, J.E. Saavedra, L.K. Keefer, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 5473–5481.
- [15] D.J. Smith, D. Chakravarthy, S. Pulfer, M.L. Simmons, J.A. Hrabie, M.L. Citro, J.E. Saavedra, K.M. Davies, T.C. Hutsell, D.L. Mooradian, S.R. Hanson, L.K. Keefer, J. Med. Chem. 39 (1996) 1148–1156.
- [16] H. Zhang, G.M. Annich, J. Miskulin, K. Stankiewicz, K. Osterholzer, S.I. Merz, R.H. Bartlett, M.E. Meyerhoff, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 5015–5024.
- [17] H. Zhang, G.M. Annich, J. Miskulin, K. Osterholzer, S.I. Merz, R.H. Bartlett, M.E. Meyerhoff, Biomaterials 23 (2002) 1485–1494.
- [18] R.E. Morris, P.S. Wheatley, Angew. Chem. Int. Ed. 47 (2008) 4966–4981.
- [19] A.C. McKinlay, J.F. Eubank, S. Wuttke, B. Xiao, P.S. Wheatley, P. Bazin, J.C. Lavalley, M. Daturi, A. Vimont, G. De Weireld, P. Horcajada, C. Serre, R.E. Morris, Chem. Mater. 25 (2013) 1592–1599.
- [20] S. Fox, T.S. Wilkinson, P.S. Wheatley, B. Xiao, R.E. Morris, A. Sutherland, A.J. Simpson, P.G. Barlow, A.R. Butler, I.L. Megson, A.G. Rossi, Acta Biomater. 6 (2010) 1515–1521.
- [21] P.S. Wheatley, A.R. Butler, M.S. Crane, A.G. Rossi, I.L. Megson, R.E. Morris, Mol. Sieves From Basic Res. to Ind. Appl. Pts A B 158 (2005) 2033–2040.
- [22] V. Georgieva, C. Anfray, R. Retoux, V. Valchev, S. Valable, S. Mintova, Microporous Mesoporous Mater. 232 (2016) 256–263.
- [23] L. Ohlin, P. Bazin, F. Thibault-Starzyk, J. Hedlund, M. Grahn, J. Phys. Chem. C 117 (2013) 16972–16982.
- [24] G. Maurin, R. Bell, B. Kuchta, T. Poyet, P. Llewellyn, Adsorption 11 (2005) 331–336.
- [25] C. Martínez, A. Corma, Coord. Chem. Rev. 255 (2011) 1558–1580.
- [26] M. Zaarour, B. Dong, I. Naydenova, R. Retoux, S. Mintova, Microporous Mesoporous Mater. 189 (2014) 11–21.
- [27] V. Georgieva, C. Anfray, R. Retoux, V. Valchev, S. Valable, S. Mintova, Microporous Mesoporous Mater. 232 (2016) 256–263.
- [28] S. Komaty, C. Anfray, M. Zaarour, H. Awala, V. Ruaux, S. Valable, S. Mintova, Molecules 23 (2018) 37–48.
- [29] C. Anfray, B. Dong, S. Komaty, S. Mintova, S. Valable, ACS Appl. Mater. Interfaces 9 (2017) 13849–13854.
- [30] R. Amorim, N. Vilaça, O. Martinho, R.M. Reis, M. Sardo, J. Rocha, A.M. Fonseca, F. Baltazar, I.C. Neves, J. Phys. Chem. C 116 (2012) 25642–25650.
- [31] D.G. Fatouros, D. Douroumis, V. Nikolakis, S. Ntais, A.M. Moschovi, V. Trivedi, B. Khima, M. Roldo, H. Nazar, P.A. Cox, J. Mater. Chem. 21 (2011) 7789–7794.
- [32] N. Vilaça, A.F. Machado, F. Morais-Santos, R. Amorim, A. Patrícia Neto, E. Logodini, M.F.R. Pereira, M. Sardo, J. Rocha, P. Parpot, A.M. Fonseca, F. Baltazar, I.C. Neves, RSC Adv. 7 (2017) 13104–13111.
- [33] S.E. Russell, J.M. González Carballo, C. Orellana-Tavra, D. Fairen-Jimenez, R.E. Morris, Dalton Trans. 46 (2017) 3915–3920.
- [34] P.S. Wheatley, A.R. Butler, M.S. Crane, S. Fox, B. Xiao, A.G. Rossi, I.L. Megson, R.E. Morris, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 502–509.
- [35] J. Redfern, K. Goldyn, J. Verran, R. Retoux, L. Tosheva, S. Mintova, Microporous Mesoporous Mater. 253 (2017) 233–238.
- [36] H. Awala, J.P. Gilson, R. Retoux, P. Boullay, J.M. Goupil, V. Valchev, S. Mintova, Nat. Mater. 14 (2015) 447–451.
- [37] M. Iwamoto, H. Yahiro, Handb. Zeolite Sci. Technol. (2003) 951–997 New York.
- [38] M. Shelef, Chem. Rev. 95 (1995) 209–225.
- [39] T. Venkov, K. Hadjiivanov, D. Klissurski, Phys. Chem. Chem. Phys. 4 (2002) 2443–2448.
- [40] K. Hadjiivanov, Catal. Rev. 42 (2000) 71–144.
- [41] P. Galhotra, J.G. Navea, S.C. Larsen, V.H. Grassian, Energy Environ. Sci. 2 (2009) 401–409.
- [42] J.W. Ward, H.W. Habgood, J. Phys. Chem. 70 (1966) 1178–1182.
- [43] D. Bonenfant, M. Kharoune, P. Niquette, M. Mimeo, R. Hausler, Sci. Technol. Adv. Mater. 9 (2008) 1–7.
- [44] C.L. Angell, M. V. Howell, J. Phys. Chem. 47 (1969) 3831–3836.

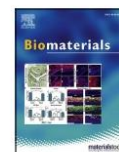
Annexe 3 : Anfray et al., 2020

Nanosized zeolites as a gas delivery platform in a glioblastoma model



Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biomaterials

Nanosized zeolites as a gas delivery platform in a glioblastoma model

Clément Anfray^a, Sarah Komaty^b, Aurélien Corroyer-Dulmont^a, Moussa Zaarour^b, Charly Helaine^a, Hayriye Ozcelik^a, Clélia Allieux^a, Jérôme Toutain^a, Kamila Goldyn^b, Edwige Petit^a, Karim Bordji^a, Myriam Bernaudin^a, Valentin Valtchev^b, Omar Touzani^a, Svetlana Mintova^{b,*}, Samuel Valable^{a,*}

^a Normandie Université, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy group, GIP Cyceron, Caen, France

^b Normandie Université, ENSICAEN, UNICAEN, CNRS, Laboratoire Catalyse et Spectrochimie (LCS), 14050, Caen, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Glioblastoma
Hypoxia
Nanosized zeolites
MRI
Vectorization

ABSTRACT

Approaches able to counteract, at least temporarily, hypoxia, a well-known factor of resistance to treatment in solid tumors are highly desirable. Herein, we report the use of nanosized zeolite crystals as hyperoxic/hypercapnic gas carriers for glioblastoma. First, the non-toxic profile of nanosized zeolite crystals in living animals (mice, rats and non-human primates) and in various cell types is presented. Second, the ability of the nanosized zeolites to act as a vasoactive agent for a targeted re-oxygenation of the tumor after intravenous injection is shown. As attested by an MRI protocol, the zeolites were able to increase oxygenation and blood volume specifically within the brain tumor whilst no changes in the healthy-non tumoral brain were observed. The first proof of concept for the use of metal-containing nanosized zeolites as a tool for vectorization of hyperoxic/hypercapnic gases in glioblastoma is revealed.

1. Introduction

Even with aggressive conventional therapies for the treatment of glioblastoma (GBM), the most lethal primary brain tumor [1], the median survival of patients remains around 15 months [2]. Hypoxia, a feature of numerous solid tumors, including GBM [3], is defined as the disproportion between oxygen supply and oxygen consumption. Hypoxia arises from increased metabolic rate of cancer cells, poorly efficient tumor vascularization and augmented interstitial pressure, leading to poor oxygen diffusion. Hypoxia activates adaptive survival mechanisms in cancer cells which in turn stimulate tumor development [4] and resistance to treatments [5]. Hypoxia is a well-known factor of poor prognosis for GBM [6]. Therefore, there is great need to develop a new approach to increase oxygen pressure selectively into the hypoxic tumor, at least transiently.

Several methods have been proposed to alleviate hypoxia in tumors. Among them, one cites pure oxygen breathing or carbogen (5% CO₂ mixed with 95% O₂) breathing. Nevertheless, the global outcomes were disappointing in terms of sensitization to radiation therapy in GBM [7, 8]. Moreover, in rodent models of GBM, through the use of advanced

magnetic resonance imaging (MRI), we have shown that carbogen improved the cerebral blood volume (CBV) and the oxygenation in the healthy brain tissue at the expense of the GBM tumor [9].

Because of the atypical structure and organization of the tumor vasculature and the absence of a lymphatic system [10], many nanoparticles (NP) of several chemical natures have been examined as transporters of contrast agents and anti-cancer agents due to their aptitude to specifically reach tumors [11]. Furthermore, numerous NP have been designed to sensitize the tumor to RT. These comprise gadolinium-containing NP which rely on the Auger effect [12], NP that decrease the self-repair of cancer cells following RT [13], NP which protect the healthy tissue by reducing oxidative stress [14], and NP that generate oxygen *in-situ* [15]. Nevertheless, few NP were developed to locally and selectively carry gases in the tumor. Even if micron-sized particles were recently demonstrated to carry approximately five times more oxygen than human red blood cells, their use to alleviate hypoxia in brain tumors is not satisfactory because of their large diameter [16].

Among nanoparticles, zeolites with their excellent chemical selectivity, large sorption ability and absence of toxicity [17–19], are now

* Corresponding author. GIP CYCERON, Bd H Becquerel, BP 52259 14074, Caen, France.

** Corresponding author. LCS, ENSICAEN, CNRS, 6, boulevard Maréchal Juin, 14050, Caen, France.

E-mail addresses: mintova@ensicaen.fr (S. Mintova), samuel.valable@cnrs.fr (S. Valable).

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120249>

Received 20 April 2020; Received in revised form 14 July 2020; Accepted 17 July 2020

Available online 25 July 2020

0142-9612/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

more and more considered for biomedical usage [20,21], including cancer therapy [22,23]. Zeolites are crystalline, porous materials made of interconnected TO_4 tetrahedra, where T atoms are represented by Si and Al. They have regular framework structures composed of cages and pores of different sizes and forms [24]. Zeolites have been synthesized at the nanosize scale and stabilized in colloidal suspensions [25]. The ordered pores of the zeolites are able to adsorb and desorb various molecules, which allow them to act as efficient carriers of several gases such as NO , CO_2 and O_2 [18,26]. The tunable chemical composition of these crystalline materials allows them to adapt to different chemical environments and thus to display an important stability in acidic and alkaline media. Moreover, adding different metal cations (Fe, Gd) inside the nanosized zeolites can modify their functioning, and therefore significantly rises the interest of zeolite NP as an instrument for imaging [27] and gases carriage [18] applications. Consequently, it is of interest to examine nanosized zeolites as gas transporters to alleviate hypoxia in GBM.

In the present study, in a rodent model of GBM, we provide a proof of concept to precisely carry O_2 and/or CO_2 to tumors through the use of metal-containing nanosized zeolite crystals with FAU-type structure to enhance oxygenation and/or blood volume. Gadolinium (Gd) was introduced into the nanosized zeolites via ion exchange to be administered into the blood circulation and tracked using MRI.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of nanosized faujasite (Na-FAU) type zeolites

Stable suspensions of nanosized zeolite (Na-FAU) were prepared from colloidal precursor solution under hydrothermal conditions as we described earlier [28]. The as-prepared precursor suspension for Na-FAU zeolite was kept at room temperature for 24 h, followed by dehydration using freeze-drying method prior hydrothermal treatment at 50°C for 26 h. After the hydrothermal treatment, the zeolite nanoparticles were purified by six step centrifuge (24,500 rpm, 45 min) and redispersed in double distilled water till pH of 7.

2.2. Ion exchange of nanosized faujasite (Gd-FAU) type zeolites

The purified zeolite suspensions (pH = 7) were ion exchanged with gadolinium (III) nitrate hexahydrate ($\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). 25 ml of $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 mM) were added to 5 ml Na-FAU suspension (2.5%). The suspensions were then kept under stirring at room temperature for 1 h and then washed by double distilled water. This procedure was repeated twice to obtain the suspensions of ion-exchanged gadolinium (Gd-FAU) nanosized zeolites; pH = 7.

2.3. Powder X-ray diffraction (XRD) analysis

Powder samples were measured using a PANalytical X'Pert Pro diffractometer with $\text{CuK}\alpha$ monochromatized radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). The samples were scanned in the range of $4\text{--}50^\circ 2\theta$ with a step size of 0.02° .

2.4. Transmission electron microscopy (TEM)

The crystal size, morphology and crystallinity of samples were analyzed by a transmission electron microscopy (TEM) using a JEOL 2010 FEG and a FEI LaB6 TECNAI G2 30UT operated at 200 kV and 300 kV, respectively. Energy Dispersive Spectrometer (EDS) coupled with both microscopes was employed to analyze the chemical content of the zeolite nanocrystals.

2.5. Dynamic light scattering (DLS) and zeta potential analysis

The hydrodynamic diameter of nanosized zeolites in water was

quantified through the use of Malvern Zetasizer Nano. The quantifications were carried out on samples after purification with a solid concentration of 1 wt%. Furthermore, the surface charge of nanosized zeolite was examined by assessing the zeta potential value of the same suspensions.

2.6. N_2 sorption analysis

N_2 adsorption/desorption isotherms were evaluated by Micrometrics ASAP 2020 volumetric adsorption analyzer. Samples were degassed at 250°C under vacuum overnight before the evaluation. The external surface area and micropore volume were assessed by alpha-plot method using Silica-1000 ($22.1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ assumed) as a reference. The micropore and mesopore size distributions of solids were extracted from adsorption branch by the Nonlocal Density Functional Theory (NLDFT) and from the desorption branch using the Barret-Joyner-Halenda (BJH) algorithm, respectively.

2.7. In-situ adsorption of CO_2 and O_2 on nanosized zeolites

Powder samples of Na-FAU and Gd-FAU were pressed ($\sim 10^7 \text{ Pa}$) into self-supported disks (2 cm^2 area, 20 mg cm^{-2}). Fourier-transform infrared (FTIR) spectra were acquired using a Nicolet 6700 IR spectrometer equipped with a mercury cadmium telluride (MCT) detector and an extended KBr beam splitter. Spectra were recorded in the $400\text{--}5500 \text{ cm}^{-1}$ range at 4 cm^{-1} with 128 scans. The *in situ* was evacuated or flooded with different gases and also heated up to 577°C . The samples were activated at 225°C for 2 h under vacuum. Various amounts of CO_2 (at 25°C) or O_2 (at -196°C) were incorporated into the cell and maintained in equilibrium for 5 min at the corresponding temperatures before recording each spectrum. The *in situ* IR measurements were performed with pure CO_2 up to 4 Torr and pure O_2 up to 100 Torr. Small doses of these gases were introduced progressively, and saturation was achieved after loading $\sim 50\%$ of the specified quantities. The measurements with carbogen (5% CO_2 , 95% O_2) were performed at 80–100 Torr, thus ensuring the presence of higher O_2 and CO_2 quantities than those required to achieve saturation upon adsorbing the gases in pure form. All the spectra were normalized to the sample's mass and plotted as absorbance per gram over the wavelength.

2.8. Chemical analyses

The chemical composition of as prepared and ion-exchanged zeolites was determined by inductively coupled plasma (ICP) optical emission spectroscopy using a Varian ICP-OES 720-ES.

2.9. Loading of gases in zeolite nanocrystals

Na-FAU and Gd-FAU were loaded with CO_2 and/or O_2 by bubbling of the desired gas into the zeolite suspensions with a flow rate of 80 ml/min for 30 min.

2.10. Analysis of oxygen release in aqueous and hypoxic conditions

A hypoxia workstation (IN VIVO2 500, 3 M) was employed to reach a steady and precise gas content of the atmosphere by replacing O_2 by nitrogen. Phosphate buffered saline (PBS) solution was equilibrated with the gas mix of the hypoxia workstation 1 h before the experiment. A closed reaction vessel containing 12 ml of equilibrated PBS at 37°C was used, and a dissolved oxygen sensor (SevenGo (Duo) proTM/OptiOxTM, Mettler Toledo) was positioned inside the hypoxia chamber. Before any test, baseline was determined by quantifying the oxygen saturation for 30 min in the PBS solution within the vessel. Zeolites nanocrystals were then added to system (500 μl , 1 wt%) and oxygen dissolved in the PBS solution was quantified continuously for 1 h. The oxygen liberation capacity of as prepared and ion-exchanged nanosized zeolites was

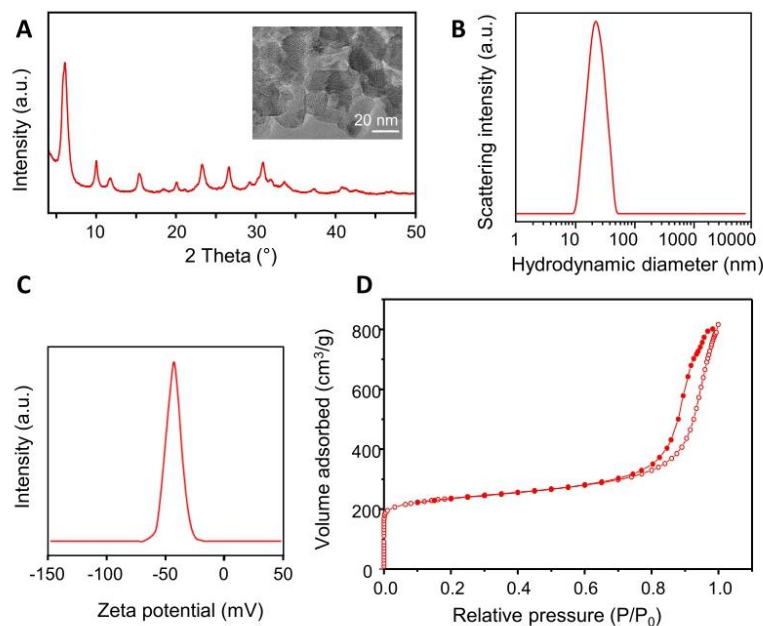


Fig. 1. Main physicochemical properties of zeolite nanocrystals. (A) XRD patterns (Inset: TEM pictures). (B) Dynamic Light Scattering (DLS) curves. (C) Zeta potential curves. (D) Nitrogen adsorption/desorption isotherms (full symbols refer to adsorption, open symbols refer to desorption).

compared to oxygen-saturated water (used as control). The oxygen release ability of Na-FAU zeolites nanocrystals was assessed at several levels of O_2 (21, 5, 1 and 0.1% of O_2). To discriminate the amount of O_2 provided by the nanosized zeolites from the oxygen contained in the dispersing solution (pure water), the values were subtracted from those of saturated water alone.

2.11. Cell culture

The U87-MG human glioblastoma cell line (ATCC, Manassas, VA, USA), HEK 293 cells (Human Embryonic Kidney cells, ATCC) and bEnd.3 (mouse brain endothelial cells, ATCC) were employed. Cells were maintained in DMEM (Sigma-Aldrich, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, France), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich, France) and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, France). Cells were kept in culture at 37 °C with 5% CO_2 and 95% humidity.

Primary culture of cortical neurons, from E15–E16 mouse embryos (Swiss mice; CURB, France) and astrocytes, obtained from neonatal (1 to 3-day-old) mice (Swiss, CURB, France) were prepared as previously described [29].

2.12. Cells exposure to zeolite nanocrystals

Cells were exposed to zeolites (Na-FAU and Gd-FAU) during 48 h. Nanosized zeolites were added into the wells at a final concentration of 1, 10, 50 or 100 $\mu\text{g/ml}$ and. Distilled water was used as reference tests.

2.13. Analysis of cell viability

Cells were seeded in 24-wells plates before adding zeolites. The viability of the cells was measured 48 h following the treatment with

zeolites nanoparticles using the WST-1 assay (Roche, France).

2.14. Analysis of cell cycle

The cell cycle of U87-MG and HEK 293 was analyzed using flow cytometry at several time points after cell treatment with 100 $\mu\text{g/ml}$ zeolite nanoparticles. was determined (Beckman Coulter's Gallios flow cytometer, Beckman Coulter SAS, France). The cell distribution in a given phase of cell cycle was determined using propidium iodide labelling and analyzed through the use of the Kaluza software.

2.15. Analysis of genotoxicity

Cells were placed in 24-well plates on coverslips and then exposed to 100 $\mu\text{g/ml}$ of nanosized zeolites during 14, 24 or 48 h. Cells irradiated with X-rays (4 Gy, XRad225Cx, PXi) were used as a positive control. Cells were thereafter fixed in 4% PFA during 1 h at 4 °C. Immunohistochemistry staining of phospho-histone H2AX and micronuclei was performed as previously described [30]. The following primary antibodies were used: phospho-histone H2AX (ser139) (1/200; Cell Signaling Technology, D175, 2577S) and Alexa-555-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1/200; Molecular Probes, A21429). Pictures were acquired on a Leica DMi8 microscope.

2.16. Animal studies

All animal studies were performed according to European directive (2010/63/EU) and approved by the Ethics committee (agreement numbers: 12,727 and N/02-12-11/25/12–14). The animals were purchased from the Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB, A14118015, France). Athymic *nude* rats (250–300 g) were housed in specific pathogen free cages and were fed with γ -irradiated laboratory

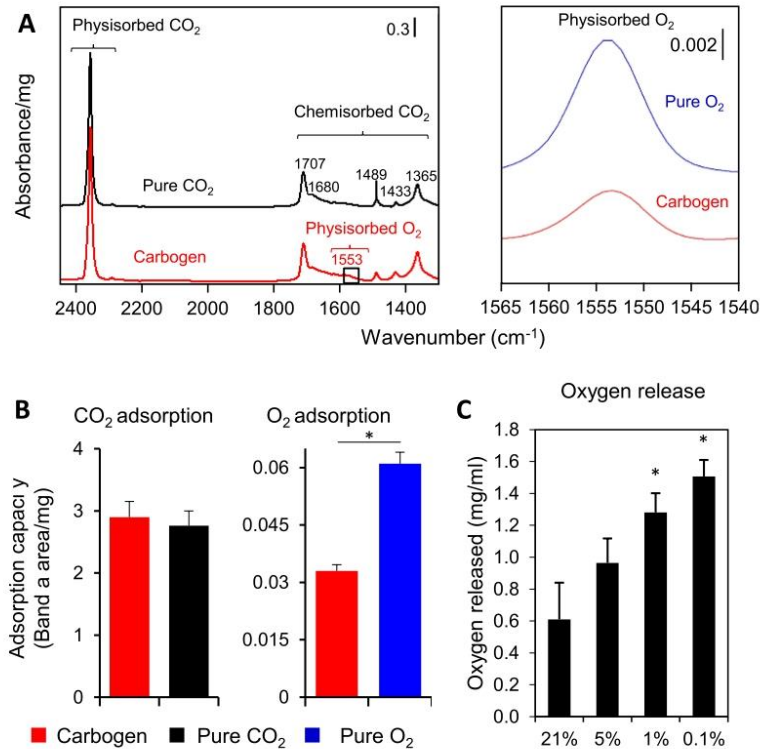


Fig. 2. Nanosized zeolites are able to adsorb and release gases. (A) FTIR spectra of physisorbed and chemisorbed CO₂ under delivery of carbogen and pure CO₂ and physisorbed oxygen under delivery of carbogen and pure O₂ on Na-FAU zeolites. (B) Adsorption capacity of CO₂ using carbogen or pure CO₂ and O₂ using carbogen or pure O₂ (*p < 0.05) Mean ± s.d., n = 3/condition. (C) Quantification of oxygen released from zeolites in aqueous solution (phosphate buffered saline) (*p < 0.05 vs 21%). Mean ± s.d., n = 3/condition.

food. Three marmosets (*Callithrix jacchus*, 285–370 g; aged 36–64 months) were employed. Data are reported according to ARRIVE guidelines.

All experimentations were performed on anesthetized animals (isoflurane 1.5–2%; N₂O/O₂70/30%).

2.17. Delivery of zeolite nanocrystals

Na-FAU or Gd-FAU nanosized zeolites (100 µl, 1 wt%) or distilled water were daily injected intraperitoneally in Swiss mice during 5 consecutive days. The body weight of the animals was quantified daily during 1 month.

CO₂-loaded Gd-FAU zeolites (300 µl, 1 wt%) or distilled water were administered i. v. to Wistar rats (CURB, A14118015, France) and arterial blood samples were taken each 5 min to measure CO₂ partial pressure and the pH (RapidLab 348 analyzer; Siemens, Germany).

2.18. Glioblastoma model

The model of GBM used was previously described [31]. Briefly, U87-MG cells (5.10⁴ cells in 3 µl PBS-glutamine 2 mM) were implanted in the striatum of nude rats.

2.19. MRI studies

All the MRI examinations were performed on a 7 T horizontal magnet (Bruker, Ettlingen). In order to quantify the volume of the tumor, T2-

weighted MRI examinations were completed once a week according to the following parameters (RARE, acceleration factor of 8; TR/TE_{eff} = 5000/62.5 msec; number of experiments (NEX) = 2; 20 contiguous slices; resolution = 0.15 × 0.15 × 0.5 mm³). Tumor volumes were calculated using ImageJ.

To track Gd-FAU nanosized zeolites, T1w-FLASH images (TR = 500 ms, TE_{eff} = 10.32 ms; NEX = 1; 10 slices; resolution = 0.15 × 0.15 × 1.5 mm³) were acquired before and every 2 min after the intravenous injection of 300 µl Gd-FAU zeolite suspension (1 wt%) to tumor bearing rats.

In order to quantify the fractional cerebral blood volume (fCBV), P904® (200 µmol kg⁻¹, Guerbet Research) was used as a contrast agent as previously described [9]. fCBV was calculated before and every 5 min during 1 h following an intravenous administration of 300 µl of gas loaded Gd-FAU (1 wt%). Image analyses were performed through the use of ImageJ software [9].

To measure oxygen saturation (SatO₂) in the brain tissue, we used the BOLD-MRI approach described in our previous article [9]. SatO₂ maps before and after administration of gas loaded Gd-FAU zeolites were obtained in every rat.

2.20. Statistical analyses

Data are expressed as mean ± s.d. Statistical analyses were carried out with JMP programs (SAS Institute) and are detailed in each caption.

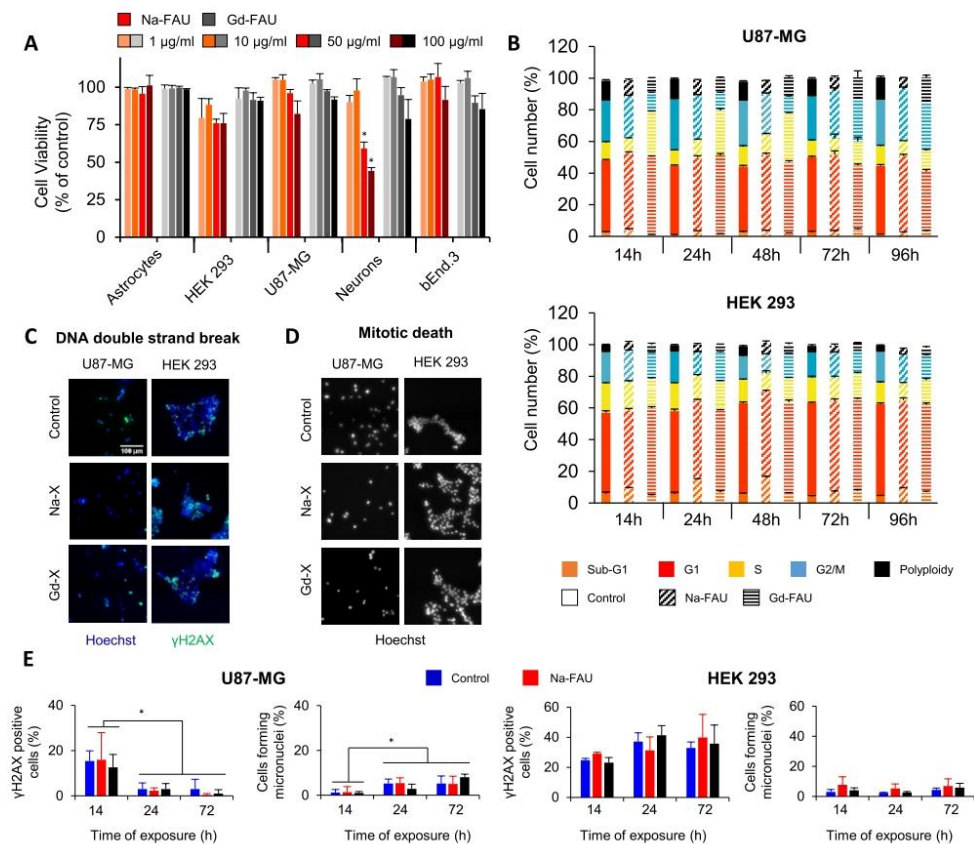


Fig. 3. Zeolite nanocrystals display no sign of toxicity *in vitro*. (A) Astrocytes, neurons, U87-MG, HEK 293 and bEnd.3 cells viability following a 48 h exposure to nanosized zeolites. Mean \pm s.d., $n = 3$ /condition ($^*p < 0.05$ vs control; ANOVA and HSD Tuckey). (B) Cell cycle analysis by flow cytometry. Quantification of U87-MG and HEK 293 cells distribution in different phases of cell cycle after different times of exposure to 100 µg/ml of zeolites or water as a control. Mean \pm s.d., $n = 3$ /time point. (C, D) Representative photographs of DNA double-strand breaks identified with γ H2AX immunostaining (C) and micronuclei formation identified with Hoechst 33,342 staining (D) on U87-MG and HEK 293 cells, 14 h after exposure to 100 µg/ml of zeolites. (E) Quantification after 14, 24 or 72 h exposure to 100 µg/ml of zeolites. Mean \pm s.d., $n = 3$ /condition ($^*p < 0.001$; ANOVA and HSD Tuckey).

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical characterizations of nanosized zeolites

The main physicochemical properties of Na-FAU zeolite nanocrystals are presented in Fig. 1 and Tables S1 and S2. Powder X-ray diffraction (XRD) patterns of the zeolite samples contain broad peaks reflecting the small particle size and typical Bragg peaks corresponding to FAU-type zeolite (Fig. 1A). As quantified by DLS, the nanosized zeolites have an average size of 15–20 nm in water suspension with a concentration of 1% (Fig. 1B). The zeta potential (ζ) of the zeolite nanocrystals in water suspension is -43 to -45 mV, which corresponds to highly stable negatively surface charged crystals (Fig. 1C). Porosity of zeolite nanoparticles was analyzed by N_2 sorption approach (Fig. 1D and Table S2). The data show type I isotherm at low P/P_0 , indicative of microporous materials and high adsorption uptake at $P/P_0 > 0.8$. This shows the high textural mesoporosity of closely packed zeolite nanoparticles with similar particle dimensions.

Na-FAU zeolites with a large supercage (1.1 nm) have been reported as gas carriers [32] and drug delivery systems [22,33]. The adsorption of pure O_2 , pure CO_2 and carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) was examined. The physisorbed O_2 and physisorbed and chemisorbed CO_2 in zeolites were assessed by *in-situ* IR spectroscopy following the incorporation of precise amounts of the desired gases into the zeolite samples (Fig. 2A). Following the addition of carbogen, the intensity of the band at 2346 cm^{-1} corresponding to the physisorbed CO_2 (Table S3) is similar to that of pure CO_2 (see the experimental section), indicating that the presence of O_2 does not substantially influence the capacity of Na-FAU towards CO_2 . On the other hand, the intensity of physisorbed O_2 is lowered by 50% upon using carbogen for loading of zeolites (Fig. 2B). These results suggest that in the presence of carbogen (O_2 and CO_2), a competition of the two gases on the available cationic sites takes place. The band area corresponding to the adsorbed O_2 decreased which may be related, at least in part, to the low sensitivity of the IR. While the band area corresponding to the adsorbed CO_2 from the pure gas and carbogen is similar due to the same concentration delivered to the sample (see

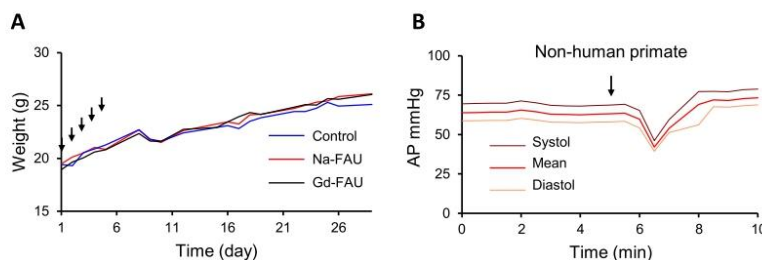


Fig. 4. Evaluation of toxicity of nanosized zeolites *in vivo*. (A) Weight curves of mice following intraperitoneal injections of Na-FAU and Gd-FAU zeolites or water as a control during 5 consecutive days (represented with arrows). Mean, 4 mice per group. (B) Arterial pressure (AP) of a marmoset after i. v. injection of nanosized Gd-FAU zeolite carrying CO₂ (arrow indicates the time of injection). Representative example from 3 independent experiments.

experimental section). Additionally, our theoretical studies showed that a strong affinity of FAU-type zeolites towards O₂, even in the presence of CO₂, is expected [34].

The capacity of zeolites to release the oxygen payload was analyzed in aqueous solutions preliminary equilibrated at various O₂ concentrations in a hypoxic workstation to mimic the oxygen gradients observed in the organism [35] and tumors [36] (Fig. S1). 5 mg of oxygen-loaded Na-FAU were introduced in the system and the evolution of oxygen concentration was recorded (Fig. 2C). Interestingly, the quantity of O₂ released from the Na-FAU zeolites increased as the initial O₂ concentration in the system decreased. Indeed, when the oxygen concentration in the workstation was set at 21%, the oxygen release was 0.6 ± 0.23 mg/ml. When the O₂ concentration was set at 5% (which corresponds to the percentage of O₂ measured in the healthy brain [35]), the release increased to 0.96 ± 0.15 mg/ml. Further, the oxygen release continued increasing to 1.28 ± 0.12 and to 1.5 ± 0.10 mg/ml at 1% and 0.1% of oxygen in the workstation. These oxygen concentrations were chosen to mimic the area of severe hypoxia found in some regions of GBM [36]. More precisely, at 0.1% O₂, addition of 5 mg of Na-FAU zeolite to the system resulted in the delivery of 0.26 mg of oxygen per ml (value deducted from water alone). Based on these experimental results, we calculated that Na-FAU zeolites can transport approximately 19 mmol of O₂/g. To compare with other products developed to deliver oxygen, for example the HEMOXYCarrier®, a natural giant extracellular haemoglobin from polychaete annelids [37] and the Polymer Hollow Microparticles [16] can transport 0.0433 mmol and 0.511 mmol of O₂/g respectively. These experimental results suggest that the lower the external O₂ concentration is, the more zeolites release their O₂ payload. This result reinforces the idea that they could be appropriate gas carriers (CO₂ and/or O₂) to reduce hypoxia in the most hypoxic regions of the tumor.

3.2. Evaluation of nanosized zeolites toxicity *in vitro*

Several cell types originating from many organs were exposed to zeolite suspensions with concentrations ranging from 1 to 100 µg/ml for 48 h (Fig. 3A). DLS analyses of the nanosized zeolites in serum show no aggregation of the nanoparticles (Fig. S2A). In addition, we conducted further experiments in order to address the stability of zeolites in serum but also in conditions used to mimic tumor microenvironment (pH = 6.8). Zeolites were diluted at a concentration of 1% in serum and in saline and stored at 37 °C for 9 days. The results are presented in Fig. S2B. The aspect of the samples did not change with time, no sedimentation was observed, which confirms their stability in these milieus.

U87-MG and primary cell cultures of brain origin were employed to address potential toxicities to the brain tumor and to the surrounding brain cells. We also used an endothelial cell line (bEnd.3) and a kidney cell line (HEK 293) as a reflection of possible systemic toxicities after

intravenous injections. No significant toxicity was found for all cell lines and astrocytes (Fig. 3A). Neurons seemed to be the most sensitive as the maximal loss in cell viability ($65.8 \pm 2.1\%$) was encountered at the concentration of 100 µg/ml of Na-FAU (Fig. 3A). The introduction of Gd in the zeolite nanocrystals decreased the toxicity to neurons. This may be attributed to the affinity of Na-FAU for calcium in ion exchange process. In neurons' cytosol, it could compete with the neuronal calcium signaling and calcium regulation. When Gd is present in zeolites, the exchange with calcium would be lower, resulting in the reduction of the toxicity. Another explanation would be that the activation of Na/K ATPase in the presence of Na-FAU may enhance potential excitotoxicity processes. To further reinforce this study, the cell cycle was analyzed on U87-MG and HEK 293 by flow cytometry. No difference in the cell distribution at different phases of cell cycle between the control group and cells exposed to nanosized zeolites was observed (Fig. 3B).

Some reports show, *in vitro*, a genotoxicity of certain types of NP (with a comparable size of about 30 nm) although devoid of cytotoxicity [38]. Therefore, a possible genotoxic action of nanosized zeolites was explored using γH2AX as a marker of DNA double strand breaks and a micronucleus formation assay as a marker of mitotic death. No difference in U87-MG γH2AX positive cells was observed between control conditions and after exposure to Na-FAU. A slight reduction was observed in the marker after 24 h of experiment in all experimental settings. HEK 293 cells showed a higher number of γH2AX positive cells in comparison to the U87-MG cells, and the rate of γH2AX labelled cells was slightly higher at 24 h and 72 h of exposure. Nevertheless, no difference in the percentage of γH2AX positive cells after exposure to nanosized zeolites compared to the control condition was detected (Fig. 3C, E). These findings are also strengthened by the assessment of micronuclei formation. For HEK 293 and U87-MG cells, the amount of cells with micronuclei was less than 10% and was not modified through the time. Moreover, exposure of the cells to the nanosized zeolites did not change the formation of micronuclei. In addition, we found that the presence of Gd did not induce any further toxicity relative to the original Na-FAU zeolites nor further DNA damage (Fig. 3D and E). Overall, the data indicate that, *in vitro*, nanosized zeolite crystals are devoid of cytotoxicity and genotoxicity on a wide range of cell types.

3.3. Evaluation of toxicity of nanosized zeolites in living animals

Although nanoparticles are promising for several clinical applications, their toxicity for living organisms is still a crucial issue. To evaluate the potential adverse actions associated with administrations of nanosized zeolites, studies were performed *in vivo*. First, nanosized zeolites were injected into mice during five successive days, for a total dose of 5 mg per mouse (Fig. 4A). The body weight curves of mice did not change in comparison to controls. Irrespective of the group and as expected, mice gained 7 g (37% of their initial weight) during the time of

Table 1
Effects of Na-FAU zeolites on the marmoset.

Hematology	Baseline Day (-7)	Injection Day (0)	One week after injection Day (+7)	Range [reference]
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	5.1	5.8	5	4.8–8.6 [47]
Hemoglobin (g %)	11.7	13.7	10.9	10.5–19.6 [47]
Hematocrit (%)	38.7	44.3	37.5	30–6 [47]
Platelets ($\times 10^9/\text{mm}^3$)	560	680	610	490 [47]
Monocytes (%)	1.7	0.4	1.2	0–1 [47]
Eosinophiles (%)	0.4	0.6	0.7	0–5 [47]
Biochemistry	Baseline Day (-7)	Injection Day (0)	One week after injection Day (+7)	Range [reference]
Creatinine (mg/L)	8.3	5.5	5	0.4–11.1 [48]
Transaminase GOT/ASAT (UI/L)	68	85	89	12–228.9 [48]

the experiment, suggesting no adverse effects of nanosized zeolites on mice.

Though rodent models are helpful to understand the pathophysiology and test treatments of human diseases, more pertinent animal models are necessary to reflect the adverse reactions that might be displayed in humans. Chiarelli and colleagues proved the importance of employing both rodents and non-human primates for better assessment of the safety of NP [39].

In order to confirm the low toxicity of the nanosized zeolites, the nanosized zeolite suspension (300 μL , 1 wt%) was injected intravenously to non-human primates (marmoset), and physiological parameters were monitored. A slight decrease in arterial pressure was observed following the injection, from 63 mmHg to 42 mmHg, nevertheless, it was fully reversed in less than 2 min (Fig. 4B). In addition, blood samples were taken from marmosets. A representative blood analysis is represented for one marmoset (14 years old, male, 350 g) to follow the effects of Na-FAU on blood counts, kidney and liver health of the animal. In order to have general view about the health of animal, whole blood was tested one week before injection (Day -7). Same parameters were tested 1 h after injection (Day 0) and one week after injection (Day +7) and are summarized in Table 1.

RBC, hemoglobin, hematocrit and platelets values stayed in the normal range during the course of the experiment. Although the

measurements of monocytes and eosinophils were found to be in the normal range, the recorded values were close to lower boundary. We observed a slight increase in the number of basophils which may indicate mild allergic reactions. Creatinine and ASAT are commonly measured clinically as part of diagnostic renal and liver function tests respectively. Creatinine concentration along two weeks may show that Na-FAU zeolites have been filtrated/cleared through kidneys. The amount of transaminase also remained in the normal range. Overall, these results clearly demonstrate the absence of acute and chronic toxicity of zeolites nanocrystals applied to living animals.

3.4. Post-synthesis modifications of nanosized zeolites and in vivo tracking of nanosized zeolites in healthy and tumor bearing rats

We introduced low amount of extra framework gadolinium to track the particles with ICP-MS and MRI. ICP-MS analysis showed that the ion-exchange process resulted in incorporation of 1.24 wt% of Gd in zeolites (Gd-FAU) (Table S1). The presence of Gd did not induce any remarkable change in the crystal properties including size, shape, porosity and surface charge (Fig. S3). Typical Bragg peaks corresponding to FAU-type zeolite are fully preserved after ion exchange treatment (Fig. S3A). The introduction of cations into zeolites was used to track their ability to reach the brain tumor after intravenous injection using MRI. Gd-containing zeolites were already examined as MRI contrast agents and showed no leakage of Gd outside the framework [27]. First, a Gd-FAU zeolite suspension was injected intravenously in healthy rats and blood samples were then taken at various times thereafter. Quantification of Gd-FAU zeolites in the blood was performed through the characterization of gadolinium content with ICP-MS. The blood half-life of Gd-FAU was calculated to be 12 min (Fig. 5A).

Gd-FAU zeolites were then used to assess whether nanosized zeolites can extravasate into the brain tumors after intravenous injection. An earlier study reported that nanosized zeolites are expected to extravasate and accumulate in the tumor tissue, although they should not cross the intact blood-brain barrier [40]. To verify this assumption, dynamic T1-weighted MRI was employed to examine the distribution of zeolite nanocrystals in the brain after their intravenous administration. A hyper-signal was observed specifically inside the tumor (Fig. 5B, C, Fig. S4, and supplementary movie (Movie S1)) while no change was observed in the healthy brain. The comparison between the T1-w images acquired before and after the injection of zeolites confirms that the zeolite nanocrystals efficiently reached the tumor and not the surrounding healthy tissue (Fig. 5B). The maximum increase in the signal

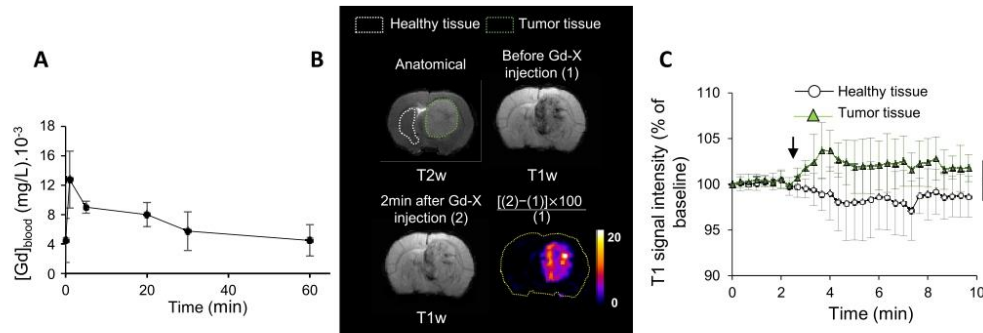


Fig. 5. Bio-distribution of nanosized zeolites in rats. (A) Quantification of gadolinium content in the blood versus time after i. v. injection of Gd-FAU (300 μL , 1 wt %). Mean \pm s.d., 4 independent experiments. (B) Representative T1-w images acquired before (1) or 2 min after (2) i. v. administration of Gd-FAU (300 μL , 1 wt%); T2w image (left) and a map of the differences between the two T1w images (right). (C) Quantification of the normalized T1w signal intensity in the healthy and the tumor tissue. Baseline is the measurement of T1w signal carried out before injection and arrow refers to the time of injection. Mean \pm s.d., 5 independent experiments. ($^*p < 0.0001$; two-way ANOVA). See also the video in Supplementary Information (Movie S1).

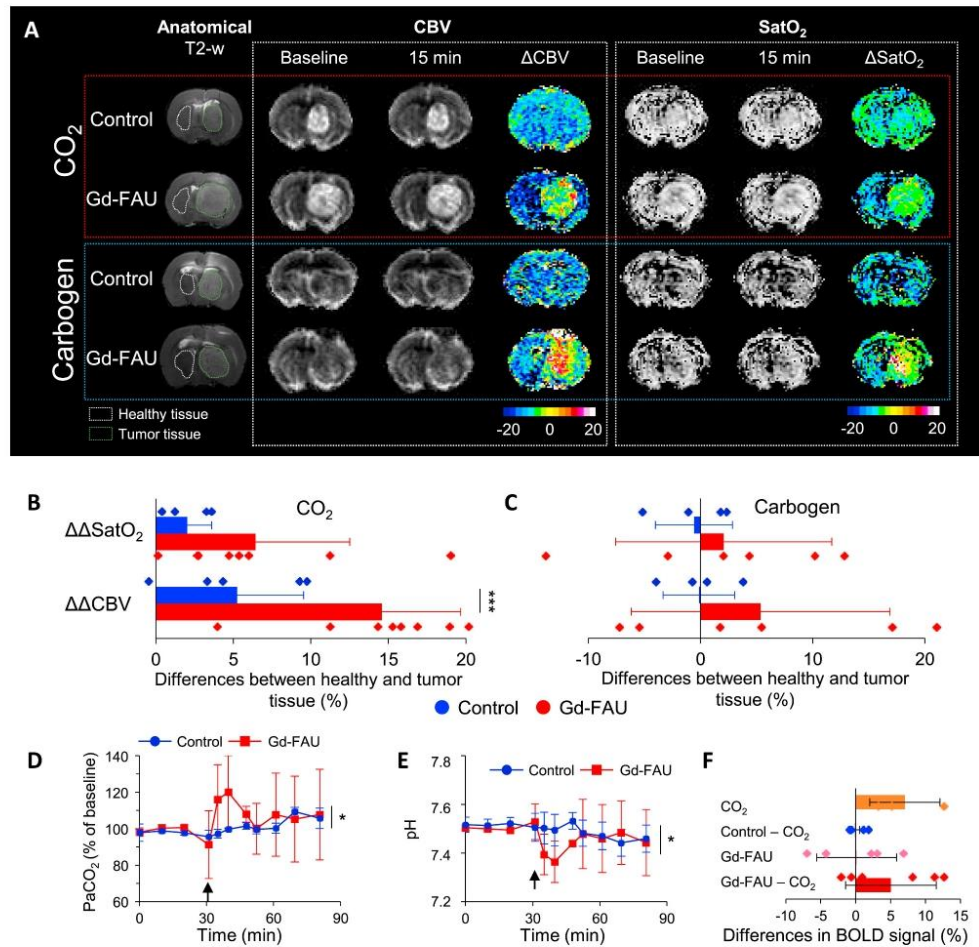


Fig. 6. Nanosized zeolites carrying hyperoxic gases influence CBV and SatO_2 in the tumour. (A) Representative T2-w anatomic images, CBV and SatO_2 maps obtained before and 15 min after i. v. injection of nanosized Gd-FAU zeolite (300 μl , 1 wt%) carrying CO_2 or carbogen and the corresponding differences between the two maps (ΔCBV and ΔSatO_2 , respectively). Control consisted of injection of H_2O saturated with CO_2 or carbogen. (B) and (C) Quantification of the differences of ΔCBV and ΔSatO_2 (%) between the healthy and the tumor tissue ($\Delta\Delta\text{CBV}$ and $\Delta\Delta\text{SatO}_2$, respectively). Mean \pm s.d., $n = 5$ for control group; $n = 8$ for Gd-FAU with CO_2 group; $n = 5$ for Gd-FAU with carbogen group (** $p < 0.001$; ANOVA). (D) Evolution of the arterial pressure of CO_2 (PaCO_2) expressed in percentage of baseline and (E) pH in the blood of healthy Wistar rats following injection of Gd-FAU (300 μl , 1 wt%) carrying CO_2 or control. Baseline refers to measurement of PaCO_2 performed before injection and arrow indicates the time of injection. Mean \pm s.d., $n = 5$ per group (* $p < 0.05$; two-way ANOVA). (F) Differences in Blood Oxygen Level Dependent (BOLD) signal measured in the venous sinus of healthy Wistar rats before and 3 min after an i. v. injection of Gd-FAU (300 μl , 1 wt%) carrying CO_2 , or control or Gd-X without CO_2 or breathing of 5% of CO_2 . Mean \pm s.d., $n = 6$ for Gd-FAU - CO_2 group; $n = 5$ for Gd-FAU group; $n = 4$ for control - CO_2 group; $n = 3$ for inhalation of 5% CO_2 group.

was seen 100 s after the administration of zeolites (Fig. 5C). These results confirmed the precise transfer of the zeolite nanocrystals in the tumor, thus they could be evaluated as a carrier to deliver hypercapnic/hyperoxic gases.

3.5. Nanosized zeolites as gas carriers to specifically reoxygenate brain tumors

Multiparametric MRI was employed in a human GBM model to assess the functional benefits of nanosized zeolites as gas (CO_2 and O_2) carriers.

Furthermore, the incorporation of gadolinium into zeolites did not modify their capacity to adsorb O_2 (Fig. S5A). Likewise, Gd-FAU zeolites retained their ability to adsorb CO_2 , while in a lower amount (3.98–2.28 and 3.79 to 1.36 band area/g for physisorbed and chemisorbed CO_2 respectively, Fig. S5B).

Variations in cerebral blood volume (CBV) following an intravenous administration of zeolites loaded with CO_2 was measured and expressed as ΔCBV . Findings showed an augmentation of the CBV inside the tumor relative to the non-tumoral tissue (Fig. 6A and B), leading to a difference of 15% between the two tissues at 15 min following the injection. When

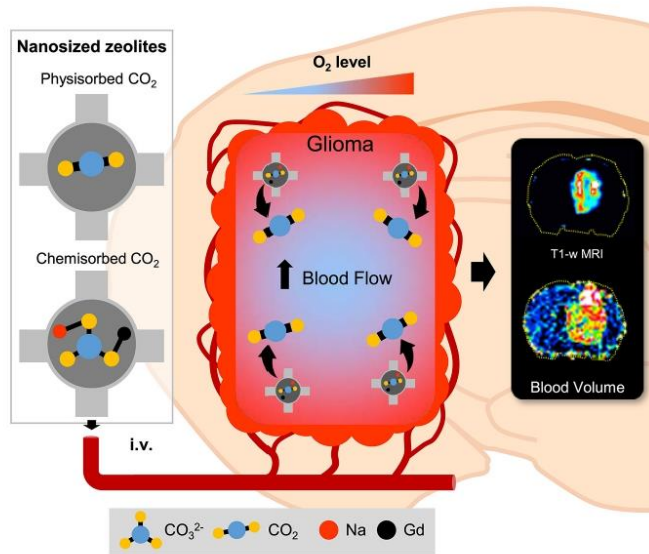


Fig. 7. Nanosized zeolites are used as a specific hyperoxic gases carrier, in which they act as a vasoactive agent to increase both the blood and the oxygen supply for reoxygenation of glioblastoma. Nanosized zeolites do not cross the intact blood brain barrier, resulting in an increase in cerebral blood volume/oxygenation specifically in the tumor as compared to the healthy brain. Moreover, Gd cations introduced in the zeolite nanoparticles enable the tracking of the particles into the tumor.

water saturated with CO₂ was used as a reference, a maximum difference of 5% of the CBV in the tumor compared to the healthy tissue was quantified (Fig. 6A and B). Upon switching the pure CO₂ with carbogen into Gd-FAU for concurrently targeting the CBV and the tissue oxygenation, the difference of signal measured between the healthy and tumor tissues was 5.36% (Fig. 6A, C). These results indicate that nanosized zeolites loaded with dilatator gases induce vasodilatation specifically within the tumor. This contrast with our earlier investigations in which inhalation of carbogen induced a CBV increase in the healthy brain but not in the tumor [9].

The SatO₂-MRI, an imaging technique reported to precisely assess tissue hypoxia [41], was used before and after administration of the zeolites loaded with CO₂ or carbogen (Δ SatO₂). The re-oxygenation of the tumor in comparison to the healthy tissue ($\Delta\Delta$ SatO₂) was quantified (Fig. 6A, B, C). The intravenous delivery of zeolites carrying CO₂ and carbogen increased $\Delta\Delta$ SatO₂ of 6.43% and 2.07%, respectively. A further control was made by injecting zeolites (300 μ l, 1 wt%) without gas loading. No augmentation of CBV or SatO₂ was found, indicating that the modifications are due to the transported gas and not to the nanosized zeolites *per se* (Fig. S6). Furthermore, when CBV and SatO₂-MRI were quantified 1 h after injection, the selective enhancement of CBV and SatO₂ within the tumor relative to the healthy tissue was still observed.

The lower effect observed with carbogen suggest that the primary effect is an increased perfusion via vasodilatory effects of CO₂ and not reoxygenation via oxygen delivery. However, the U87 GBM model used here is moderately hypoxic [31,42]. Fig. 2C shows that the delivery of oxygen by zeolites is dependent on the oxygen pressure of the environment. Therefore, the relatively high oxygen pressure in the U87-MG tumor could prevent the zeolites from releasing their oxygen payload.

We lastly evaluated if any release of CO₂ could also take place in the systemic circulation by monitoring the arterial partial pressure of CO₂ (PaCO₂) following the intravenous administration of the Gd-FAU loaded with CO₂ (Fig. 6D). The PaCO₂ displayed a 4 mmHg increase at 10 min following the injection of CO₂-loaded zeolites (Fig. 5A), paralleled by a minor acidification, i.e., the pH decreased from 7.53 to 7.36 (Fig. 6E). These modifications were not observed when the control sample was

used. The augmentation of the PaCO₂ could lead to a vasodilation. Therefore, dynamic BOLD-MRI was achieved to follow the variations of blood flow of large vessels, such as the venous sinus. The intravenous administration of nanosized zeolites loaded with CO₂ induced an enhancement of the BOLD signal up to $5.05 \pm 6.50\%$ as did inhalation of 5% CO₂. Administration of control sample or pure nanosized zeolites without CO₂ did not change the BOLD signal (Fig. 6F). These data demonstrate that nanosized zeolites are able to carry CO₂ or carbogen and enhance blood volume and oxygenation specifically within the tumor.

4. Conclusions

The use of functional nanoparticles has dramatically increased during the last years in the management of tumors [43,44]. In the present study, the use of nanosized zeolite particles as a specific gas carrier for glioblastoma was studied. Additionally, thanks to the presence of Gd into zeolite nanoparticles, enabling MRI tracking, the specific accumulation of nanosized zeolites in the tumor was evidenced. The nanosized zeolites loaded with CO₂ or carbogen (95% O₂ and 5% CO₂) successfully increased the blood volume and oxygenation in the tumor tissue relative to the healthy tissue (Fig. 7).

No clinical study that evaluated targeted administration of hyperoxic/hypercapnic in glioblastoma is available. A clinical investigation has suggested that hyperbaric oxygen therapy (HBOT) may improve the efficacy of radio-chemotherapy to some extent [45]. In clinical trials, although it showed some positive results in certain types of cancer (e.g. head & neck), carbogen inhalation resulted in unsatisfactory outcomes for GBM patients [7,8]. In our previous study [9], we showed that inhalation of carbogen increased cerebral blood flow in the healthy tissue at the expense of the tumor, a phenomenon that can be attributed to the flow steal phenomenon and argues for the importance of vectorization of hyperoxic/hypercapnic gases to specifically target the tumor using zeolites. The specific delivery of hyperoxic gases has been suggested using micronsized particles [16] but their use to alleviate hypoxia in brain tumors is not satisfactory because of their large diameter disabling any entry into the tumor. The use of perfluorochemicals has

also been recently discussed [46] but this strategy has not been applied to GBM.

In addition, the results from our study show that the amount of oxygen released from the zeolites is higher as the external oxygen pressure is low. Interestingly, it can be assumed that in an organism, the zeolite would keep its oxygen payload until it reaches a hypoxic region, like in GBM, where they would release the oxygen. In addition, the incorporation of other cations may improve the ability of zeolites to carry more oxygen.

Zeolites are alternative nanoparticles designed for delivery of oxygen. In addition to their stability, one of the main advantages of zeolites is their versatility. By adjusting their physicochemical properties, it is possible to add new features, such as the incorporation of cations, used in the present study to image the particles *in vivo*. In addition, heavy atoms such as gadolinium can act as radiosensitizers [12], and this could be combined with the gas delivery in a context of radiotherapy treatment. Other studies reported on the incorporation of gamma-emitter such as $^{111}\text{In}^{3+}$ via ion exchange [20]. Nanosized zeolites have been used to encapsulate and deliver siRNA and chemotherapy agents, in particular temozolomide [22]. Functionalized zeolites with antibodies were also used to target cancer cells [23]. Nanosized zeolites could simultaneously gather many features to improve the diagnosis and treatment of GB. Another important advantage of nanozeolites is their stability and limited toxicity.

In summary, the great potential of nanosized zeolites for glioblastoma is envisioned. This paves the way for the use of carbogen-loaded or oxygen loaded Gd-containing zeolite nanocrystals to the tumor, as a carrier of (i) high-Z containing elements and (ii) re-oxygenating gases, which are known to increase the efficiency of radiotherapy.

After demonstrating that nanozeolites could be used to improve tumor oxygenation, further *in vivo* studies will be performed to address their efficacy together with conventional therapies used for glioblastoma.

CRedit authorship contribution statement

Clément Anfray: Investigation, Data curation, Conceptualization, Methodology, Writing - original draft. **Sarah Komaty:** Investigation. **Aurélien Corroyer-Dumont:** Investigation. **Moussa Zaarour:** Investigation. **Charly Helaine:** Investigation. **Hayriye Ozelik:** Investigation. **Clélia Allieux:** Investigation. **Jérôme Toutain:** Investigation. **Kamila Goldyn:** Investigation. **Edwige Petit:** Data curation. **Karim Bordji:** Conceptualization, Methodology. **Myriam Bernaudin:** Project administration. **Valentin Valtchev:** Data curation. **Omar Touzani:** Data curation, Conceptualization, Methodology, Writing - original draft. **Svetlana Mintova:** Investigation, Data curation, Conceptualization, Methodology, Writing - original draft. **Samuel Valable:** Investigation, Data curation, Conceptualization, Methodology, Writing - original draft.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by the Conseil Régional de Basse-Normandie (Projet Emergence ZEOXY), the European Union-Fonds Européen développement Régional (FEDER), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the University of Caen Normandy and the Institut National du Cancer (INCA 11699).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120249>.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120249>.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- [1] D.N. Louis, A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W. K. Cavenee, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, P. Kleihues, D.W. Ellison, The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary, *Acta Neuropathol.* 131 (2016) 803–820, <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- [2] O.L. Chinot, W. Wick, W. Mason, R. Henriksson, F. Saran, R. Nishikawa, A. F. Carpentier, K. Hoang-Xuan, P. Kavan, D. Cernea, A.A. Brandes, M. Hilton, L. Abrey, T. Cloughesy, Bevacizumab plus radiotherapy–temozolomide for newly diagnosed glioblastoma, *N. Engl. J. Med.* 370 (2014) 709–722, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308345>.
- [3] A. Chakhoyan, J.-S. Guillamo, S. Collet, F. Kauffmann, N. Delcroix, E. Lechapt-Zalcman, J.-M. Constans, E. Petit, E.T. MacKenzie, L. Barré, M. Bernaudin, O. Touzani, S. Valable, FMISO-PET-derived brain oxygen tension maps: application to glioblastoma and less aggressive gliomas, *Sci. Rep.* 7 (2017), <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08646-y>.
- [4] K.L. Eales, K.E.R. Hollinshead, D.A. Tennant, Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells, *Oncogenesis* 5 (2016), e190, <https://doi.org/10.1038/oncis.2015.50>.
- [5] W.R. Wilson, M.P. Hay, Targeting hypoxia in cancer therapy, *Nat. Rev. Canc.* 11 (2011) 393–410, <https://doi.org/10.1038/nrc3064>.
- [6] S.M. Evans, K.W. Jenkins, H.I. Chen, W.T. Jenkins, K.D. Judy, W.-T. Hwang, R. A. Lustig, A.R. Judkins, M.S. Grady, S.M. Hahn, C.J. Koch, The relationship among hypoxia, proliferation, and outcome in patients with de novo glioblastoma: a pilot study, *Transl Oncol* 3 (2010) 160–169.
- [7] J.H. Kaanders, J. Bussink, A.J. van der Kogel, ARCON: a novel biology-based approach in radiotherapy, *Lancet Oncol.* 3 (2002) 728–737, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(02\)00929-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00929-4).
- [8] R.W.M. van der Maazen, H.O.M. Thijssen, J.H.A.M. Kaanders, A. de Koster, A. Keyser, M.J.J. Prick, J.A. Grotenhuis, P. Wesseling, A.J. van der Kogel, Conventional radiotherapy combined with carbogen breathing and nicotinamide for malignant gliomas, *Radiother. Oncol.* 35 (1995) 118–122, [https://doi.org/10.1016/0167-8140\(95\)01534-N](https://doi.org/10.1016/0167-8140(95)01534-N).
- [9] A. Chakhoyan, A. Corroyer-Dumont, M.M. Leblond, A. Gérard, J. Toutain, L. Chazavie, D. Divoux, E. Petit, E.T. MacKenzie, F. Kauffmann, N. Delcroix, M. Bernaudin, O. Touzani, S. Valable, Carbogen-induced increases in tumor oxygenation depend on the vascular status of the tumor: a multiparametric MRI study in two rat glioblastoma models, *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* (2016), <https://doi.org/10.1177/0271678X16663947>.
- [10] H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging *in vivo*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 71–79, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.002>.
- [11] S.C. Baetke, T. Lammers, F. Kiessling, Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer, *Br. J. Radiol.* 88 (2015) 20150207, <https://doi.org/10.1259/bjr.20150207>.
- [12] S. Koth, A. Detappe, F. Lux, F. Appaix, E.L. Barbier, V.-L. Tran, M. Plissonneau, H. Gehan, F. Lefranc, C. Rodriguez-Lafrasse, C. Verry, R. Berbeco, O. Tillement, L. Sancey, Gadolinium-based nanoparticles and radiation therapy for multiple brain melanoma metastases: proof of concept before phase I trial, *Theranostics* 6 (2016) 418–427, <https://doi.org/10.7150/thno.14018>.
- [13] A.R. King, C.D. Corso, E.M. Chen, E. Song, P. Bongiorno, Z. Chen, R.K. Sundaram, R. S. Bindra, W.M. Saltzman, Local DNA repair inhibition for sustained radiosensitization of high-grade gliomas, *Mol. Canc. Therapeut.* 16 (2017) 1456–1469, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0788>.
- [14] J. Xie, Y. Yong, X. Dong, J. Du, Z. Guo, L. Gong, S. Zhu, G. Tian, S. Yu, Z. Gu, Y. Zhao, Therapeutic nanoparticles based on curcumin and bamboo charcoal nanoparticles for chemo-photothermal synergistic treatment of cancer and radioprotection of normal cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 14281–14291, <https://doi.org/10.1021/acsami.7b02622>.
- [15] Y. Sheng, H. Nesbitt, B. Callan, M.A. Taylor, M. Love, A.P. McHale, J.F. Callan, Oxygen generating nanoparticles for improved photodynamic therapy of hypoxic tumours, *J. Contr. Release* 264 (2017) 333–340, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.004>.
- [16] R.P. Seekell, A.T. Lock, Y. Peng, A.R. Cole, D.A. Perry, J.N. Kheir, B.D. Polizzotti, Oxygen delivery using engineered microparticles, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 113 (2016) 12380–12385, <https://doi.org/10.1073/pnas.1608438113>.
- [17] C. Anfray, B. Dong, S. Komaty, S. Mintova, S. Valable, Acute toxicity of silver free and encapsulated in nanosized zeolite for eukaryotic cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces* (2017), <https://doi.org/10.1021/acsami.7b02625>.
- [18] V. Georgieva, C. Anfray, R. Retoux, V. Valtchev, S. Valable, S. Mintova, Iron loaded EMT nanosized zeolite with high affinity towards CO₂ and NO, *Microporous Mesoporous Mater.* 232 (2016) 256–263, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.06.015>.

- [19] L.C.J. Thomassen, D. Napierska, D. Dinsdale, N. Lievens, J. Jammaer, D. Lison, C.E. A. Kirschhock, P.H. Hoet, J.A. Martens, Investigation of the cytotoxicity of nanozeolites A and Y, *Nanotoxicology* 6 (2012) 472–485, <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.587901>.
- [20] M.M. Tsotsalas, K. Kopka, G. Luppi, S. Wagner, M.P. Law, M. Schäfers, L. De Cola, Encapsulating 111In in nanocontainers for scintigraphic imaging: synthesis, characterization, and in vivo biodistribution, *ACS Nano* 4 (2010) 342–348, <https://doi.org/10.1021/nn901166u>.
- [21] M. Tsotsalas, M. Busby, E. Gianolio, S. Aime, L. De Cola, Functionalized nanocontainers as dual magnetic and optical probes for molecular imaging applications, *Chem. Mater.* 20 (2008) 5888–5893, <https://doi.org/10.1021/cm8006183>.
- [22] O. Martinho, N. Vilaça, P.J.G. Castro, R. Amorim, A.M. Fonseca, F. Baltazar, R. M. Reis, I.C. Neves, In vitro and in vivo studies of temozolomide loading in zeolite structures as drug delivery systems for glioblastoma, *RSC Adv.* 5 (2015) 28219–28227, <https://doi.org/10.1039/C5RA03871E>.
- [23] R. Marega, E.A. Prasetyanto, C. Michiels, L. De Cola, D. Bonifazi, Fast targeting and cancer cell uptake of luminescent antibody-nanozeolite bioconjugates, *Small* 12 (2016) 5431–5441, <https://doi.org/10.1002/smll.201601447>.
- [24] M. Zaarour, B. Dong, I. Naydenova, R. Retoux, S. Mintova, Progress in zeolite synthesis promotes advanced applications, *Microporous Mesoporous Mater.* 189 (2014) 11–21, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.08.014>.
- [25] S. Mintova, M. Jaber, V. Valtchev, Nanosized microporous crystals: emerging applications, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 7207–7233, <https://doi.org/10.1039/C5CS00210A>.
- [26] D.G. Seifu, T.T. Isimjan, K. Mequanint, Tissue engineering scaffolds containing embedded fluorinated-zeolite oxygen vectors, *Acta Biomater.* 7 (2011) 3670–3678, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.010>.
- [27] E. Csajbók, I. Bányai, L. Vander Elst, R.N. Muller, W. Zhou, J.A. Peters, Gadolinium (III)-loaded nanoparticulate zeolites as potential high-field MRI contrast agents: relationship between structure and relaxivity, *Chemistry* 11 (2005) 4799–4807, <https://doi.org/10.1002/chem.200500039>.
- [28] H. Awala, J.-P. Gilson, R. Retoux, P. Boullay, J.-M. Goupil, V. Valtchev, S. Mintova, Template-free nanosized faujasite-type zeolites, *Nat. Mater.* 14 (2015) 447–451, <https://doi.org/10.1038/nmat4173>.
- [29] M. Bernaudin, A. Bellail, H.H. Marti, A. Yvon, D. Vivien, I. Duchatelle, E. T. Mackenzie, E. Petit, Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain, *Glia* 30 (2000) 271–278.
- [30] M.M. Leblond, E.A. Pérès, C. Helaine, A.N. Gérauld, D. Moulin, C. Anfray, D. Divoux, E. Petit, M. Bernaudin, S. Valable, M2 macrophages are more resistant than M1 macrophages following radiation therapy in the context of glioblastoma, *Oncotarget* 8 (2017) 72597–72612, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19994>.
- [31] A. Corroyer-Dulmont, E.A. Pérès, E. Petit, L. Durand, L. Marteau, J. Toutain, D. Divoux, S. Roussel, E.T. MacKenzie, L. Barré, M. Bernaudin, S. Valable, Noninvasive assessment of hypoxia with 3-[18F]-fluoro-1-(2-nitro-1-imidazolyl)-2-propanol ([18F]-FMISO): a PET study in two experimental models of human glioma, *Biol. Chem.* 394 (2013), <https://doi.org/10.1515/hsc-2012-0318>.
- [32] S. Komaty, C. Anfray, M. Zaarour, H. Awala, V. Ruau, S. Valable, S. Mintova, A facile route toward the increase of oxygen content in nanosized zeolite by insertion of cerium and fluorinated compounds, *Molecules* 23 (2018), <https://doi.org/10.3390/molecules23020037>.
- [33] N. Vilaça, R. Amorim, A.F. Machado, P. Parpot, M.F.R. Pereira, M. Sardo, J. Rocha, A.M. Fonseca, I.C. Neves, F. Baltazar, Potentiation of 5-fluorouracil encapsulated in zeolites as drug delivery systems for in vitro models of colorectal carcinoma, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 112 (2013) 237–244, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.042>.
- [34] S. Komaty, A. Daouli, M. Badawi, C. Anfray, M. Zaarour, S. Valable, S. Mintova, Incorporation of trivalent cations in NaX zeolite nanocrystals for the adsorption of O₂ in the presence of CO₂, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22 (2020) 9934–9942, <https://doi.org/10.1039/D0CP00111B>.
- [35] M.Y. Koh, G. Powis, Passing the baton: the HIF switch, *Trends Biochem. Sci.* 37 (2012) 364–372, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.06.004>.
- [36] H. Kempf, M. Bleicher, M. Meyer-Hermann, Spatio-temporal dynamics of hypoxia during radiotherapy, *PLoS One* 10 (2015), e0133357, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133357>.
- [37] T. Le Gall, V. Polard, M. Rousselot, A. Lotte, M. Raouane, P. Lehn, P. Opolon, E. Leize, E. Deutsch, F. Zal, T. Montier, In vivo biodistribution and oxygenation potential of a new generation of oxygen carrier, *J. Biotechnol.* 187 (2014) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.07.008>.
- [38] N. Bayat, V.R. Lopes, J. Schölermann, L.D. Jensen, S. Cristobal, Vascular toxicity of ultra-small TiO₂ nanoparticles and single walled carbon nanotubes in vitro and in vivo, *Biomaterials* 63 (2015) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.044>.
- [39] P.A. Chiarelli, R.A. Revia, Z.R. Stephen, K. Wang, M. Jeon, V. Nelson, F.M. Kievit, J. Sham, R.G. Ellenbogen, H.-P. Kiem, M. Zhang, Nanoparticle biokinetics in mice and nonhuman primates, *ACS Nano* 11 (2017) 9514–9524, <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b05377>.
- [40] A. Karageorgis, S. Dufort, L. Sancey, M. Henry, S. Hirszjärvi, C. Passirani, J.-P. Benoit, J. Gravier, I. Texier, O. Montigon, M. Benmerad, V. Siroux, E.L. Barbier, J.-L. Coll, An MRI-based classification scheme to predict passive access of 5 to 50-nm large nanoparticles to tumors, *Sci. Rep.* 6 (2016), <https://doi.org/10.1038/srep21417>.
- [41] T. Christen, B. Lemasson, N. Pannetier, R. Farion, C. Segebarth, C. Rémy, E. L. Barbier, Evaluation of a quantitative blood oxygenation level-dependent (qBOLD) approach to map local blood oxygen saturation, *NMR Biomed.* 24 (2011) 393–403, <https://doi.org/10.1002/nbm.1603>.
- [42] S. Valable, A. Corroyer-Dulmont, A. Chakhoyan, L. Durand, J. Toutain, D. Divoux, L. Barré, E.T. MacKenzie, E. Petit, M. Bernaudin, O. Touzani, E.L. Barbier, Imaging of brain oxygenation with magnetic resonance imaging: a validation with positron emission tomography in the healthy and tumoural brain, *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.* (2016), <https://doi.org/10.1177/0271678X16671965>.
- [43] C. Chen, Y. Liu, H. Wang, G. Chen, X. Wu, J. Ren, H. Zhang, Y. Zhao, Multifunctional chitosan inverse opal particles for wound healing, *ACS Nano* 12 (2018) 10493–10500, <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b06237>.
- [44] J. Wang, G. Chen, Z. Zhao, L. Sun, M. Zou, J. Ren, Y. Zhao, Responsive graphene oxide hydrogel microcarriers for controllable cell capture and release, *Sci. China Mater.* 61 (2018) 1314–1324, <https://doi.org/10.1007/s40843-018-9251-9>.
- [45] L. Huang, W. Boling, J.H. Zhang, Hyperbaric oxygen therapy as adjunctive strategy in treatment of glioblastoma multiforme, *Med. Gas Res.* 8 (2018) 24–28, <https://doi.org/10.4103/2045-9912.229600>.
- [46] Z. Zhou, B. Zhang, H. Wang, A. Yuan, Y. Hu, J. Wu, Two-stage oxygen delivery for enhanced radiotherapy by perfluorocarbon nanoparticles, *Theranostics* 8 (2018) 4898–4911, <https://doi.org/10.7150/thno.27598>.
- [47] D.W. McNeese, B.J. Ponzio, R.W. Lewis, F.J. Stein, R.F. Sis, B.M. Levy, Hematology of common marmosets (*Callithrix jacchus*), *Primates* 23 (1982) 145–150, <https://doi.org/10.1007/BF02381447>.
- [48] D.W. McNeese, R.W. Lewis, B.J. Ponzio, R.F. Sis, F.J. Stein, Blood chemistry of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) maintained in an indoor-outdoor environment: primate comparisons, *Primates* 25 (1984) 103–109, <https://doi.org/10.1007/BF02382300>.

Annexe IV : Curriculum vitae

Helaine Charly

Informations personnelles

Date de naissance : 31 mars 1992

Adresse : 26 rue Eugène Maës
14000 Caen, France

E-mail : c.helaine@orange.fr

Téléphone : 06 34 32 91 31



Position actuelle

2017 – 2020 **Doctorat de biologie, Aspect Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**
Université de Caen-Normandie, France
UMR 6030 ISTCT, équipe CERVOxy
Directeur de thèse : Pr Edwige PETIT

Expériences professionnelles

Mars 2017 – Aout 2017 **Ingénieur d'étude**, UMR 6030 ISTCT, équipe CERVOxy
Projet Zeoxy "Utilisation de zéolites comme véhicules de thérapie de réoxygénation gazeuse pour les glioblastomes"

Janvier 2016 – Juin 2016 **Formation à la recherche**, UMR 6030 ISTCT, équipe CERVOxy
Sujet de stage M2R "Influence de de l'environnement sur la réponse des cellules endothéliales microvasculaires à la radiothérapie"
Sous la direction du Pr. Edwige PETIT

Avril 2015 – Juin 2015 **Formation à la recherche**, EA 2608, OeReCa
Sujet de stage M1 "Modulation de l'interaction acide hyaluronique/CD44 par la hyaluronidase : rôle(s) sur la signalisation oestrogénique et la transition épithélio-mésenchymateuse"
Sous la direction du Dr. Vincent HANOUX

Compétences techniques

Biologie cellulaire

- Culture lignées cellulaires (cellules de glioblastome : GL261, U87, U251 - cellules endothéliales : bEnd.3 - cellules macrophagique : THP-1, RAW 264.7)
- Cultures primaires de macrophages, neurones et astrocytes murins
- Culture cellulaire en condition hypoxique
- Irradiation cellulaire par rayons X
- Cytométrie en flux
- Cultures bactériennes, transformation bactérienne

Biologie moléculaire

- Extraction ADN/ARN/protéines
- PCR/RT-qPCR/gel électrophorèse
- Western blot

Expérimentation animale

- Manipulation des animaux (souris)
- Implantation de cellules en intracérébrale
- Administration solutions en intrapéritonéal et sous cutanée
- Irradiation de souris par rayons X
- Pose de cathéter dans la veine caudale de souris
- Euthanasie, perfusion cardiaque

Imagerie

- IRM (7T Pharmascan, Bruker avec le logiciel Paravision 6.0)
- Méthode de coupe de tissus au freezing microtome et cryostat
- Immunocytofluorescence/Immunohistofluorescence
- Colorations histologiques
- Microscope à épi-fluorescence

Informatique

- ImageJ/QuPath (traitements d'images)
- Kaluza/CytExpert (analyse des données de cytométrie en flux)
- JMP/StatView (analyse statistique)
- Microsoft office

Logistique

- Gestion de stocks
- Commande de produits
- Négociation avec commerciaux/Demande de devis

Activités d'enseignement et d'encadrements

2017 – 2020

Encadrement de stagiaires de L3/M1 (6)

2018

Activités d'enseignement à l'Université de Caen dans le cadre d'un avenant enseignement au contrat doctoral : remise à niveau en Biologie et Physiologie du M1 Valorisation des Innovations Biologiques (30 h de TP)

Publications

[4] Charly Helaine, Aurélie E. Ferré, Marine M. Leblond, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable and Edwige Petit. Angiopoietin-2 improves the efficacy of radiochemotherapy in a preclinical glioblastoma model by acting on angiogenesis and inflammation. (**Soumis à Cancers**)

[3] Clément Anfray, Sarah Komaty, Aurélien Corroyer-Dulmont, Moussa Zaarour, **Charly Helaine**, Hayriye Ozcelik, Clélia Allieux, Jérôme Toutain, Kamila Goldyn, Edwige Petit, Karim Bordji, Myriam Bernaudin, Valentin Valtchev, Omar Touzani, Svetlana Mintova and Samuel Valable. Nanosized zeolites as a gas delivery platform in a glioblastoma model. *Biomaterials*. **2020**; 257: 120249

[2] Kamila Goldyn, Clément Anfray, Valerie Riaux, **Charly Helaine**, Richard Retoux, Sarah Komaty, Samuel Valable, Valentin Valtchev and Svetlana Mintova. Copper exchanged FAU nanozeolite as non-toxic nitric oxide and carbon dioxide gas carrier. *Microporous and Mesoporous Materials*. **2019**; 280:271-276

[1] Marine M. Leblond, Elodie A. Pérès, **Charly Helaine**, Aurélie N. Gérault, Damien Moulin, Clément Anfray, Didier Divoux, Edwige Petit, Myriam Bernaudin and Samuel Valable. M2 macrophages are more resistant than M1 macrophages following radiation therapy in the context of glioblastoma. *Oncotarget*. **2017**; 8:72597-7261

Communications orales

Congrès national :

Aurélie E. Ferré, Clément Anfray, Marine M. Leblond, Hayriye Ozcelik, **Charly Helaine**, Sarah Komaty, Edwige Petit, Myriam Bernaudin, Svetlana Mintova, Samuel Valable. Impact of tumor réoxygénation by nanoparticles on tumor associated macrophages (TAMs). 21^e journée de l'école doctorale, Caen, **21-22 mars 2019**

Communications affichées

Congrès internationaux :

Charly Helaine, Aurélie E. Ferré, Marine M. Leblond, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Edwige Petit. Impact of Angiopoietin-2 on glioblastoma response to combined chemo-radiotherapy. European society of medical oncology, Barcelone, **27 Septembre - 1 Octobre 2019**.

Aurélie E. Ferré, Clément Anfray, Marine M. Leblond, Hayriye Ozcelik, **Charly Helaine**, Sarah Komaty, Edwige Petit, Myriam Bernaudin, Svetlana Mintova, Samuel Valable. Impact of tumor réoxygénation by nanoparticles on tumor associated macrophages (TAMs). European society of medical oncology, Barcelone, **27 Septembre - 1 Octobre 2019**.

Gaëlle Lambert, Elodie A. Pérès, **Charly Helaine**, Didier Divoux, Jérôme Toutain, Samuel Valable, Myriam Bernaudin, Edwige Petit. HAF inhibition in glioma cells reduces glioma growth without modifying the efficacy of chemo- and radiotherapy. European association for cancer research, Amsterdam, **30 Juin - 3 Juillet 2018**.

Charly Helaine, Aurélie E. Ferré, Marine Leblond, Gaëlle Lambert, Didier Divoux, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Edwige Petit. Macrophages contribute to vascular damage after irradiation in glioblastoma: in vitro and in vivo studies. International Marie Sklodowska-Curie Meeting, Paris, **12 Octobre 2018**.

Aurélie E. Ferré, Marine M. Leblond, **Charly Helaine**, Élodie A. Pérès, Edwige Petit, Myriam Bernaudin, Samuel Valable. Effect of radio-induced products from glioblastoma cells on macrophages. International Marie Sklodowska-Curie Meeting, Paris, **12 Octobre 2018**.

Charly Helaine, Aurélie E. Ferré, Marine M. Leblond, Gaëlle Lambert, Didier Divoux, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Edwige Petit. Involvement of tumor microenvironment on the sensitivity of glioblastoma vascularization to irradiation. Société Française d'Angiogenèse, Reims, **14 - 16 Octobre 2018**.

Congrès nationaux :

Charly Helaine, Aurélie E. Ferré, Marine M. Leblond, Aurélien Corroyer-Dulmont, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Edwige Petit. La surexpression de Ang2 optimise l'efficacité de la chimio-radiothérapie dans les glioblastomes. Journée normande de recherche biomédicale, Caen, **19 Novembre 2019**.

Charly Helaine, Aurélie E. Ferré, Marine M. Leblond, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Edwige Petit. Ang2 overexpression optimizes the efficacy of chemo-radiotherapy in glioblastoma. 23^e meeting LARC-Neuroscience, Nantes, **18 Octobre 2019**.

Charly Helaine, Aurélie E. Ferré, Marine M. Leblond, Aurélien Corroyer-Dulmont, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Edwige Petit. Ang2 overexpression optimizes the effectiveness of chemo-radiotherapy on glioblastoma. 12^e journées scientifiques du canceropôle Nord-Ouest, Deauville, **15 - 17 Mai 2019**.

Aurélie E. Ferré, Clément Anfray, Marine Leblond, Hayriye Ozcelik, **Charly Helaine**, Sarah Komaty, Edwige Petit, Myriam Bernaudin, Svetlana Mintova, Samuel Valable. Impact of tumor réoxygénation by nanoparticles on tumor associated macrophages (TAMs). 12^e journées scientifiques du canceropôle Nord-Ouest, Deauville, **15 - 17 Mai 2019**.

Charly Helaine, Aurélie E. Ferré, Marine M. Leblond, Aurélien Corroyer-Dulmont, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Edwige Petit. Influence of Ang2 overexpression in the recurrence of glioblastoma after chemo-radiotherapy. 21^e journée de l'école doctorale, Caen, **21-22 mars 2019**.

Charly Helaine, Aurélie N. Gérault, Marine M. Leblond, Aurélien Corroyer-Dulmont, Gaëlle Lambert, Didier Divoux, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Edwige Petit. A dialogue between endothelial cells and macrophages might contribute to vasculopathy in response to brain radiotherapy. 20^e journée de l'école doctorale, Rouen, **22-23 Mars 2018**. (**1^{er} prix Poster**).

Gaëlle Lambert, Elodie A. Pérès, **Charly Helaine**, Didier Divoux, Jérôme Toutain, Samuel Valable, Myriam Bernaudin, Edwige Petit. What about HAF in proliferation and radioresistance of glioma cells *in vitro*? 20^e journée de l'école doctorale, Rouen, **22-23 Mars 2018**.

Charly Helaine, Aurélie N. Gérault, Marine M. Leblond, Aurélie Ferré, Aurélien Corroyer-Dulmont, Gaëlle Lambert, Didier Divoux, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Edwige Petit. Influence of the tumor microenvironment on the radiosensitivity of the vascular component of glioblastoma: *in vivo* and *in vitro* studies. Journée normande de recherche biomédicale, Caen, **14 Novembre 2017**.

Charly Helaine, Aurélie N. Gérault, Marine M. Leblond, Aurélien Corroyer-Dulmont, Gaëlle Lambert, Didier Divoux, Elodie A. Pérès, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Edwige Petit. Study of the radiosensitivity of the vascular compartment in a context of glioblastoma. 10^e journées scientifiques du canceropôle Nord-Ouest, Deauville, **10-12 Mai 2017**. (**2^e prix Poster**).

Marine M. Leblond, Elodie A. Pérès, **Charly Helaine**, Aurélie N. Gérault, Damien Moulin, Clément Anfray, Didier Divoux, Edwige Petit, Myriam Bernaudin, Samuel Valable. X-ray irradiation favors M2 phenotype of macrophages in glioblastoma. 10^e journées scientifiques du canceropôle Nord-Ouest, Deauville, **10-12 Mai 2017**

Affiliations à des sociétés scientifiques

2018 – 2020	Membre de la "Société Française d'Angiogenèse"
2020	Membre de la "Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires"
2019	Membre de la "European Society of Medical Oncology"

Vulgarisation scientifiques

2018	Fête de la Science – Caen Festival de l'excellence normande (FENO) – Caen
2017	Fête de la Science – Caen Semaine du cerveau - École élémentaire de Vily-Bocage (14)

Prix et financements

- 2019** **Bourse de voyage** par l'EdNBise-497 pour la présentation affichée de résultats au congrès « European Society for Medical Oncology » ESMO, Barcelone, Espagne Fête de la Science – Caen
- Bourse de voyage** par le cancéropôle nord-ouest (CNO) pour la présentation affichée de résultats aux 12^e journées scientifiques du CNO, Deauville, France
- 2018** **Bourse de formation** par l'EdNBise pour le DU expérimentation animale, Caen, France
- Prix poster** du public aux 20^e journées de l'école doctorale, Rouen, France
- 2017** **Bourse de voyage** par le cancéropôle nord-ouest (CNO) pour la présentation affichée de résultats aux 10^e journées scientifiques du CNO, Deauville, France
- 2^{ème} Prix poster** aux 10^e journées scientifiques du CNO, Deauville, France

Évaluation préclinique de l'effet de l'Angiopoïétine-2, un facteur angiogénique immunomodulateur, sur la progression du glioblastome et sa réponse à la radiochimiothérapie

Le glioblastome (GB) est un cancer au pronostic sombre, malgré une thérapeutique agressive qui consiste en une chirurgie suivie d'une radiochimiothérapie (RCT). Ces tumeurs cérébrales sont caractérisées par un environnement richement vascularisé et une inflammation immunosuppressive. Cet environnement tumoral contribue non seulement à la progression des GB mais aussi à leur résistance aux traitements. La progression des GB s'accompagne d'une surexpression d'Angiopoïétine-2 (Ang-2) identifiée comme l'un des facteurs contrôlant l'angiogenèse de ces tumeurs. Plus récemment, l'Ang-2 a été également impliquée dans les processus d'inflammation. Cependant, à ce jour, l'impact de ce facteur angiogénique immunomodulateur sur la progression des GB et leur réponse aux traitements conventionnels, n'a pas été clairement identifié. Cette étude a été entreprise afin de clarifier ces deux points en utilisant un modèle syngénique orthotopique de GB (lignée cellulaire GL261). Les cellules GL261 ont été modifiées génétiquement afin de surexprimer l'Ang-2. Les résultats, obtenus ont montré que les tumeurs GL261-Ang2 et GL261-wt suivent des croissances similaires alors que leur environnement vasculaire et inflammatoire est différent. En revanche, en réponse au traitement RCT, la progression des tumeurs GL261-Ang2 et GL261-wt est totalement différente puisque pour les tumeurs contrôles, une récurrence est observée 15 jours après traitement, alors que la RCT induit une régression des tumeurs GL261-Ang2, encore visible à 3 mois. L'étude du compartiment vasculaire et inflammatoire aux temps précoces de traitement a permis de montrer que les vaisseaux présents dans la tumeur GL261-Ang2 sont plus sensibles à la RCT, alors qu'une augmentation de migration de TAM (*tumor associated macrophages*) est observée. Des expériences réalisées *in vitro* sur les macrophages RAW 264.7 ont mis en évidence un effet chemoattractant de l'Ang-2. Par ailleurs, nous avons montré que la surexpression de l'Ang-2 dans les cellules GL261 exposées à la RCT favorise la sénescence et induit une instabilité génomique robuste conduisant à la mort mitotique de ces cellules. Collectivement, ces résultats précliniques suggèrent qu'en plus de ses effets sur le compartiment vasculaire, l'Ang-2, en agissant sur l'inflammation, améliore drastiquement l'efficacité du protocole de RCT utilisé sur ce modèle préclinique de GB, empêchant la récurrence tumorale au moins pendant 3 mois.

Mots clés : Glioblastome – Angiopoïétine-2 – Vascularisation – Inflammation – Microenvironnement – Radiothérapie – Chimiothérapie – Radiochimiothérapie

Preclinical evaluation of Angiopoietin-2 effect, an immunomodulatory angiogenic factor, on glioblastoma progression and its response to radiochemotherapy

Glioblastoma (GB) is one of the most lethal cancers despite aggressive therapy consisting of surgery followed by radiochemotherapy (RCT). These brain tumors are characterized by a highly vascularized environment and immunosuppressive inflammation. This tumor environment contributes not only to the progression of GB but also to their resistance to treatments. The progression of GB is accompanied by an overexpression of Angiopoietin-2 (Ang-2) identified as one of the main regulators of angiogenesis in these tumors. Recently, Ang-2 has also been involved in inflammatory processes. However, to date, the impact of this immunomodulatory angiogenic factor on the progression of GB and their response to conventional treatments has not been clearly identified. This study was undertaken to clarify these two points using an orthotopic syngeneic model of GB (GL261 cell line). GL261 cells were genetically engineered to overexpress Ang-2. Our results showed that the GL261-Ang2 and GL261-wt tumors displayed similar growths although their vascular and inflammatory environments are different. Furthermore, in response to RCT treatment, the progression of GL261-Ang2 and GL261-wt tumors is totally different since for control tumors, recurrence is observed 15 days after treatment, while RCT induces a regression of GL261-Ang2 tumors, still visible at 3 months. The study of the vascular and inflammatory compartments at the early stages of treatments has shown that the vessels present in the GL261-Ang2 tumor are more sensitive to RCT, while an increase in migration of TAM (*tumor associated macrophages*) is observed. Experiments performed *in vitro* on RAW 264.7 macrophages demonstrated a chemoattractant effect of Ang-2. Furthermore, we showed that the Ang-2 overexpression in GL261 cells exposed to RCT promotes senescence and induces a robust genomic instability leading to the mitotic death of these cells. Collectively, these preclinical results suggest that in addition to its effects on the vascular compartment, Ang-2, by acting on inflammation, enhances drastically the efficacy of RCT protocol used in this preclinical model of GB, preventing tumor recurrence for at least 3 months.

Keywords : Glioblastoma – Angiopoietin-2 – Vascularization – Inflammation – Microenvironment – Radiotherapy – Chemotherapy – Radiochemotherapy

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Adresse du laboratoire : ISTCT UMR6030-CNRS, CEA, Université de Caen-Normandie
GIP CYCERON
Boulevard Henri Becquerel
14074 Caen, France