



HAL
open science

Etudes des interactions moléculaires et cellulaires entre cellules de glioblastome et macrophages dans le cadre d'un traitement par irradiation

Hélène Gregoire

► **To cite this version:**

Hélène Gregoire. Etudes des interactions moléculaires et cellulaires entre cellules de glioblastome et macrophages dans le cadre d'un traitement par irradiation. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2019. Français. NNT : 2019ANGE0090 . tel-04043441

HAL Id: tel-04043441

<https://theses.hal.science/tel-04043441>

Submitted on 23 Mar 2023

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Médecine nucléaire et radiopharmaceutique

Par

Hélène GREGOIRE

Études des interactions moléculaires et cellulaires entre cellules de glioblastome et macrophages dans le cadre d'un traitement par irradiation

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 19/11/2019
Unité de recherche : CRCINA, Inserm U1232 GLIAD, Angers, France
Thèse N° : 181336

Rapporteurs avant soutenance :

Dr. Carine MICHIELS, Rapporteur
Professeur, Université Namur, Belgique

Dr. Samuel VALABLE, Rapporteur
DR, Université de Caen, France

Composition du Jury :

Dr. Carine MICHIELS, Rapporteur
Professeur, Université Namur, Belgique

Dr. Samuel VALABLE, Rapporteur
DR, Université de Caen, France

Dr. Emmanuel GARCION, Directeur de thèse
DR2 Inserm, Université Angers, France

Dr. François HINDRE, Co-directeur de thèse
MCU, Université Angers, France

Invité

Dr. Carmen MARTINEZ, Examinatrice invitée,
DR, Université Angers, France

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



RÉSUMÉ

Le glioblastome (GBM) est la tumeur primitive la plus fréquente et la plus agressive du système nerveux central. Malgré la chirurgie et la radio-chimiothérapie, les récurrences sont presque inévitables. La nature récurrente et invasive du GBM est en partie due à la présence de cellules tumorales de type souches ainsi qu'au signaux du microenvironnement. Le microenvironnement tumoral est composé de plusieurs types cellulaires dont les cellules immunitaires et notamment les macrophages associés à la tumeur (TAMs). Au sein des tumeurs, l'interaction et la communication entre les cellules tumorales et les TAMs modulent ces derniers. De plus, l'effet des TAMs sur les cellules tumorales est dépendant de leur type d'activation ; les TAMs M1 ont une activité anti-tumorale alors que les TAMs M2 favorisent la croissance tumorale et la résistance au traitement.

Dans cette thèse, nous avons étudié la manière dont ces deux types de TAMs interagissent avec les cellules tumorales de GBM en réponse à une irradiation. Pour cette étude, un milieu conditionné a été produit à partir de cellules primaires de GBM humains non irradiées ou irradiées avec des rayons X (8 Gy). Ce milieu conditionné a été utilisé pour étudier l'effet des facteurs sécrétés par les cellules de GBM sur l'activation des TAMs après 24 ou 72 heures.

Nos résultats indiquent que les TAMs réagissent aux facteurs sécrétés par les cellules tumorales non irradiées et donnent lieu à un phénotype de type M1. Cependant, les facteurs sécrétés par les cellules GBM irradiées conduisent à un statut inférieur à celui de M1. Fait intéressant, dans un microenvironnement tumoral pro-M1, les TAMs peuvent être polarisés vers les phénotypes M1 et M2 en réponse aux facteurs sécrétés par le GBM. Enfin, nos résultats suggèrent également que les cellules de GBM sont plus sensibles à l'irradiation en présence de macrophages faiblement polarisés.

Mots-clés : Glioblastome, Cellules tumorales, Macrophages, Irradiation

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive tumor of the central nervous system. Despite surgery and radio-chemotherapy, recurrence is almost inevitable and occurs in the vicinity of the radiation field. The recurrent nature and invasiveness of GBM is in part due to its stem cell-like nature as well as microenvironmental cues. This microenvironment consists of several types of immune cells including Tumor Associated Macrophages (TAMs). Within tumors, TAMs are modulated depending on their interplay and communication with neoplastic cells as well as several other factors. Notably, the effect of TAMs on tumor cells is dependent on their type of activation; M1 TAMs have an anti-tumoral activity whereas M2 TAMs favor tumor growth and resistance to therapy.

In this thesis, we investigated how these two cell types, M1 and M2, interplay with glioblastoma tumoral cells in response to radiotherapy. For this study, conditioned media were produced from non-irradiated or X-rays irradiated (8 Gy) human primary GBM cells. These conditioned media were used to study the effect of factors secreted by GBM cells on the TAMs activation after either 24 or 72 h.

Our results indicate that TAMs react to factors secreted from non-irradiated tumor cells and give rise to an M1-like phenotype. However, factors secreted from irradiated GBM cells lead to a lesser M1-like status. Interestingly, within a pro-M1 tumor microenvironment TAMs can be polarized towards both M1 and M2 phenotypes in response to the factors secreted by the GBM. Finally, our results also suggest that GBM neoplastic cells are more sensitive to irradiation in the presence of low-polarized macrophages.

Keywords : Glioblastoma, Tumor cells, Macrophages, Irradiation

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Hélène Grégoire
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **11 / 10 / 2019**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes - BP 73532
49035 Angers cedex

Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Carine Michiels et le Docteur Samuel Valable d'avoir accepté d'être les rapporteurs pour mes travaux de thèse. Je remercie également le Docteur Carmen Martinez d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je souhaite ensuite remercier mes deux directeurs de thèse, Emmanuel et François, pour m'avoir donné l'opportunité et la chance de réaliser cette thèse. Je vous remercie pour votre confiance et la liberté que vous m'avez accordé au cours de ces 3 années.

Un grand merci à l'équipe **GLIAD** pour votre accueil et votre soutien. Sans vous, la thèse n'aurait pas été là même.

Mathie, ma première rencontre à Angers... On a commencé nos thèses ensemble et nous les finissons presque en même temps. Je te souhaite plein de bonne chose pour la suite et j'espère qu'avec Emile vous allez bientôt partir pour le Pays-Bas ! Merci pour ton soutien dans les moments difficile, merci pour tous les moments de rigolade ! Fait attention à ton coude dans le futur !! Et encore merci pour m'avoir introduit au jeu de rôle ;)

Nela, merci pour ton soutien, tes conseils, et ta franchise. Merci pour toute l'aide que tu m'as apporté ! Je te souhaite de décrocher un poste, tu feras une merveilleuse chercheuse. Continue à bien t'occuper des doctorants et garde la bonne ambiance dans notre bureau ;)

Muhammad, Good luck for your new job! I wish you the best in Austria. Thank you for correcting my mistake in English. **Déborah**, la petite dernière arrivée de notre bureau... Je te laisse en charge des repas de labo et du repas de Noël :D Je te souhaite bon courage pour la suite de ta thèse (ça va bien se passer, soit confiante) ! Occupe-toi bien des futurs thésards !

Sylvie, merci pour toute l'aide que tu as pu m'apporter au cours de ces 3 années. Continue à bien t'occuper des nouveaux doctorants et profite de ton petit fils !

Clément, merci pour ton soutien et profite de ton fils. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite. **Anne** et **Laurence, Claire** je vous remercie pour vos conseils.

Prudence, je t'ennuie même dans mes remerciements ahahaha :D Je m'améliore comme tu peux le voir, je ne t'ai pas oublié ! Bon courage pour la suite et pour tes futures aventures au Canada ! Ne terrifie pas trop tes collègues ;)

Charlotte, j'espère aussi que tu décrocheras un poste, car tu le mérites ! Merci à toi aussi pour toute l'aide que tu m'as apportée notamment dans la mise au point des comet assays ! Je te souhaite plein de bonne chose pour la suite.

Blandine, merci pour ton soutien, pour tes conseils par rapport à mon projet et sur mon avenir ;) Je te souhaite de t'épanouir dans ton futur boulot, et plein de bonheur avec ta petite famille.

Merci à **Catherine** et **Jérôme** de m'avoir formé à la cytométrie en flux et à la RT-qPCR. Merci pour vos conseils et l'aide que vous m'avez apportée dans mes expériences.

Un grand merci à **Baptiste, Janske, Florence, Lila** du **bureau des licornes** pour votre accueil en début de thèse ! C'était la meilleure époque ! Merci pour toutes les pauses gâteaux que nous avons pu avoir <3

Adlie, Léna, Clairou je ne sais pas par quoi commencer... Vous êtes ma petite famille angevine avec **papi**, sans vous, la vie Angevine aurait été trop triste (et avec trop peu de mojito). Vous avez toujours été là quoi que je fasse (même mes courses). Vous m'avez supporté pendant ces 3 dernières années alors merci parce que sans vous ça aurait été impossible. Vous m'avez écouté, réconforté, conseillé, forcé à faire un break, mais que ... Merci pour toutes les crises de fou rire, les moments de folie dans les couloirs du labo, dans les bars, chez nous, dans la rue, pendant les courses. Vous allez terriblement me manquer et j'espère que vous n'allez pas m'oublier. Je vous souhaite plein de bonnes choses à toutes et j'espère que l'on continuera à se voir dans les années à venir ;) La thèse aurait vraiment été triste sans vous. Bon après sans Adlie y'aurait eu moins de moments gênants (Le mec à la casquette, le saucisson, les vieux,...). Je vous aime autant que les mojitos les meufs <3

- Léna, tu es ma petite sœur pestouille ! Grace à toi j'ai de supers souvenirs au ski (merci **Nicolas**) et à Rome alors merci. À quand les prochaines vacances ?
- Adlie profite de saminouche et de ton wiwi d'amour, j'attends au moins une photo de wiwi par semaines à partir de décembre. Juste une dernière chose : **POKEMON C'est mieux que Yu Gi Oh !** (Cherche pas j'ai raison).
- Petite Clairou ! Plus qu'une année à tenir pour toi ! Merci pour les calins quotidiens... Tu vas survivre sans mes calins pendant 1 an ? Je pense que nous sommes toutes d'accord pour te nommer maitre boulet dans notre groupe ;) Parce que bon qui va acheter des meubles sans argent sur son compte. #Claireestunénorme boulet #Adéstaussiunbouletquiperdssesaffaires #Lénaestlamoinboulette #TeamBoulette.

Merci à **Abdou, Valentin, Milad** et **Kevin** pour votre soutien ! Merci pour toutes les soirées, les karaokés ... Bon courage pour la suite de votre thèse ! Je passerai vous voir pour vos soutenances ;)

Valentin courage, prends confiance en toi ! Abdou, reste toi-même ou pas! :D Oh, and GUYS, be nice to Claire ! also, stop taking picture without Valentin (even if it is so fun).

À **Yael** et **Lisou**, mes presque coloc Lyonnaise (ça aurait été vraiment fantastique une coloc entre nous, Nim et Gaia) ! Vous m'avez supporté pendant ces 5 dernières années, je ne sais pas comment vous faites. Merci de m'avoir remonté le moral, et avoir écouté lorsque j'avais absolument besoin de râler ! Merci pour les quelques week-ends que nous avons pu faire ensemble pendant ma thèse. Il y en avait peu, mais ils m'ont fait un bien fou !

Élodie, ma sœur de cœur, merci pour ton soutien inconditionnel au cours de ces 10 dernières années. On a bien grandi depuis le lycée ;-) Toi et Nina m'avaient beaucoup manqué au cours de ces 3 dernières années, mais merci pour toutes les photos de Nina qui m'ont donné l'impression de la voir grandir alors que je n'étais pas là <3 Je remercie aussi tes parents qui m'ont apporté beaucoup de soutien.

À ma famille, merci pour votre soutien. A mon grand petit frère, merci de m'avoir écouté quand je doutais de tout, mais aussi merci pour tes conseils ! A ma maman, merci de m'avoir encouragé et offert la chance de faire de longues études. A ma petite nièce, courage ! merci pour tes appels qui m'ont toujours redonné le sourire.

Gaia et **Calou**, mes deux boules de poils d'amour, merci pour vos câlins (et morsures) <3

Abréviations

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Sérum albumine bovine
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
CCL24	Chemokine (C-C motif) ligand 24
CM	Milieu conditionné
CSCs	Cellules Souches Cancéreuses
CSF-1	Colony Stimulating Factor 1
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
DMEM	Dulbecco's modified-Eagle's medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
F12	Milieu de culture nutritif avec 0,6% glucose, 2 mM glutamine, 3 mM sodium bicarbonate, et 5 mM de tampon HEPES
FBS	Sérum bovin de foetal
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GBM	Glioblastome
IDH1	Isocitrate Dehydrogenase 1
IRM	Imagerie Magnétique à Résonance
kDa	KiloDalton
LT	Lymphocytes T
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MMPs	Metalloprotéase
NLGN3	Neuroigin-3
Notch	Neurogenic locus Notch homologue protein
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programmed Cell Death-1

PDGFR α	Platelet-derived Growth Factor Receptor alpha
POSTN	Periostin
Pyk2	Proline rich tyrosine
RPM	Tour par minute
RT-qPCR	Transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaine
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SDF-1	Stromal Cell-derived Factor 1
shh	Sonic Hedgehog protein
SNC	Système Nerveux Central
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TACC	Transforming Acidic Coiled-Coil containing protein 3
TAMs	Macrophages associés à la tumeur
TGF-b	Transforming Growth Factor-beta
TMZ	Temozolomide
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Table des figures et des tableaux

Figure 1 : Champ d'investigation de la thèse	3
Figure 2 : Les marqueurs des cellules cancéreuses selon Hanahan et Weinberg (2011 et 2018).....	6
Figure 3 : Image obtenue par IRM pour le diagnostic d'un glioblastome d'après Chaichana et al 2014	7
Figure 4 : Vue d'ensemble des mutations génétiques qui caractérisent les différentes formes de gliome d'après Apin et al 2015	9
Figure 5 : Représentation du microenvironnement du GBM d'après Broekman et al 2018	13
Figure 6 : Caractéristiques des cellules souches de GBM et des cellules tumorales d'après Abou-Antoun et al 2017	14
Figure 7 : Représentation schématique des deux modèles d'obtention des CSCs d'après Gimple et al 2019.....	15
Figure 8 : Association des cellules formant la barrière hématoencéphalique d'après Abbott et al 2010	16
Figure 9 : Pouvoir pénétrant des différents types de rayonnement ionisant adapté de Oatway et al 2009.....	22
Figure 10 : Action des rayonnements ionisants sur les cellules, schéma adapté de Baskar et al 2014	23
Figure 11 : Représentation des voies de signalisation pouvant être activées après irradiation d'après Quiji Wu et al 2017	25
Figure 12 : Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans la formation de lésions par le TMZ et les rayonnements ionisants, puis des mécanismes impliqués dans la réparation de ces lésions d'après Erasmus et al 2016	26
Figure 13 : Caractérisation phénotypique de la primo-culture Glio1 à 21% O2	45
Figure 14 : Caractérisation phénotypique de la primo-culture Glio3 à 21% O2	46
Figure 15 : Suivi de la progression tumorale chez des rats nude injecté avec la primo-culture Glio1.	47
Figure 16 : Tumor associated macrophages activities in glioblastoma progression.	63
Figure 17 : La monocytopoïèse chez la souris d'après Ginhoux et al 2014.....	90

Figure 18 : Présentation des différents modèles permettant l'étude de la microglie et des macrophages d'après Poon et al 2017	93
Figure 19 : Représentation schématique du protocole de préparation du milieu conditionné irradié et non irradié	97
Figure 20 : Les cellules souches tumorales Glioblastoma (Glioblastoma) diminuent l'expression de marqueur M2 par les THP-1	102
Figure 21 : Les cellules tumorales souches Glioblastoma (Glioblastoma) et leur état d'irradiation diminuent l'expression de CD80 par les THP-1.....	103
Figure 22 : Les facteurs produits par les cellules tumorales Glioblastoma (Glioblastoma) augmentent la transcription de CD80 et TNF par les THP-1	104
Figure 23 : Les macrophages THP-1 répondent aux signaux environnementaux pro-M1 et aux stimuli des cellules de GBM.....	105
Figure 24 : Les macrophages M0 sensibilisent les cellules de GBM à un traitement par irradiation	107
Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différents types de gliomes selon leur grade en fonction de la classification de l'OMS de 2016.....	8
Tableau 2 : Caractéristiques cliniques et moléculaires des GBM adaptés de <i>Louis et al 2016</i>	8
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des mises en cultures réalisées et différentes mutations ont été mis en évidence par une analyse SNP	43
Tableau 4 : Clinical trial targeting the recruitment of macrophages	68
Tableau 5 : Clinical trial targeting the recruitment of macrophages	70
Tableau 6 : Clinical trial targeting the recruitment of macrophages	74

Sommaire

Introduction générale	2
État de l'art	4
1. Généralités sur les cancers	5
2. Les glioblastomes	6
2.1. Épidémiologie	6
2.2. Symptômes et diagnostic	6
2.3. Classification des tumeurs cérébrales par l'OMS	7
2.4. Altérations génétiques et moléculaires dans le GBM	10
2.4.1. Modification chromosomique	10
a) Amplification cytogénique	10
b) Gène de fusion	10
2.4.2. Principales voies de signalisation altérées	
a) EGFR	11
b) VEGFR	11
c) PDGFR	12
2.5. Composition cellulaire du GBM	12
2.5.1. Les cellules tumorales	13
2.5.2. Le contingent vasculaire	15
2.5.3. Le contingent immunitaire et inflammatoire	16
a) Les lymphocytes	16
b) La microglie et les macrophages périphériques	17
2.5.4. Les cellules gliales et les neurones	17
3. Les stratégies thérapeutiques dans le GBM	18
3.1. Stratégie thérapeutique classique	18
3.1.1. Chirurgie	18
3.1.2. Chimiothérapie	18
3.1.3. Radiothérapie	19
3.2. Autres stratégies thérapeutiques	19

3.2.1. Gliadel.....	19
3.2.2. Avastin.....	19
3.3. Nouvelles stratégies thérapeutiques.....	19
3.3.1. Immunothérapie.....	19
3.3.2. Radio-pharmaceutique.....	20
4. Radiothérapie et effets biologiques.....	20
4.1. La radiothérapie.....	20
4.1.1. Définition.....	20
4.1.2. Méthodes de radiothérapie.....	20
4.1.3. Types de rayonnements.....	21
4.2. Les effets biologiques induit par la radiothérapie.....	22
4.2.1. Les dommages à l'ADN.....	22
a) Effets directs.....	23
b) Effets indirects.....	23
c) Effets bystander.....	24
4.2.2. Les effets cellulaires.....	24
a) Mort cellulaire.....	24
b) Réparation de l'ADN.....	25
Objectif de la thèse.....	27
Références bibliographiques.....	29
Chapitre 1 : Mise en place du modèle de primo-culture de cellules de GBM.....	37
1. Introduction.....	38
1.1. Caractéristiques des cellules souches cancéreuses.....	38
1.1.1. Marqueurs membranaires.....	38
1.1.2. Marqueurs intracellulaires.....	39
1.2. Les voies de signalisation impliquée dans la radiorésistance.....	39
1.2.1. Chk1, Chk2 et ATM.....	39
1.2.2. Wnt/ β caténine.....	39
1.2.3. Notch.....	40

1.3. Objectif.....	40
2. Matériels et méthodes.....	40
2.1. Culture cellulaire	40
2.1.1. Mise en culture	40
2.1.2. Dissociation des primo-cultures.....	41
2.1.3. Congélation des cellules.....	41
2.2. Cytométrie en flux - Marquage direct.....	41
2.3. SNP Array	42
2.4. Modèle orthotopique de GBM humain	42
3. Résultats.....	43
3.1. Caractérisation des différents prélèvements tumoraux par SNP array.....	43
3.2. Caractérisation des primo-cultures.....	44
3.3. Pouvoir tumorigène des Gli01	47
4. Discussion.....	47
4.1. Discussion technique sur le protocole de mise en culture.....	48
4.2. Hétérogénéité tumorale	49
4.2.1. Discussion technique	50
4.2.2. Profil génomique des primo-cultures.....	50
4.3. Formation de la tumeur in vivo chez le rongeur	51
4.4. Perspectives	51
Références bibliographiques	52

Chapitre 2: Targeting Tumor Associated Macrophages to Overcome Conventional Treatment Resistance in Glioblastoma	55
1. Introduction	56
2. The presence of TAMs in GBM: Reality or not?	58
3. Microglia: the resident macrophages of the CNS	59
4. Tumor associated macrophages: a partner in crime for tumor cells	61
4.1. Biology of the tumor	61
4.1.1. Tumor cells	61

4.1.2. Angiogenesis	62
4.1.3. Immune environment	64
4.2. TAMs & therapeutics	66
4.2.1. TAMs & surgical resection	66
4.2.2. TAMs & radiotherapy	66
4.2.3. TAMs & chemotherapy	67
5. Current therapies targeting tumor associated macrophages in cancer	69
5.1. Targeting the recruitment of TAMs	69
5.2. Reprogramming of TAMs toward an antitumoral phenotype	71
5.2.1. Inhibition of CD47	71
5.2.2. Inhibition of CD40	71
5.2.3. TLR antagonist	71
5.3. Depletion of TAMs	72
6. Conclusion	73
Références bibliographiques	75

Chapitre 3 : Influence « conjointe » des macrophages et des cellules cancéreuses de GBM sur la réponse tumorale aux rayonnements ionisants

1. Introduction sur les macrophages	89
1.1. La monocytopoïèse	89
1.2. Les macrophages dans le GBM	90
1.2.1. Influence sur le pronostic	91
1.2.2. Facteurs influençant le phénotype des macrophages	91
1.3. Les différents marqueurs associés aux TAMs	91
1.3.1. Marqueurs M1	92
a) CD80	92
b) TNFa	92
1.3.2. Marqueurs M2	92
a) CD163	92
b) IL-10	92

c) CCL24	93
1.4. Les modèles d'études pour les macrophages	93
1.4.1. Macrophages primaires Humains	94
1.4.2. Macrophages primaires issus de souris	94
1.4.3. Lignée cellulaire.....	95
1.5. Objectif.....	95
2. Matériels & méthodes.....	96
2.1. Culture cellulaire	96
2.1.1. Condition de culture des THP-1	96
2.1.2. Différenciation et polarisation des THP-1	96
2.2. Condition d'irradiation.....	96
2.3. Préparation du milieu conditionné issu de cellules tumorales de GBM	96
2.4. Cytométrie en flux	97
2.5. RT-qPCR.....	97
2.6. Test ELISA	98
2.7. Co-culture de cellules tumorales et de THP-1	98
2.8. Test de viabilité	98
2.9. Comet assay	99
2.10. Analyses statistiques	99
3. Résultats.....	100
3.1. Influence des cellules tumorales de GBM sur le phénotype des macrophages.....	100
3.2. Influence de l'état d'irradiation des cellules souches de GBM sur le phénotype des macrophages.....	101
3.3. Influence des cellules tumorales de GBM et de leur état d'irradiation dans un environnement pré-conditionné en LPS/IFN sur la capacité des macrophages à répondre au traitement .	104
3.4. Caractérisation du contenu du milieu conditionné issu des cellules primaires de GBM	106
3.5. Rôle du phénotype des macrophages sur la formation d'adduit et la survie des cellules souches tumorales en réponse à des radiations ionisantes.....	106
4. Discussion.....	108

4.1. Impact du choix du protocole de différenciation et de polarisation des THP-1 sur les macrophages obtenus.....	109
4.2. La nomenclature des TAMs	110
4.3. Effet des cellules tumorales et de l'environnement sur le phénotype des THP-1.....	110
4.3.1. Influence des cellules de GBM sur la polarisation des TAMs	110
4.3.2. Influence Effet de l'état d'irradiation des cellules de GBM sur la polarisation des TAMs	111
4.3.3. Influence de l'environnement par rapport aux cellules tumorales sur la polarisation des TAMs.....	112
4.4. Le modèle d'étude de la tumeur.....	112
4.5. Les potentiels régulateurs de la polarisation des macrophages sécrétée par les cellules tumorales de GBM.....	113
4.6. Effet des macrophages sur la résistance aux radiations des cellules tumorales.....	113
4.7. Perspectives	114
Conclusion générale.....	116
Références bibliographiques.....	118

« Sometimes the only choices you have are bad ones. But you still have to choose. »

Doctor Who, 12th Doctor.

Introduction générale

Le glioblastome (GBM) est la forme de tumeur primitive du cerveau la plus fréquente et la plus agressive chez l'Homme. Le GBM est une tumeur d'origine astrocytaire. Les tumeurs de ce groupe sont classées selon des grades allant du moins agressif (grade I) au plus agressif (grade IV). Le GBM est pour le moment incurable. De nouvelles pistes thérapeutiques doivent donc être étudiées afin d'améliorer le pronostic des patients atteints par cette pathologie.

Les changements génétiques dans les cellules tumorales et leur microenvironnement participent à la résistance aux traitements et ainsi au mauvais pronostic. Le microenvironnement associé au GBM est très particulier. Il est issu du tissu neural (neurones, astrocytes, oligodendrocytes, cellules souches neurales) et du tissu non neural (endothélium vasculaire, péricytes, microglie, etc). Par ailleurs, le recrutement local de nouvelles populations cellulaires patrouillant le cerveau est habituellement très limité, mais sous l'influence du développement tumoral, il peut être accru ou limité créant alors un écosystème local corrompu affectant les contingents : vasculaire, inflammatoire, immunitaire, stromal, etc. Au sein du microenvironnement, la population cellulaire majoritaire est constituée par les macrophages associés à la tumeur (TAMs). Les TAMs sont impliqués dans plusieurs processus favorisant le développement tumoral incluant la prolifération des cellules tumorales, l'immunosuppression, etc.

Au sein d'une masse tumorale constituée de cellules de GBM hétérogènes, plusieurs populations peuvent être mise en cause dans la radio-résistance dont des clones cellulaires bien préparés ou des cellules définies comme des cellules cancéreuses de type souche (CSCs) ([Figure 1](#)). Les CSCs partagent de nombreux points communs avec les cellules souches neurales. Elles sont notamment décrites pour leur capacité à résister à la chimiothérapie et à la radiothérapie. La notion de hiérarchie dans les tumeurs a souligné l'intérêt de définir comment des CSCs étaient impliquées dans le processus tumoral et son adaptation (résistance, échappement) aux traitements. Les CSCs semblent donc remplir un rôle important dans les processus d'initiation de la tumeur et lors de la récurrence. Les cellules tumorales et le microenvironnement influençant la réponse au traitement, nous nous sommes intéressés aux interactions entre les cellules tumorales de GBM et les macrophages dans la réponse à un traitement par irradiation. Dans la première partie d'introduction, je ferai un rappel des grandes caractéristiques qui définissent un cancer. La deuxième partie s'intéressera à définir le GBM. La troisième partie présentera les différentes stratégies thérapeutiques employées contre le GBM. Dans la quatrième partie, j'introduirai des notions sur la radiothérapie et sur les effets biologiques induits par les radiations.

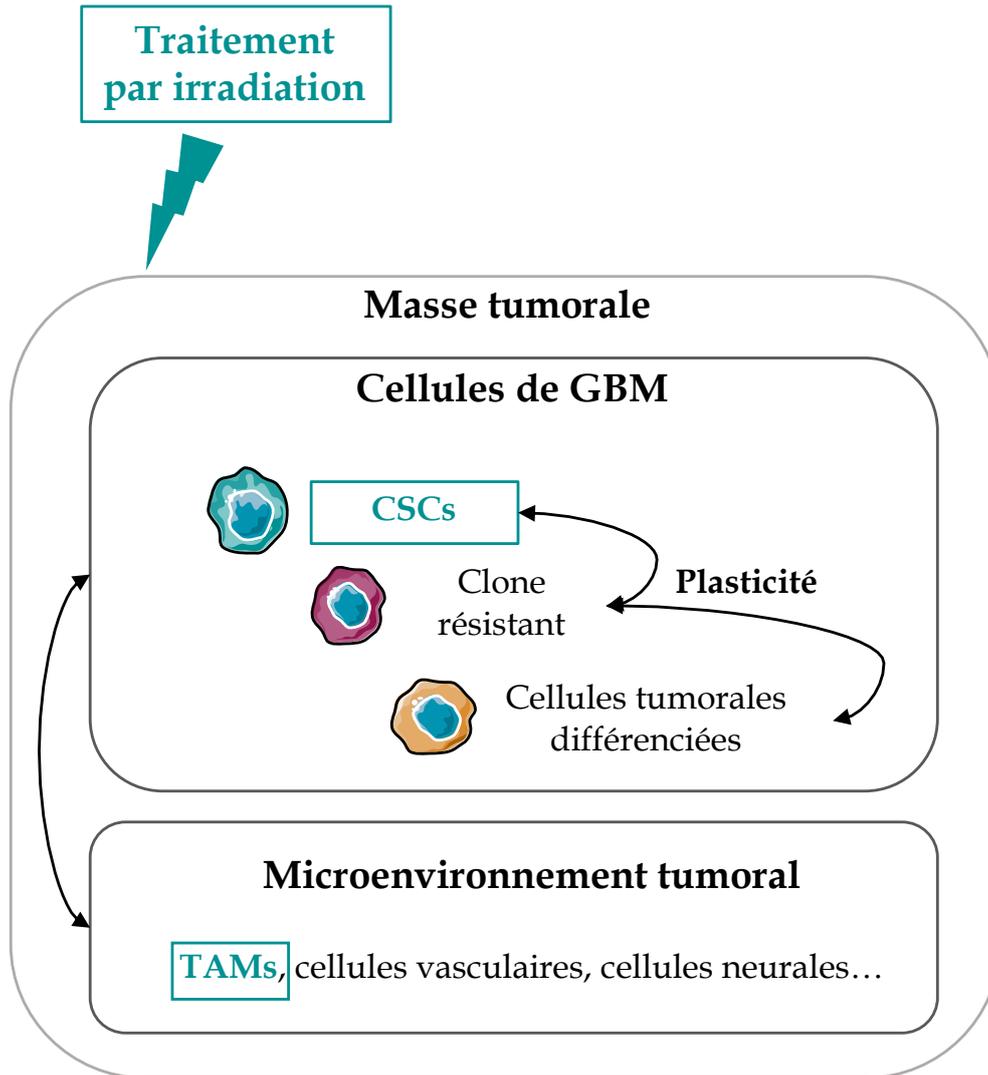


Figure 1 : Champ d'investigation de la thèse

État de l'art

1. Généralités sur les cancers

De nos jours, les cancers sont la seconde cause de décès dans le monde et ont provoqué 8,8 millions de décès en 2015 (<https://www.who.int/>). Un cancer est défini par une production anormale de cellules qui échappent au contrôle de l'organisme. Les cellules cancéreuses vont se multiplier indéfiniment et vont pouvoir atteindre différents organes. C'est un processus s'effectuant en plusieurs étapes au cours du temps. Les altérations génétiques et épigénétiques des cellules font partie du processus de transformation des cellules cancéreuses.

Dans les années 2000, Hanahan *et al.* ont défini les processus clés du comportement des cellules cancéreuses que l'on retrouve communément dans chaque type de cancer¹(Figure 2)^{2,3} :

- Immortalisation des cellules tumorales ;
- Insensibilité aux signaux suppresseurs de la prolifération ;
- Maintien des signaux de prolifération actif ;
- Modification du métabolisme cellulaire ;
- Induction de l'angiogenèse ;
- Résistance à la mort cellulaire ;
- Échappement au système immunitaire ;
- Mise en place d'un environnement inflammatoire ;
- Invasion et métastases ;
- Instabilités génomiques au sein des différentes populations de cellules tumorales. Ces instabilités vont participer à l'acquisition des différentes caractéristiques précédemment citées.

La tumeur va se développer au sein d'un microenvironnement complexe qui est constitué d'une population cellulaire hétérogène, composée notamment de cellules vasculaires, de fibroblastes et de cellules immunitaires infiltrantes. Ce microenvironnement contribue à la progression tumorale, mais aussi aux mécanismes de résistance aux traitements. En temps normal, le système immunitaire est capable de reconnaître ces cellules anormales et de les éliminer, les cellules tumorales sont capables d'échapper à cette immunosurveillance⁴.

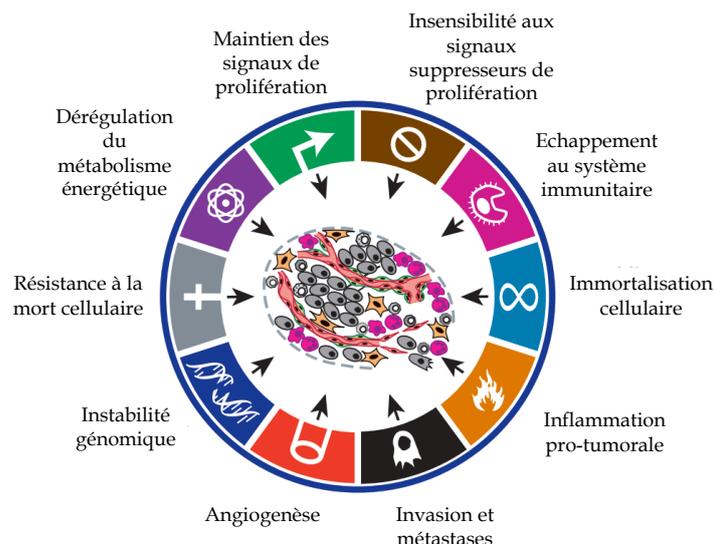


Figure 2 : Les marqueurs des cellules cancéreuses selon Hanahan et Weinberg (2011 et 2018).

2. Les glioblastomes

2.1. Épidémiologie

Le GBM est la tumeur cérébrale primitive la plus fréquente et la plus agressive chez l'humain. Son incidence est de 0,6 à 3,7 pour 100 000 personnes en fonction du pays⁵. Le GBM prédomine chez l'homme avec un ratio homme/femme de 1,5/1 et l'âge médian de diagnostic est de 64 ans⁶. La survie médiane après le diagnostic est d'environ 15 mois et le GBM récidive toujours après traitement

2.2. Symptômes et diagnostic

Les symptômes du GBM dépendent de la taille et de la localisation de la tumeur dans le cerveau. La zone touchée par la tumeur peut être impliquée dans des fonctions importantes (parole, mémoire par exemple). Les principaux signes cliniques associés au GBM sont des maux de tête, des nausées et/ou des vomissements, des troubles affectant la parole, la vision, le comportement, l'humeur, la mémoire et des crises d'épilepsie.

Cependant, les symptômes associés au GBM ne sont pas spécifiques à cette maladie et peuvent être communs à d'autres pathologies.

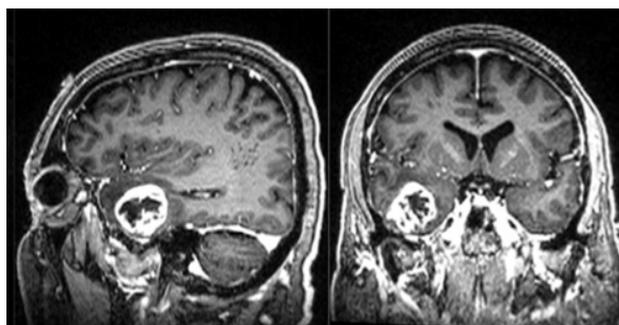


Figure 3 : Image d'un GBM obtenue par IRM d'après Chaichana *et al.* (2014).

Le diagnostic se fait en plusieurs étapes, le médecin va d'abord réaliser des examens neurologiques et cliniques (exercice musculaire, test de langage, test de mémoire...). Ensuite, des examens d'imagerie sont effectués pour compléter le diagnostic (scanner ou imagerie par résonance magnétique (IRM)).

Les images obtenues par IRM montrent que la tumeur forme une masse irrégulière (**Figure 3**). Son aspect est celui d'une lésion hétérogène présentant un contraste irrégulier dû à la présence de nécrose⁷, marqueur caractéristique du GBM.

Enfin, un examen anatomopathologique est réalisé lors de la biopsie⁸ et permet de confirmer le diagnostic. La caractérisation histologique se fait en observant des critères morphologiques *via* des colorations (Hématoxyline-Eosine) et des marquages immunohistochimiques (Marquage de Ki67, ...).

2.3. Classification des tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales sont un groupe de tumeurs très hétérogènes qui comprend de nombreux types de tumeurs malignes et non-malignes telles que les tumeurs épendymaires, astrocytaires et oligodendritiques⁹. Les gliomes, qui regroupent l'ensemble des tumeurs cérébrales d'origine astrocytaire ou oligodendrogliale, représentent plus de 80% des cas (**Figure 4**)^{10,7}. La nouvelle classification des tumeurs du système nerveux central (SNC) de 2016 a été réalisée afin d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients. Cette classification a permis de corréliser les critères histologiques dont font partie les régions vascularisées anarchiques et les zones nécrotiques avec les critères génomiques permettant de définir des groupes plus homogènes.

Les gliomes sont divisés en 4 grands groupes classés selon les grades I (le moins agressif) à IV (le plus agressif). Ces grades sont déterminés selon des critères anatomopathologiques, dont la densité cellulaire, l'activité mitotique, la présence d'angiogenèse et la présence de nécrose. Le Tableau 1

résume les différents types de gliomes et le grade qui leur est associé. Le GBM aussi appelé gliome de grade IV peut être divisé en deux catégories : les GBM primaires (90% des cas), et les GBM secondaires (10% des cas) (Tableau 2). Les GBM secondaires sont issus de gliomes de grades plus faibles et ils touchent généralement une population plus jeune. Au contraire, les GBM primaires apparaissent de manière spontanée. Ces deux types de GBM ne présentent pas les mêmes profils génétiques ni les mêmes marqueurs membranaires (Tableau 2). Néanmoins, ils sont identiques morphologiquement et cliniquement. Les caractéristiques anatomopathologiques d'un GBM selon la classification de l'OMS de 2016 sont une forte densité cellulaire, une forte activité mitotique et angiogénique et une forte présence de nécrose.

Grade	II	III	IV
Tumeurs diffuses astrocytaires et oligodendrogliales	Astrocytome diffus	Astrocytome anaplasique	GBM IDH-non muté
	Oligodendrogliome	Oligodendrogliome anaplasique	GBM IDH-muté
	Oligoastrocytome NOS	Oligoastrocytome anaplasique	Gliome diffus H3K27M muté

Tableau 1 : Tableau récapitulant les différents types de gliomes selon leur grade en fonction de la classification de l'OMS de 2016.

	GBM IDH non muté (primaire)	GBM IDH muté (secondaire)
Proportion des GBM	90%	10%
Âge médian de diagnostic	62 ans	44 ans
Moyenne de survie	15 mois	31 mois
TERT	72%	26%
TP53	27%	81%
ATRX	Rare	71%
EGFR	35%	Rare
PTEN	24%	Rare

Tableau 2 : Caractéristiques cliniques et moléculaires des GBM adaptées de Louis *et al.* (2016).

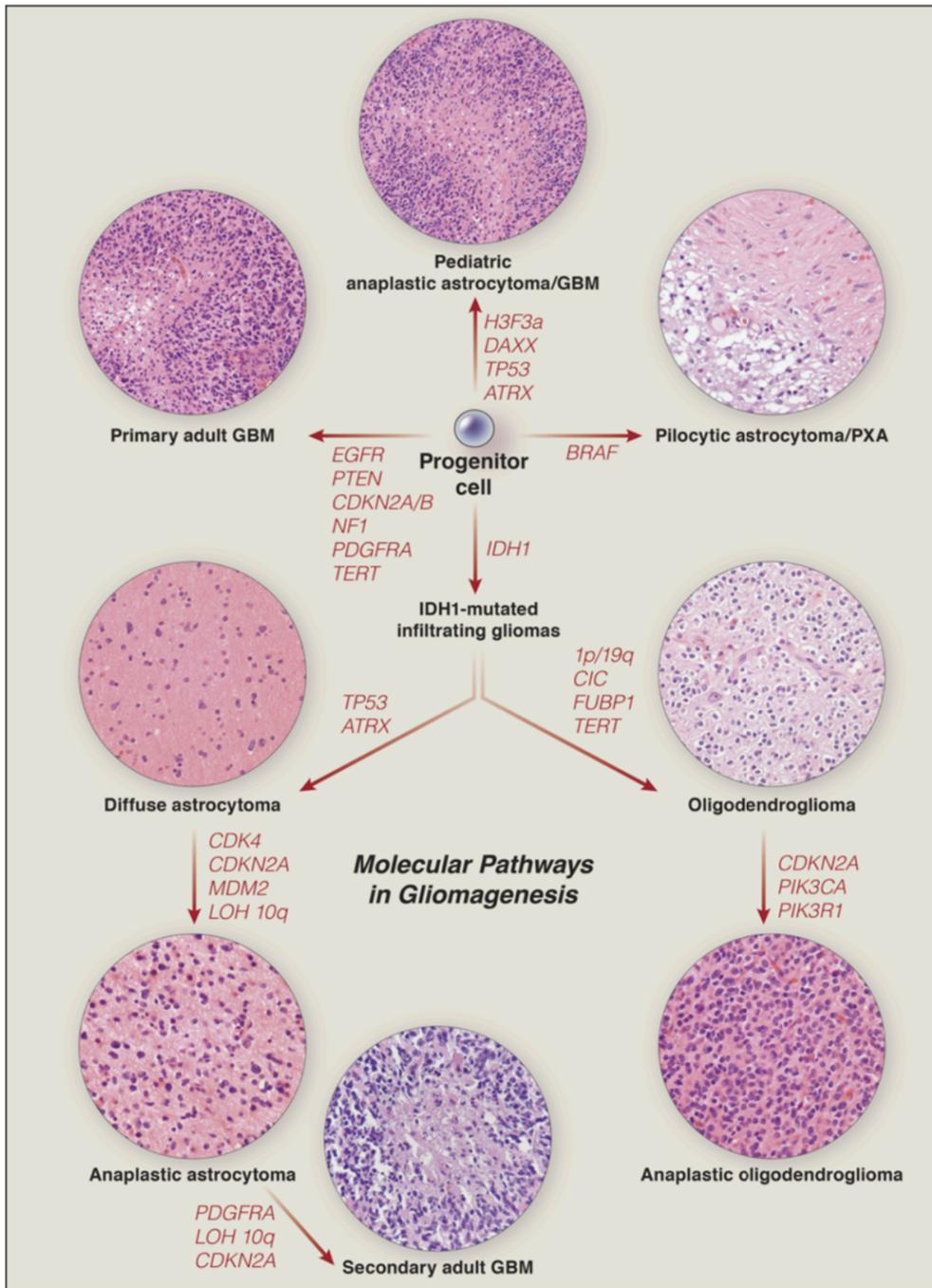


Figure 4 : Vue d'ensemble des mutations génétiques qui caractérisent les différentes formes de gliome d'après Apin *et al.* (2015).

2.4. Altérations génétiques et moléculaires dans le GBM

2.4.1. Modification chromosomique

Dans le GBM, plusieurs marqueurs sont analysés en biologie moléculaire, car ces marqueurs donnent des informations sur le pronostic et la réponse au traitement. Les marqueurs moléculaires les plus étudiés sont l'isocitrate déshydrogénase (IDH), la méthylation du promoteur de la O6 - méthylguanine-DNA méthyltransférase (MGMT), p53 et le récepteur du facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor receptor ou EGFR). Les patients dont le GBM est muté pour IDH1 ont un meilleur pronostic. Les GBM primaires se caractérisent généralement par une amplification d'EGFR, une délétion de p16INK4A et une mutation de PTEN¹². Les mutations de TP53 sont plus rares pour les GBM primaires¹³.

a) Amplification cytogénétique

Les remaniements chromosomiques participent ainsi à l'hétérogénéité tumorale dans le GBM¹⁴. Le remaniement le plus fréquent est celui du chromosome 10^{15,16}. Dans le cas des GBM primaires, une perte totale du chromosome 10 peut être observée. Les mutations de TP53 et PTEN ne donnent pas d'indications sur le pronostic^{17,18}. Il a aussi été observé que dans de nombreux cas de GBM, certaines régions du chromosome 7 sont amplifiées^{16,19,20}. D'autres altérations chromosomiques peuvent être retrouvées telles que 1p, 9p, 13q, 17p, 19q, 22q^{21,22}. La fréquence de ces altérations augmente avec la progression tumorale et l'agressivité du gliome (grade II à IV)²¹. Ces altérations chromosomiques conduisent à l'activation d'oncogène ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs favorisant ainsi le développement tumoral.

b) Gène de fusion

Les réarrangements chromosomiques participent à l'hétérogénéité tumorale et peuvent avoir pour conséquence la formation de gènes de fusion. Un gène de fusion se définit par la combinaison de deux fragments d'ADN bien distincts^{23,24}. Les deux fragments d'ADN qui fusionnent peuvent provenir du même chromosome ou de deux chromosomes différents. Dans le GBM, plus de 280 gènes de fusion ont pu être identifiés selon la base de données des gènes de fusion (<http://www.tumorfusions.org>). La fusion la plus décrite est celle de FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3) avec TACC3 (transforming acidic coiled-coil containing protein 3)²⁵. TACC3 est une protéine jouant un rôle dans le maintien de l'organisation des microtubules. Ce gène de fusion est impliqué dans la prolifération

des cellules tumorales. Une étude clinique de phase I a montré une toxicité tolérable et une réponse tumorale pour les GBM FGFR-TACC3⁺ traités avec JNJ-42756493, un inhibiteur de la phosphorylation de FGFR²⁶. Dans le GBM, la fusion EGFR-SEPT14 est la plus fréquente²⁷.

2.4.2. Principales voies de signalisation altérées

On retrouve des similarités entre les voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse et celles impliquées dans le développement embryonnaire tel que Wnt, Sonic Hedgehog protein (Shh), Bone Morphogenetic Protein (BMP) et Neurogenic locus Notch homologue protein (Notch)^{28,29}. D'autres voies de signalisation suivantes sont impliquées dans le développement des gliomes : p53, retinoblastoma (RB) et les récepteurs tyrosine kinase (RTK)³⁰.

Dans le GBM, les voies de signalisation les plus altérées impliquent des RTK, une grande famille de récepteurs cellulaires membranaires. Ils agissent notamment en tant que récepteurs pour des facteurs de croissance, des cytokines, ou bien des facteurs trophiques. Les RTK sont impliqués dans divers processus comme la prolifération cellulaire, la survie, la différenciation et l'angiogenèse. Leur implication a été décrite dans le GBM tel que la voie Ras/AKT^{18,31}, je m'attarderai sur les voies EGFR, VEGFR et PDGFR.

a) EGFR

EGFR est activé par différents ligands, dont EGF, dans le GBM et est impliqué dans plusieurs activités cellulaires, dont la prolifération, activation retrouvée dans plusieurs types de cancers³². Dans le cas du GBM, la suractivation de la voie EGF-EGFR est impliquée dans la croissance tumorale et la résistance aux traitements¹⁸. Une version tronquée d'EGFR peut être retrouvée dans le GBM (EGFR variant III (EGFRvIII)) et est activée de manière constitutive indépendamment du ligand. Son expression confère ainsi aux cellules tumorales une meilleure capacité à proliférer et à survivre^{33,34}. Chez les patients, cette mutation est néanmoins corrélée à un meilleur pronostic dans la mesure où ils répondent mieux au traitement. Par ailleurs, les cellules exprimant EGFRvIII sont plus facilement reconnues par le système immunitaire et sont ainsi éliminées³⁵.

b) VEGFR

Le récepteur VEGFR (Vascular endothelial growth factor Receptor) est un autre membre de la famille des RTK. L'axe de signalisation VEGFR/VEGF est impliqué dans la vasculogenèse et l'angiogenèse dans les tissus sains. Les GBM étant des tumeurs fortement vascularisées, on retrouve donc une forte

expression de VEGF^{18,36}. De plus, l'axe de signalisation VEGF/VEGFR, une cible de l'hypoxie, est régulé par HIF (Hypoxia Inducible Factors) permettant la production de vaisseaux sanguins³⁷.

c) PDGFR

Le facteur Platelet Derived Growth Factor (PDGFR) appartient à la famille des RTK. Lorsque le ligand PDGF se lie sur son récepteur, on a une activation de la voie de signalisation induisant la prolifération des cellules tumorales³⁸. Le ligand PDGF existe sous différentes formes, toutes actives et reconnues par leurs récepteurs. Les analyses de la base de données TCGA ont montré que dans 10% des cas de GBM, la forme PDGFR α est amplifiée entraînant une suractivation de sa signalisation³⁹.

2.5. Composition cellulaire du GBM

Le pronostic associé au GBM étant très mauvais, de nombreuses études se sont intéressées à mieux comprendre les mécanismes aboutissant à la mise en place de cette tumeur. À partir d'une origine astrocytaire, l'ensemble des populations cellulaires produites au sein de la tumeur au final hétérogène sont nécessaires à la formation de la tumeur⁴⁰. Néanmoins, les mécanismes de gliomagenèse restent encore mal définis aujourd'hui. Un parallèle est fait entre le développement du SNC et la gliomagenèse⁴¹. C'est donc sur ce modèle d'étude que nos connaissances sont actuellement basées. Les origines et la nature de la récurrence pour cette tumeur sont aujourd'hui un peu mieux comprises. Les avancées en génomique de ces dernières années ont permis d'établir différents sous-types de région au sein du GBM et d'identifier des populations de cellules souches de GBM. Au sein de la tumeur, les CSCs représentent une faible proportion des cellules tumorales²⁸. À la fois, la diversité des cellules tumorales et le microenvironnement tumoral participent à l'hétérogénéité tumorale. Le microenvironnement du GBM est très diversifié, car il est constitué de cellules résidentes du cerveau et de cellules infiltrant le cerveau (**Figure 5**).

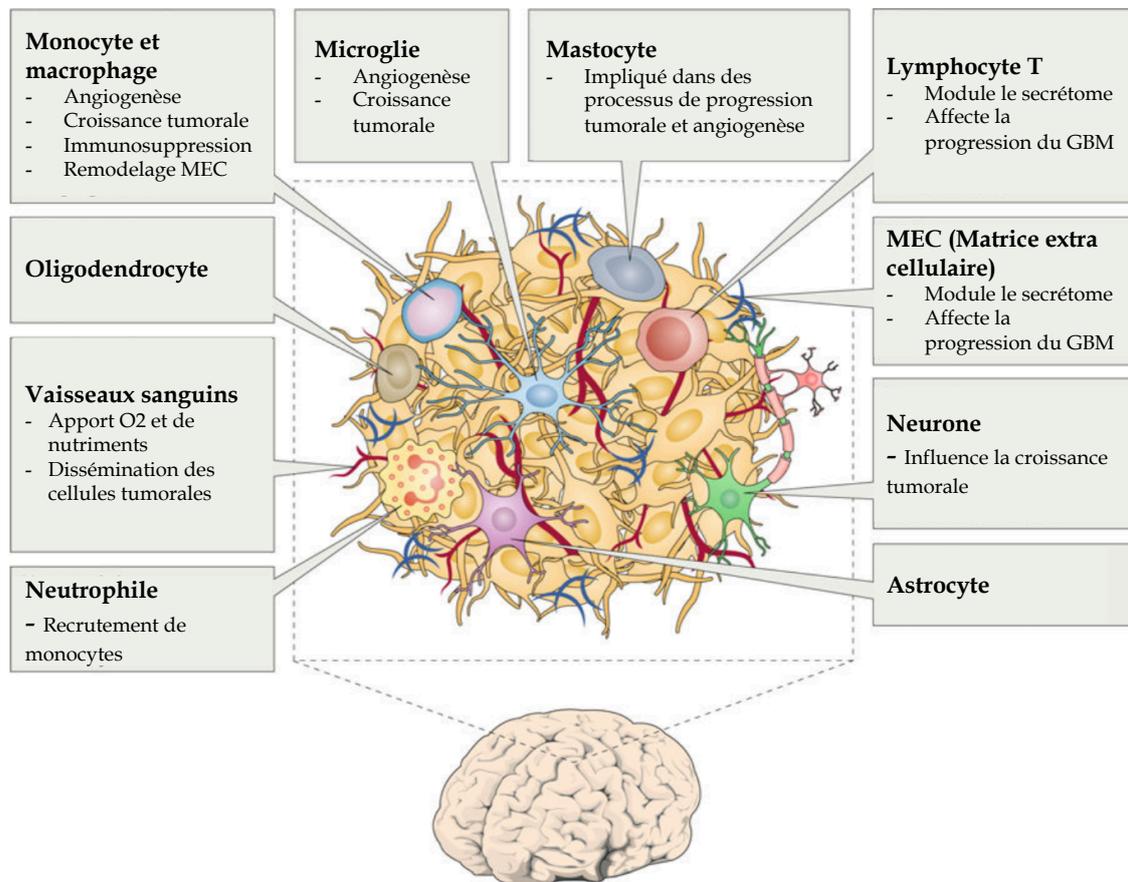


Figure 5 : Le microenvironnement du GBM d'après Broekman *et al.* (2018)

2.5.1. Les cellules tumorales

Les cellules tumorales sont la principale population cellulaire au sein de la tumeur et c'est une population très hétérogène. Cette hétérogénéité dans le GBM peut s'expliquer par l'existence de plusieurs sous-populations de cellules tumorales présentant un profil génomique différent⁴². La sélection progressive du clone le plus agressif, la plasticité des cellules tumorales et les cellules cancéreuses de type souche (CSCs) participent à l'hétérogénéité cellulaire du GBM. Le concept des CSCs a émergé dans les années 1970 et leur existence a été démontrée dans les années 2000 pour le GBM⁴³⁻⁴⁵. Les CSCs comme ayant un rôle dans la progression tumorale, dans la résistance aux traitements et dans la récurrence^{46,47}. La signature épigénétique, les gènes transcrits puis traduits, mais aussi le métabolisme des CSCs permet de distinguer cette population de cellules tumorales^{48,49}. Les CSCs possèdent des caractéristiques très spécifiques (**Figure 6**) :

- Autorenewement ;

- Initiation de la tumeur ;
- Capacité à se différencier et à redonner la masse tumorale dans son hétérogénéité ;
- Résistance à la radiothérapie ;
- Résistance à la chimiothérapie.

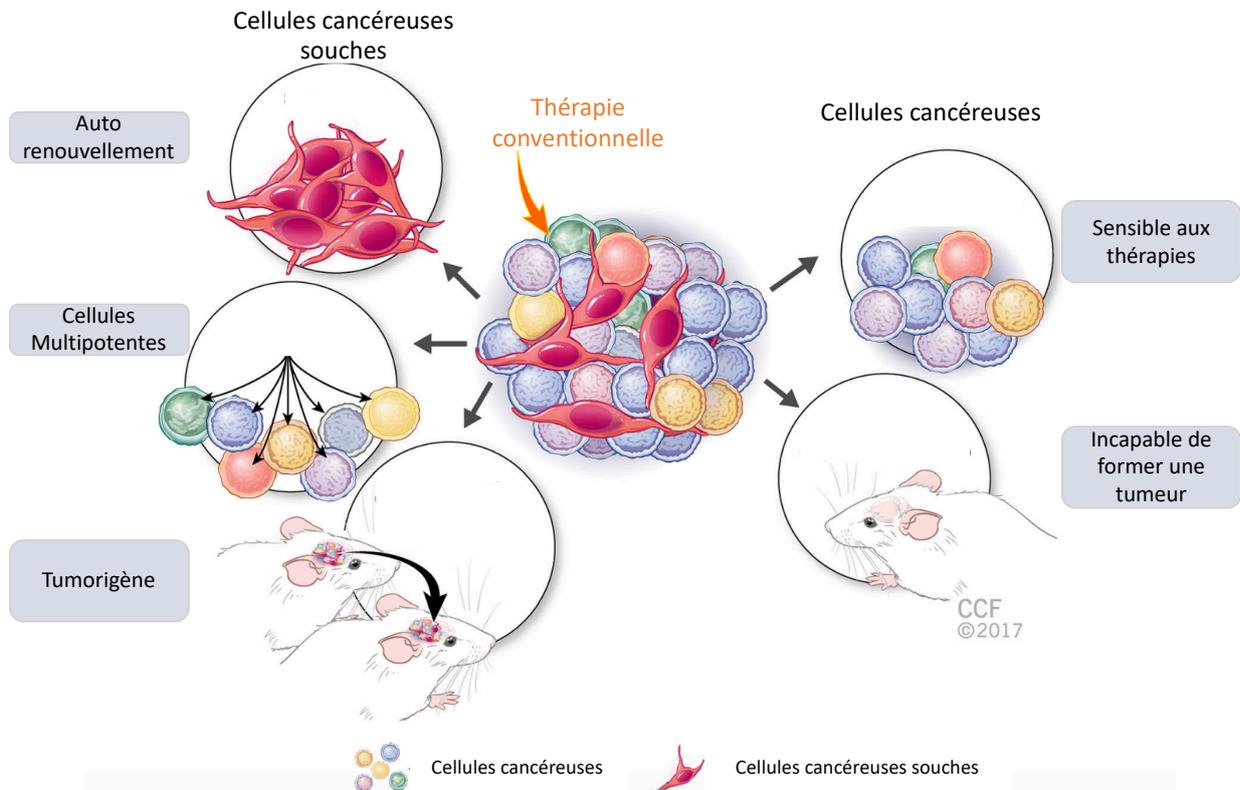


Figure 6 : Caractéristiques des cellules souches de GBM et des cellules tumorales d'après Abou-Antoun *et al.* (2017)

Les marqueurs permettant d'identifier les CSCs ainsi que d'autres détails importants seront décrits dans le chapitre 1. Les CSCs sont impliquées dans la récurrence et dans la résistance tumorale. Ces caractéristiques en font des cibles thérapeutiques particulièrement intéressantes. Il est donc important de mieux comprendre leur origine.

Il existe deux hypothèses permettant d'expliquer l'origine des CSCs dans les tumeurs solides (**Figure 7**). La théorie traditionnelle (Hierarchical rigidity) est basée sur un modèle hiérarchique et unidirectionnel. Dans ce modèle, les CSCs se divisent de manière symétrique, les cellules filles gardent les propriétés de la cellule mère. Une cellule fille peut aussi s'engager sur la voie de la différenciation selon une division asymétrique permettant d'obtenir des cellules tumorales différenciées. Dans ce

modèle, les CSCs trouveraient leur origine à partir des cellules souches neurales^{43,50}. Dans la seconde théorie (Hierarchical plasticity), plus récente, toutes les cellules tumorales sont dotées d'une forte plasticité cellulaire^{51,52}. Les cellules tumorales sont donc capables de passer d'un caractère peu différencié à des cellules tumorales différenciées.

Plus de détails sur les CSCs seront donnés au début du chapitre 1.

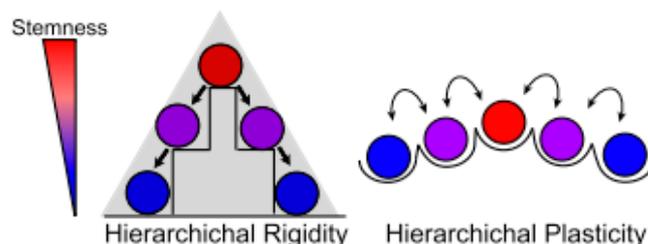


Figure 7 : Représentation schématique des deux modèles d'obtention des CSCs d'après Gimple *et al.* (2019)

2.5.2. Le contingent vasculaire

Le GBM est une tumeur très vascularisée et cette forte vascularisation est un facteur de mauvais pronostic pour les patients^{53,54}. Le cerveau est protégé des agents pathogènes et des toxines circulants dans le sang par la barrière hématoencéphalique qui fonctionne comme un filtre. La barrière étant sélective, uniquement ce qui doit être transmis au cerveau peut passer. La composition de la barrière hématoencéphalique est la suivante⁵⁵ (**Figure 8**) :

- Cellules endothéliales ;
- Pieds astrocytaires ;
- Lame basale ;
- Péricytes.

Au cours de la progression tumorale, cette barrière est altérée et son intégrité est perdue. L'angiogenèse induite par la tumeur conduit à l'altération de la barrière et donc à un passage beaucoup moins sélectif au niveau de celle-ci. Par exemple, les monocytes périphériques vont pouvoir être recrutés sur le site de la tumeur et vont en retour favoriser l'angiogenèse⁵⁶.

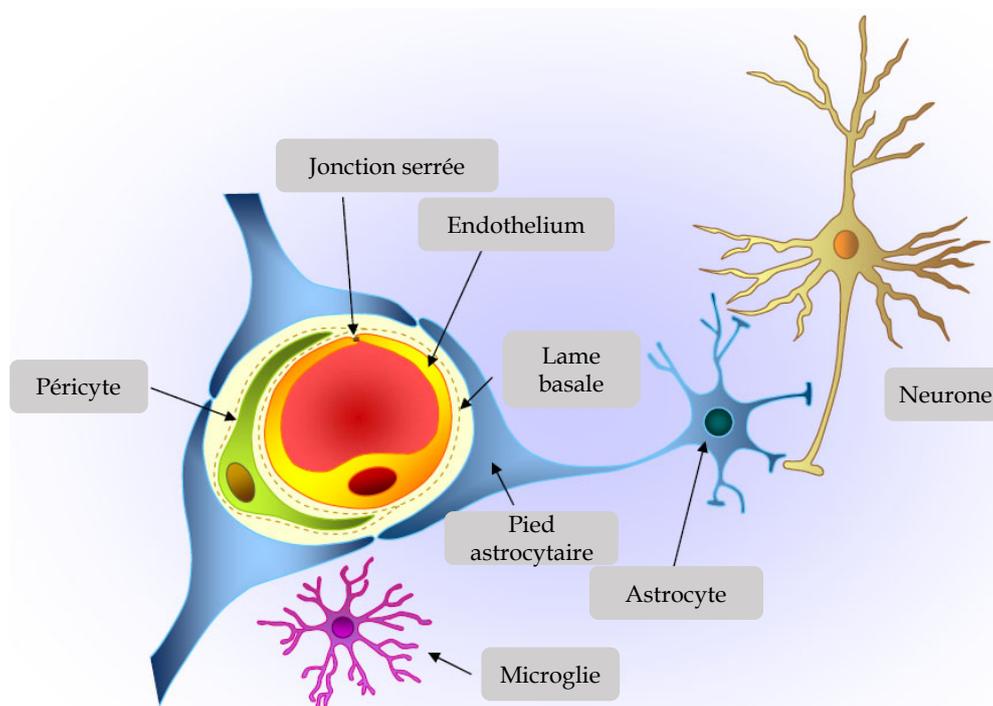


Figure 8 : Association des cellules formant la barrière hématoencéphalique d'après Abbott *et al.* (2010).

2.5.3. Le contingent immunitaire et inflammatoire

Les GBM présentent une forte infiltration en cellules immunitaires et inflammatoires. Les macrophages sont ainsi la principale population de cellules immunitaires présente au sein de la tumeur^{57,58}, suivis par les lymphocytes^{59,60}. Le SNC possède ses propres macrophages résidents appelés la microglie. Ces cellules assurent le rôle d'immunosurveillance au sein de cet organe. En temps normal, les macrophages issus de la circulation sanguine infiltrent très peu le cerveau qui est protégé par la barrière hématoencéphalique.

a) Les lymphocytes

Les lymphocytes sont les cellules immunitaires jouant un rôle dans la réponse du système immunitaire adaptatif. On distingue deux types de lymphocytes : les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B. Au sein de la tumeur, on retrouve majoritairement les différentes souspopulations de LT (CD4⁺ et CD8⁺). Une forte infiltration en LT CD4⁺ est corrélée à un mauvais pronostic pour le patient⁶¹. Les LT CD8⁺ ont plutôt un rôle anti-tumoral⁶²⁻⁶⁴ contrairement au LT CD4⁺ qui ont plutôt une activité pro-tumorale⁶⁵⁻⁶⁸. Les LT sont donc une population intéressante à cibler en thérapie. Dans

le GBM, l'expression de Programmed Cell Death-1 (PD-1) et Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4 (CTLA-4) par les LT sont des facteurs de mauvais pronostic^{69,70}.

b) La microglie et les macrophages périphériques

Au cours de la progression tumorale, des monocytes périphériques peuvent infiltrer la tumeur. Les monocytes d'origine sanguine vont se différencier en macrophages M0 en réponse à des stimuli après leur arrivée dans le cerveau. Puis, ces macrophages vont se polariser afin d'acquérir un phénotype spécialisé, toujours selon les stimuli qu'ils recevront.

Les macrophages résidents du cerveau ou la microglie colonisent le cerveau durant le développement embryonnaire⁷¹. La microglie comme les macrophages périphériques sont des cellules dotées d'une forte plasticité cellulaire et présentent un phénotype dépendant des facteurs environnementaux. La tumeur est impliquée dans le recrutement de la microglie et des macrophages périphériques via la synthèse de chimiokines et de cytokines^{72,73}. La microglie comme les macrophages périphériques semble être impliquée dans des processus induisant la prolifération des cellules tumorales⁷⁴.

Plus de détails sur les macrophages seront donnés dans le chapitre 2 et en début de chapitre 3.

2.5.4. Les cellules gliales et les neurones

La relation entre les cellules saines du cerveau, la tumeur et son microenvironnement est encore très peu étudiée. Cependant, elle nécessiterait une attention plus importante de notre part. Le cerveau est composé de cellules uniques à cet organe, retrouvé dans le microenvironnement tumoral. Quelques études décrivent ces cellules pour leur implication dans la croissance tumorale. Les astrocytes, en plus d'être les cellules à l'origine des gliomes, favorisent la croissance tumorale^{75,76}. Les astrocytes et les cellules tumorales interagissent ensemble et cette interaction induit une augmentation de l'expression de métalloprotéases (MMP) par les cellules tumorales^{77,78}. Les astrocytes semblent être impliqués dans la mise en place de mécanismes de résistance contre la chimiothérapie^{79,80}.

Les neurones sont également impliqués dans la progression tumorale⁸¹. La protéine neuroligin-3 (NLGN3), produite par les neurones, a été identifiée comme promoteur de la croissance tumorale⁸². D'autres facteurs sécrétés par les neurones favorisent l'angiogenèse⁸³. Le glutamate, un neurotransmetteur sécrété par les neurones, a également été décrit comme promoteur de la progression tumorale^{84,85}.

Les cellules gliales et les neurones sont aussi impliqués dans la polarisation des macrophages. Plus d'informations peuvent être trouvées dans le chapitre 2.

3. Les stratégies thérapeutiques dans le GBM

3.1. Stratégie thérapeutique classique

Depuis 2005, le protocole standard de thérapie contre le GBM est celui décrit par Stupp *et al.*⁸⁶. Les patients vont dans un premier temps subir une chirurgie, lorsque celle-ci est possible, afin d'enlever le maximum de masse tumorale. Ensuite, ils subissent un traitement concomitant de radio-chimiothérapie pendant 6 semaines qui sera ensuite suivi d'une chimiothérapie adjuvante⁸⁷⁻⁸⁹.

3.1.1. Chirurgie

La chirurgie est encore aujourd'hui la première phase de la prise en charge des patients atteints d'un GBM. Cette exérèse permet également de faire le diagnostic histologique de la tumeur. En fonction de la localisation de la tumeur, l'exérèse n'est pas toujours possible⁹⁰. En effet, en fonction de la région du cerveau touchée, la tumeur peut être enlevée totalement ou partiellement^{91,92}. Les données montrent qu'une exérèse supérieure à 90% de la tumeur impacte la survie du patient^{93,94}. Au vu de la nature infiltrante du GBM, des cellules sont retrouvées au niveau de la cavité de résection et jusqu'à une certaine distance de la tumeur. Ces cellules sont impliquées dans l'apparition de récurrence⁹⁵. Pour ces raisons, l'exérèse est suivie d'un traitement concomitant de radio-chimiothérapie basée sur le témozolomide (TMZ) afin d'éliminer les cellules tumorales résiduelles.

3.1.2. Chimiothérapie

Les patients vont ensuite être traités suivant un protocole de radio-chimiothérapie concomitante. Les patients reçoivent un traitement à base de TMZ comme agent de chimiothérapie. Une dose de 75 mg/m²/jour est administrée pendant 6 semaines consécutives, puis s'ensuit une pause de 4 semaines⁸⁷. Le traitement reprend ensuite à une dose entre 150 et 200 mg/m² pendant 5 jours sur un cycle de 28 jours. Ce cycle peut être répété 5 à 6 fois.

Le TMZ est un agent alkylant c'est-à-dire qu'il se lie sur un groupement alkyle (C_nH_{2n+1}) d'une base de guanine sur la molécule d'ADN⁹⁶. Cette liaison induit la formation d'adduit sur la molécule d'ADN. En réponse, les cellules vont activer les mécanismes de réparation de l'ADN. Cependant, s'il y a trop d'erreurs, cela conduira à la mort des cellules tumorales^{97,98}.

3.1.3. Radiothérapie

Les patients reçoivent des doses d'irradiation (Rayons X) de 2 Grays (Gy) par jour pendant 5 jours consécutifs et ne reçoivent rien pendant les 2 derniers jours de la semaine. Ce protocole est ensuite répété pendant 6 semaines dans le but d'atteindre une dose totale de 60 Gy. Afin de quantifier la dose utilisée pour la radiothérapie, l'unité choisie est le Gray (Gy). Cette unité représente l'énergie d'un Joule absorbée dans un gramme de matière.

3.2. Autres stratégies thérapeutiques

3.2.1. Gliadel

Une autre option thérapeutique dans le cas du GBM est d'utiliser des thérapies locales. Le GLIADEL® est un implant disponible depuis 2005 que le neurochirurgien place dans la cavité d'exérèse. Cet implant est imprégné de carmustine qui est un agent alkylant que l'on utilise en chimiothérapie. Cette méthode ne peut être utilisée que si l'exérèse est dite complète pour les tumeurs de haut grade. Le GLIADEL® peut être utilisé en cas de récurrence du GBM et pour les gliomes malins nouvellement diagnostiqués. Cependant, son efficacité et sa toxicité sont discutées dans la communauté scientifique^{99,100}.

3.2.2. Avastin

On peut également citer le bevacizumab (Avastin®), un antiangiogénique, qui n'a pas fourni les résultats escomptés en utilisation seule^{101,102}. L'avastin® est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF qui bloque la vascularisation des tumeurs sécrétant du VEGF. D'autres études cliniques sont en cours en combinaison avec d'autres stratégies thérapeutiques.

3.3. Nouvelles stratégies thérapeutiques

3.3.1. Immunothérapie

L'immunothérapie est apparue dans les années 1970 et a pour but de moduler ou de réactiver le système immunitaire contre la tumeur. L'immunothérapie désigne une vaste gamme de traitement qui va de la vaccination à l'utilisation de LT portant des récepteurs d'antigène chimérique (CAR). Une étude utilisant des cellules CAR-T qui cible IL13Rα2 a montré peu d'effet toxique ainsi qu'une régression du GBM¹⁰³. Dans le cas du GBM, plus de 100 études cliniques sont recensées avec seulement 18 études en cours sur le site : <https://clinicaltrials.gov/>. Les études précliniques sur les

inhibiteurs des points de contrôle (PD-1, PDL-1, CTLA4) ont montré de bons résultats. Cependant, les résultats obtenus dans les études cliniques n'ont pas montré la même efficacité^{104,105}.

3.3.2. Médicament radio-pharmaceutique

Les principaux isotopes actuellement utilisés sont l'yttrium-90, le lutétium-177 et le rhénium-188 pour les émetteurs β^- (électrons). Dans le cas des émetteurs α , les isotopes les plus étudiés sont le bismuth-213 et l'astate-211. Ces médicaments radio-pharmaceutiques peuvent se présenter sous forme d'une radiothérapie moléculaire (anticorps, peptides...) et d'une radiothérapie particulaire (nanoparticule par exemple)¹⁰⁶. Le vecteur a son importance puisque la distribution ne sera pas la même au sein de l'organisme (traitement local ou général).

Le rhénium-188 (Re-188) a été testé contre plusieurs types de cancer afin de montrer son efficacité en tant qu'agent thérapeutique. Ce radioélément est capable de diminuer la croissance tumorale dans des modèles de cancer du pancréas par exemple^{107,108}. Cependant, d'autres études ont montré la toxicité de ce composé¹⁰⁹. Notre équipe a montré que le Re-188 encapsulé dans des nanocapsules lipidiques augmente la survie de souris et de rats porteurs d'un GBM^{110,111}. L'injection de ces particules n'a pas démontré de toxicité chez la souris¹¹².

4. Radiothérapie et effets biologiques

4.1. La radiothérapie

4.1.1. Définition

La radiothérapie (RT) est l'utilisation de rayonnement ionisant dans un but thérapeutique pour détruire les cellules tumorales. Les différents types de rayonnement ont un effet biologique sur les cellules. Ces effets sont dépendants de la dose délivrée sur le tissu, du tissu ciblé, de l'âge du patient, de la sensibilité aux radiations. La radiothérapie existe depuis plus d'un siècle, c'est peu de temps après la découverte des rayons X qu'ils ont commencé à être utilisés pour traiter des cancers.

4.1.2. Méthodes de radiothérapie

Il existe plusieurs méthodes de radiothérapie ayant des sources différentes qui peuvent être externes ou interne (en implantant une source radioactive)^{113,114}. Les méthodes de radiothérapie ayant des sources externes à notre disposition sont :

- La radiothérapie dite classique basée sur des photons (rayons X). C'est la principale source de traitement. Avec cette méthode, nous pouvons délivrer la dose souhaitée à l'endroit désirée en adaptant le faisceau.
- La radiothérapie à base de protons. Cette technique permet d'envoyer un faisceau de protons sur la lésion. Cette technique est plutôt utilisée en cas d'irradiation de tissus sensibles.
- La radiothérapie stéréotaxique qui est une technique d'irradiation de haute précision pour une lésion. Pour cette technique, des rayons gamma sont émis. Les patients vont donc recevoir une forte dose d'irradiation qui sera très peu fractionnée. On retrouve deux catégories distinctes pour ce type de radiothérapie:
 - o Tomothérapie ;
 - o Cyberknife.

Ensuite, pour les méthodes de radiothérapie ayant une source en interne, nous avons actuellement à notre disposition :

- La brachythérapie qui permet une délivrance de doses très fortes sur une courte distance.
- La radiothérapie moléculaire qui est l'utilisation de médicaments radiopharmaceutiques pour irradier les cellules tumorales (Radium-223, Rhénium-188...).

4.1.3. Types de rayonnement

Il existe différents types de rayonnement dans la nature (**Figure 9**)¹¹⁴ :

- Les rayons X sont une forme de rayonnement électromagnétique à haute fréquence constitué de photons. Ce type de rayonnement, très pénétrant, est utilisé en RT et en imagerie.
- Les rayons γ proviennent de la désintégration radioactive du noyau d'un atome. Ils sont plus pénétrants que les rayons β et α , mais ils sont moins ionisants. Ils ont la même nature que les rayons X, mais n'ont pas la même origine.
- Les rayons β sont un autre type de désintégration radioactive qui mène à l'émission d'une particule β (électron ou positon). C'est un type de rayonnement plus pénétrant que le rayonnement α . Cependant, une feuille métallique suffit à arrêter ce type de rayonnement.

- Les rayons α sont une autre forme de désintégration radioactive qui mène à l'émission d'une particule α (un noyau d'hélium 4). C'est un rayonnement très peu pénétrant qui est arrêté par une simple feuille de papier.

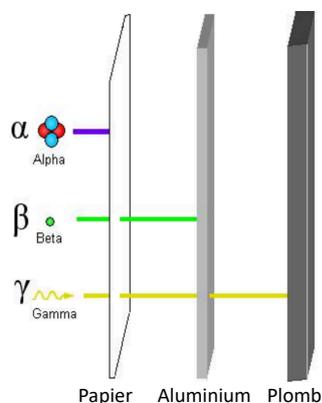


Figure 9 : Pouvoir pénétrant des différents types de rayonnement ionisant adapté de Oatway *et al.* (2009).

4.2. Les effets biologiques induit par la radiothérapie

4.2.1. Les dommages à l'ADN

Les effets biologiques induits sur les cellules tumorales en réponse à des rayonnements ionisants sont dépendants de plusieurs critères tels que la dose utilisée, le fractionnement de cette dose, et la radiosensibilité des cellules tumorales. Ainsi, les conséquences induites par les rayonnements ionisants sur les cellules peuvent être directes ou indirectes¹¹⁵ (**Figure 10**). Les radiations peuvent aussi entraîner un effet que l'on appelle « bystander » sur les cellules avoisinant la région irradiée¹¹⁶.

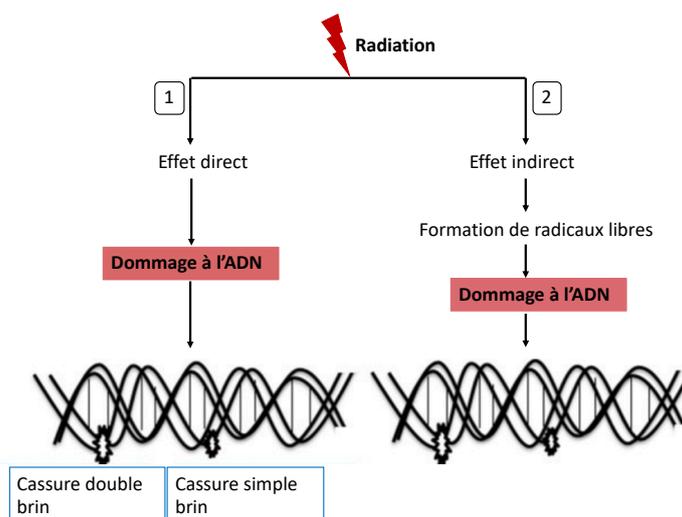


Figure 10 : Action des rayonnements ionisants sur les cellules, schéma adapté de Baskar *et al.* (2014).

(1) Les rayonnements ionisants ont un effet direct sur les cellules en causant des cassures simples ou doubles brins sur l'ADN. (2) Les rayonnements ont aussi des effets indirects et conduisent à la formation de radicaux libres entraînant des dommages à l'ADN.

a) Effets directs

Les rayonnements ionisants entraînent des effets directs sur les cellules irradiées. L'énergie que ceux-ci entraînent va induire une cassure sur un brin d'ADN. La cassure peut être de deux types : soit une cassure simple brin, soit une cassure double brin^{115,117,118}. L'irradiation, en plus d'avoir un effet direct sur l'ADN, peut aussi avoir un effet sur d'autres molécules intracellulaires comme les protéines¹¹⁹. Ces dommages vont généralement conduire à la mort des cellules tumorales. La capacité des cellules tumorales à réparer les adduits à l'ADN varie. En effet, les cellules tumorales ne possèdent pas toutes la même sensibilité aux irradiations et certaines de ces cellules vont être résistantes au traitement¹²⁰⁻¹²². Ces dernières vont être sélectionnées et cela participe au maintien des instabilités génomiques qui favorisent les mécanismes de radorésistance. Les rayonnements ont d'autres conséquences directes telles que : des oxydations de bases, des pontages, la perte d'une base, ou des liaisons ADN-protéine¹²³.

b) Effets indirects

Les rayonnements ionisants peuvent aussi avoir des effets indirects sur les cellules irradiées. Ils peuvent interagir avec des molécules d'eau présentes dans le corps humain (70%). Cette interaction conduit à la formation de radicaux libres à partir des molécules d'eau, qui vont ensuite provoquer la

formation de plusieurs espèces réactives de l'oxygène (ROS)^{123,124}. La présence de ROS dans les cellules tumorales mène à une altération globale des fonctions cellulaires, dont la destruction de la membrane lipidique^{125,126}.

c) Effet bystander

L'effet bystander peut se définir de la façon suivante : les cellules non irradiées qui sont adjacentes ou à distance des cellules irradiées vont démontrer une réponse très similaire aux cellules ayant été irradiées directement. De nombreuses études se sont intéressées à l'effet bystander ces dernières années. Ces études ont montré que les rayonnements ont un effet sur les cellules présentes dans la zone irradiée, mais peuvent aussi avoir des effets à distance. En effet, les cellules adjacentes à la région irradiée vont aussi subir des dommages liés à cette irradiation¹²⁷. L'effet bystander peut conduire à des effets très similaires à ceux produits par une irradiation directe sur les cellules c'est-à-dire la production de dommage sur les molécules (ADN, protéines...) et à la mort des cellules¹²⁸.

4.2.2. Les effets cellulaires

a) Mort cellulaire

Les rayonnements ionisants induisent différents types de morts cellulaires pouvant être de l'apoptose, de la nécrose, de l'autophagie, une catastrophe mitotique ou juste une induction en sénescence des cellules^{129,130}. Les cascades de signalisation impliquées dans ces différents types de morts cellulaires ne sont pas les mêmes. Les différentes voies de signalisation induites par les radiations peuvent être visualisées dans la **Figure 11**. L'activation des voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose dans les cellules irradiées peut avoir lieu après irradiation¹³¹. Les cellules irradiées peuvent aussi entrer en sénescence médiée par l'axe de signalisation p53/p21^{132,133}. Dans la cellule irradiée, l'activation d'ATM (ataxia telangiectasia mutated) et p53, conduit à une mort cellulaire par autophagie¹³⁴. La nécrose peut également être induite par les rayonnements ionisants, mais les mécanismes y menant ne sont pas encore clairement élucidés^{135,136}.

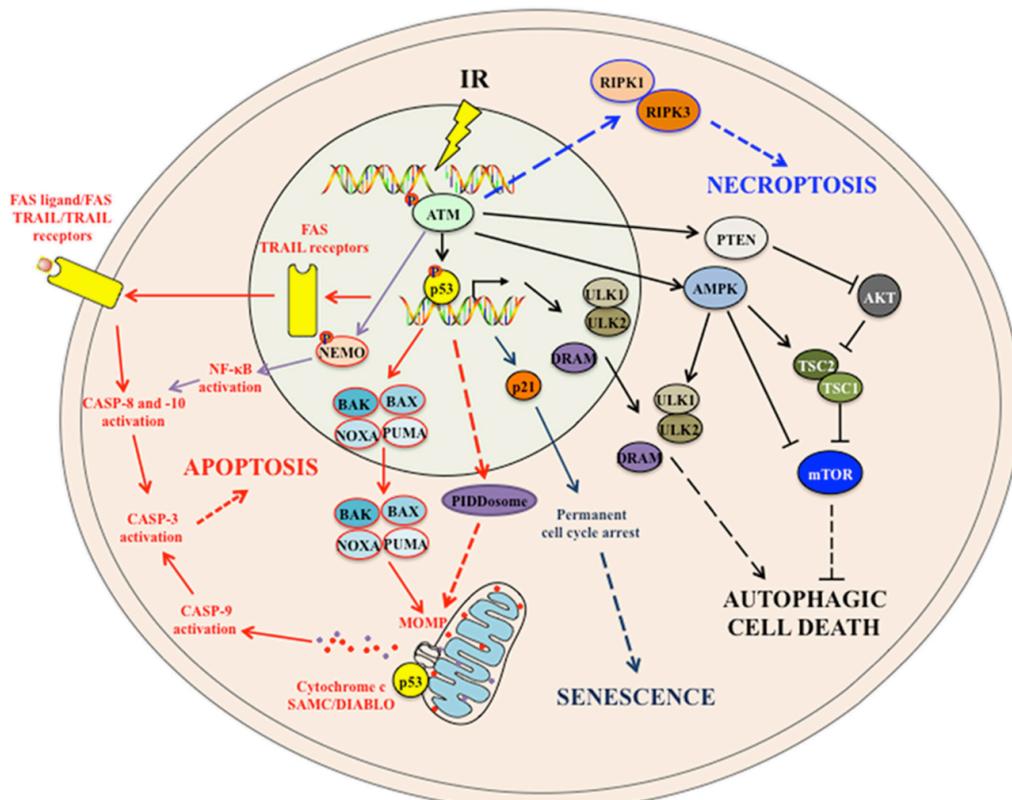


Figure 11 : Représentation des voies de signalisation pouvant être activées après irradiation d'après Quiji Wu *et al.* (2017)

b) Réparation de l'ADN

Les cellules disposent d'un arsenal de mécanismes permettant la réparation de l'ADN endommagé. Ces processus de correction vont avoir pour but de réparer de manière fidèle les cassures simple brin (CSB) (**Figure 12**) : les systèmes BER (base excision repair), NMR (mismatch mediated repair), NER (nucleotide excision repair) vont remplir ce rôle. Les cassures double brin (CDB) vont être réparées par les systèmes HDR (homology directed repair) et NHEJ (nonhomologous end-joining)¹³⁷.

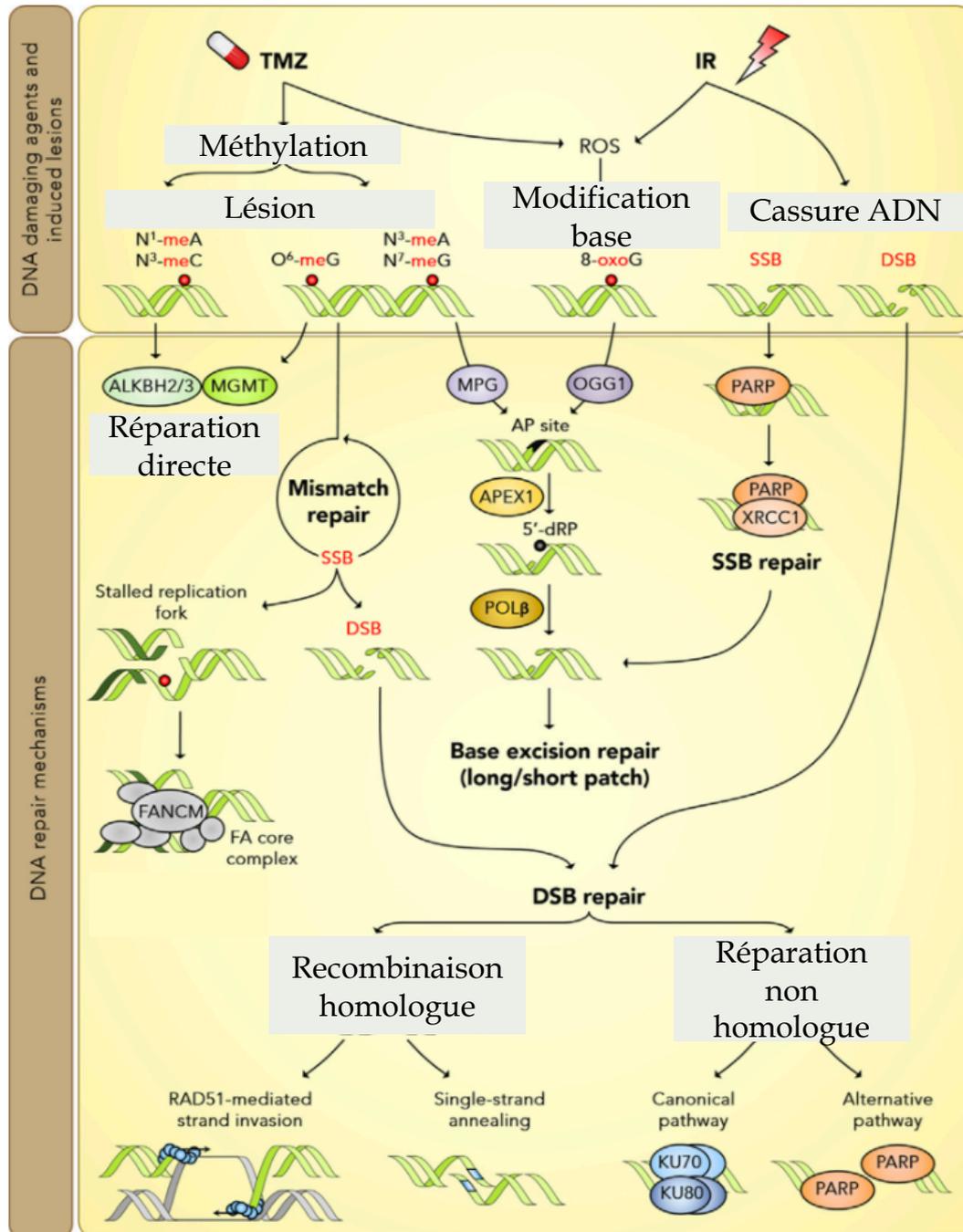


Figure 12: Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans la formation de lésions par le TMZ et les rayonnements ionisants, puis des mécanismes impliqués dans la réparation de ces lésions d'après Erasmus *et al.* (2016).

Objectif de la thèse

Comme expliqué précédemment, le GBM est le cancer du cerveau le plus fréquent et le plus agressif chez l'Homme. Son pronostic est très mauvais avec une survie en moyenne de 15 mois après diagnostic. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le GBM est une tumeur avec une forte hétérogénéité cellulaire. Le microenvironnement tumoral et les différents clones tumoraux participent directement à cette hétérogénéité. En effet, au sein de la tumeur, plusieurs populations de cellules tumorales sont décrites, allant des cellules différenciées aux CSCs. Ces dernières présentent un phénotype radiorésistant. Les TAMs représentent environ 30% de la masse tumorale et ont une activité protumorale (croissance tumorale, immunosuppression et d'angiogenèse). Les macrophages pourraient donc être une cible thérapeutique intéressante dans le cas du GBM.

Nous avons donc émis l'hypothèse que les cellules tumorales et plus particulièrement les CSCs jouent un rôle important dans la polarisation des TAMs nouvellement recrutés sur le site de la tumeur. En retour, ces TAMs joueraient un rôle sur la réponse aux radiations ionisantes. De plus, il existe peu d'études sur les interactions cellules tumorales et macrophages dans le cerveau dans la réponse aux rayonnements ionisants.

i) Le premier objectif de ma thèse a été d'initier la mise en place d'une **collection de cellules primaires de GBM**. Cette collection va nous permettre d'obtenir des cellules de GBM possédant des profils génomiques différents dans le but de mettre en évidence de nouvelles cibles radio-sensibilisantes.

ii) Le second objectif de ma thèse a été de **mieux comprendre les interactions entre les CSCs de GBM et les macrophages dans la réponse aux rayonnements ionisants**. Nous nous sommes intéressés à deux aspects de ces interactions.

- Nous avons d'abord cherché à mieux caractériser l'influence des cellules tumorales et de leur état d'irradiation sur le phénotype des macrophages.
- Puis, nous nous sommes aussi intéressés à étudier l'influence du phénotype des macrophages sur la réponse des cellules tumorales à une irradiation.

Références bibliographiques

1. Hanahan, D., Weinberg, R. A. & Francisco, S. Cavallo et al. - 2011 - 2011 the immune hallmarks of cancer.pdf. **100**, 57-70 (2000).
2. Hanahan, D. *et al.* Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-74 (2011).
3. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Biological Hallmarks of cancer. *Holland-Frei cancer Med.* 1-10 (2017). doi:10.1002/9781119000822.hfcm002
4. Laug, D., Glasgow, S. M. & Deneen, B. A glial blueprint for gliomagenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* **19**, 393-403 (2018).
5. Ostrom, Q. T., Cote, D. J., Ascha, M., Kruchko, C. & Barnholtz-Sloan, J. S. Adult glioma incidence and survival by race or ethnicity in the United States from 2000 to 2014. *JAMA Oncol.* **4**, 1254-1262 (2018).
6. Thakkar, J. P. *et al.* Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **23**, 1985-1996 (2014).
7. Young, R. M., Jamshidi, A., Davis, G. & Sherman, J. H. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Ann. Transl. Med.* **3**, 1-15 (2015).
8. Chaichana, K. L. *et al.* When Gross Total Resection of a Glioblastoma Is Possible, How Much Resection Should Be Achieved? *World Neurosurg.* **82**, e257-e265 (2014).
9. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* **131**, 803-820 (2016).
10. Diwanji, T. P., Engelman, A., Snider, J. W. & Mohindra, P. Epidemiology, diagnosis, and optimal management of glioma in adolescents and young adults. *Adolesc. Health. Med. Ther.* **Volume 8**, 99-113 (2017).
11. Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97-109 (2007).
12. Appin, C. L. & Brat, D. J. Molecular pathways in gliomagenesis and their relevance to neuropathologic diagnosis. *Adv. Anat. Pathol.* **22**, 50-58 (2015).
13. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* **170**, 1445-1453 (2007).
14. Godek, K. M. *et al.* Chromosomal instability affects the tumorigenicity of glioblastoma tumor-initiating cells. *Cancer Discov.* **6**, 532-545 (2016).
15. Pershouse, M. A. *et al.* Analysis of the Functional Role of Chromosome 10 Loss in Human Glioblastomas. *Cancer Res.* **53**, 5043-5050 (1993).
16. Del Mar Inda, M. *et al.* Chromosomal abnormalities in human glioblastomas: Gain in chromosome 7p correlating with loss in chromosome 10q. *Mol. Carcinog.* **36**, 6-14 (2003).
17. McLendon, R. *et al.* Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061-1068 (2008).
18. Pearson, J. R. D. & Regad, T. Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2**, 1-11 (2017).
19. Beroukhim, R. *et al.* Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: Methodology and application to glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 20007-20012 (2007).

20. Crespo, I. *et al.* Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am. J. Pathol.* **185**, 1820–1833 (2015).
21. Rasheed, A. *et al.* Molecular markers of prognosis in astrocytic tumors. *Cancer* **94**, 2688–2697 (2002).
22. Smith, J. S. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front. Biosci.* **5**, d213 (2000).
23. Forment, J. V., Kaidi, A. & Jackson, S. P. Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 663–670 (2012).
24. Leibowitz, M. L., Zhang, C.-Z. & Pellman, D. Chromothripsis: A New Mechanism for Rapid Karyotype Evolution. *Annu. Rev. Genet.* **49**, 183–211 (2015).
25. Singh, D. *et al.* Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science* **337**, 1231–5 (2012).
26. Di Stefano, A. L. *et al.* Detection, Characterization, and Inhibition of FGFR-TACC Fusions in IDH Wild-type Glioma. *Clin. Cancer Res.* **21**, 3307–3317 (2015).
27. Frattini, V. *et al.* The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma. *Nat. Genet.* **45**, 1141 (2013).
28. Qiang, L. *et al.* Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett.* **279**, 13–21 (2009).
29. Kondo, T. Molecular mechanisms involved in gliomagenesis. *Brain Tumor Pathol.* **34**, 1–7 (2017).
30. Zhu, H. *et al.* Transcriptional Repression of p53 by PAX3 Contributes to Gliomagenesis and Differentiation of Glioma Stem Cells. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 1–12 (2018).
31. Regad, T. Targeting RTK signaling pathways in cancer. *Cancers (Basel)*. **7**, 1758–1784 (2015).
32. Nicholson, R. I., Gee, J. M. W. & Harper, M. E. EGFR and cancer prognosis. *Eur. J. Cancer* **37**, 9 (2001).
33. Huang, P. H., Xu, A. M. & White, F. M. Networks in Glioma. **2**, 1–13 (2009).
34. An, Z., Aksoy, O., Zheng, T., Fan, Q. W. & Weiss, W. A. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: Signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene* **37**, 1561–1575 (2018).
35. Felsberg, J. *et al.* Epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) positivity in EGFR-amplified glioblastomas: Prognostic role and comparison between primary and recurrent tumors. *Clin. Cancer Res.* **23**, 6846–6855 (2017).
36. Steiner, H. H. *et al.* Autocrine pathways of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in glioblastoma multiforme: Clinical relevance of radiation-induced increase of VEGF levels. *J. Neurooncol.* **66**, 129–138 (2004).
37. Shibuya, M. Structure and Function of VEGF/VEGF-receptor System Involved in Angiogenesis. *Cell Struct. Funct.* **26**, 25–35 (2001).
38. Nazarenko, I. *et al.* PDGF and PDGF receptors in glioma. *Ups. J. Med. Sci.* **117**, 99–112 (2012).
39. Cameron W. Brennan, Roel G.W. Verhaak, Aaron McKenna, Benito Campos, Houtan Noushmehr, Sofie R. Salama, Siyuan Zheng, Debyani Chakravarty, J. Zachary Sanborn, Samuel H. Berman, Rameen Beroukhim, Brady Bernard, Chang-Jiun Wu, Giannicola

- Genovese, Ilya Shmu, L. C. NIH Public Access - The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* **155**, 462-477 (2014).
40. Hulleman, E. & Helin, K. Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv. Cancer Res.* **94**, 1-27 (2005).
 41. Llaguno, S. R. A. & Parada, L. F. Cell of origin of glioma : biological and clinical implications. **115**, 1445-1450 (2016).
 42. Yao, M. *et al.* Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 737-739 (2018).
 43. Singh, S. K. *et al.* Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res.* **63**, (2003).
 44. Hemmati, H. D. *et al.* Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 15178-15183 (2003).
 45. Cipelletti, B. *et al.* Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma. *Cancer Res.* **64**, 7011-7021 (2005).
 46. Flavahan, W. A. *et al.* Cancer Stem Cell-Secreted Macrophage Migration Inhibitory Factor Stimulates Myeloid Derived Suppressor Cell Function and Facilitates Glioblastoma Immune Evasion. *Stem Cells* **34**, 2026-2039 (2016).
 47. Liebelt, B. D. *et al.* Glioma Stem Cells: Signaling, Microenvironment, and Therapy. *Stem Cells Int.* **2016**, 1-10 (2016).
 48. Turpin, A. *et al.* The stem cell niche in glioblastoma: From fundamental aspects to targeted therapies. *Bull. Cancer* **102**, 24-33 (2015).
 49. Colwell, N. *et al.* Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: Shaping the phenotype of cancer stem-like cells. *Neuro. Oncol.* **19**, 887-896 (2017).
 50. Garnier, D., Renoult, O., Alves-Guerra, M.-C., Paris, F. & Pecqueur, C. Glioblastoma Stem-Like Cells, Metabolic Strategy to Kill a Challenging Target. *Front. Oncol.* **9**, 1-18 (2019).
 51. Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E. R. & Morrison, S. J. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell* **138**, 822-829 (2009).
 52. Kreso, A. *et al.* Self-renewal as a therapeutic target in human colorectal cancer. *Nat. Med.* **20**, 29-36 (2014).
 53. Qiu, X. X. *et al.* The Vascular Notch Ligands Delta-Like Ligand 4 (DLL4) and Jagged1 (JAG1) Have Opposing Correlations with Microvascularization but a Uniform Prognostic Effect in Primary Glioblastoma: A Preliminary Study. *World Neurosurg.* **88**, 447-458 (2016).
 54. Lagerweij, T. *et al.* Optical clearing and fluorescence deep-tissue imaging for 3D quantitative analysis of the brain tumor microenvironment. *Angiogenesis* **20**, 533-546 (2017).
 55. Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R. & Begley, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**, 13-25 (2010).
 56. Kaal, E. C. A. & Vecht, C. J. The management of brain edema in brain tumors. *Curr. Opin. Oncol.* **16**, 593-600 (2004).
 57. Hussain, S. F. *et al.* The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro. Oncol.* **8**, 261-279 (2006).

58. Charles, N. A., Holland, E. C., Gilbertson, R., Glass, R. & Kettenmann, H. The brain tumor microenvironment. *Glia* **59**, 1169–1180 (2011).
59. Orrego, E. *et al.* Distribution of tumor-infiltrating immune cells in glioblastoma. *CNS Oncol.* **7**, CNS21 (2018).
60. Klopfenstein, Q., Truntzer, C., Vincent, J. & Ghiringhelli, F. Cell lines and immune classification of glioblastoma define patient's prognosis. *Br. J. Cancer* **120**, 806–814 (2019).
61. Sayour, E. J. *et al.* 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.* **64**, 419–427 (2015).
62. Smyth, M. J., Dunn, G. P. & Schreiber, R. D. Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. *Adv. Immunol.* **90**, 1–50 (2006).
63. Han, S. *et al.* Tumour-infiltrating CD4 + and CD8 + lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br. J. Cancer* **110**, 2560–2568 (2014).
64. Woroniecka, K. & Fecci, P. E. T-cell exhaustion in glioblastoma. *Oncotarget* **9**, 35287–35288 (2018).
65. Humphries, W., Wei, J., Sampson, J. H. & Heimberger, A. B. The role of tregs in glioma-mediated immunosuppression: potential target for intervention. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **21**, 125–137 (2010).
66. Kim, Y. H. *et al.* Tumour-infiltrating T-cell subpopulations in glioblastomas. *Br. J. Neurosurg.* **26**, 21–27 (2012).
67. See, A. P., Parker, J. J. & Waziri, A. The role of regulatory T cells and microglia in glioblastoma-associated immunosuppression. *J. Neurooncol.* **123**, 405–412 (2015).
68. Li, P. *et al.* Novel therapy for glioblastoma multiforme by restoring LRRC4 in tumor cells: LRRC4 inhibits tumor-infiltrating regulatory T cells by cytokine and programmed cell death 1-containing exosomes. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
69. Kim, J. E. *et al.* Combination therapy with anti-PD-1, anti-TIM-3, and focal radiation results in regression of murine gliomas. *Clin. Cancer Res.* **23**, 124–136 (2017).
70. Huang, J. *et al.* Immune checkpoint in glioblastoma: Promising and challenging. *Front. Pharmacol.* **8**, (2017).
71. Ginhoux, F. & Prinz, M. Origin of microglia: Current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, 1–16 (2015).
72. Ku, M. C. *et al.* GDNF mediates glioblastoma-induced microglia attraction but not astrogliosis. *Acta Neuropathol.* **125**, 609–620 (2013).
73. Mitchell-Robinson, M. A. *et al.* Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* **138**, 1138–1159 (2015).
74. Durafourt, B. A. *et al.* Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia* **60**, 717–727 (2012).
75. Brandao, M., Simon, T., Critchley, G. & Giamas, G. Astrocytes, the rising stars of the glioblastoma microenvironment. *Glia* **67**, 779–790 (2019).

76. Henrik Heiland, D. *et al.* Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
77. Le, D. M. *et al.* Exploitation of Astrocytes by Glioma Cells to Facilitate Invasiveness: A Mechanism Involving Matrix Metalloproteinase-2 and the Urokinase-Type Plasminogen Activator-Plasmin Cascade. *J. Neurosci.* **23**, 4034–4043 (2003).
78. Matias, D. *et al.* Microglia/Astrocytes–Glioblastoma Crosstalk: Crucial Molecular Mechanisms and Microenvironmental Factors . *Frontiers in Cellular Neuroscience* **12**, 235 (2018).
79. Yang, N. *et al.* A co-culture model with brain tumor-specific bioluminescence demonstrates astrocyte-induced drug resistance in glioblastoma. *J. Transl. Med.* **12**, 1–9 (2014).
80. Lin, Q., Liu, Z., Ling, F. & Xu, G. Astrocytes protect glioma cells from chemotherapy and upregulate survival genes via gap junctional communication. *Mol. Med. Rep.* **13**, 1329–1335 (2016).
81. Faria, J. *et al.* Interactive properties of human glioblastoma cells with brain neurons in culture and neuronal modulation of glial laminin organization. *Differentiation* **74**, 562–572 (2006).
82. Venkatesh, H. S. *et al.* Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion. *Cell* **161**, 803–816 (2015).
83. Sun, L. *et al.* Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell* **9**, 287–300 (2006).
84. Bleicic, S., Rynkowski, M., De Witte, O. & Lefranc, F. Glutamate and malignant gliomas, from epilepsy to biological aggressiveness: Therapeutic implications. *Bull. Cancer* **100**, 829–835 (2013).
85. Corsi, L., Mescola, A. & Alessandrini, A. Glutamate receptors and glioblastoma multiforme: An old “route” for new perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
86. Stupp, R., Mason, W. P. & van den Bent, M. J. “Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma”. *Oncol. Times* **27**, 15–16 (2005).
87. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987–996 (2005).
88. Stupp, R. *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.* **10**, 459–466 (2009).
89. Kazda, T. *et al.* Radiotherapy of glioblastoma 15 years after the landmark Stupp’s trial: More controversies than standards? *Radiol. Oncol.* **52**, 121–128 (2018).
90. Lara-Velazquez, M. *et al.* Advances in brain tumor surgery for glioblastoma in adults. *Brain Sci.* **7**, 1–16 (2017).
91. Stark, A. M., Van De Bergh, J., Hedderich, J., Mehdorn, H. M. & Nabavi, A. Glioblastoma: Clinical characteristics, prognostic factors and survival in 492 patients. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **114**, 840–845 (2012).
92. Alphandéry, E. Glioblastoma treatments: An account of recent industrial developments. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–31 (2018).
93. Lacroix, M. *et al.* A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme:

- prognosis, extent of resection, and survival. *J. Neurosurg.* **95**, 190–198 (2001).
94. Ringel, F. *et al.* Clinical benefit from resection of recurrent glioblastomas: Results of a multicenter study including 503 patients with recurrent glioblastomas undergoing surgical resection. *Neuro. Oncol.* **18**, 96–104 (2016).
 95. Johnson, B. E. *et al.* Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science* **343**, 189–193 (2014).
 96. Oshiro, S. *et al.* Efficacy of temozolomide treatment in patients with high-grade glioma. *Anticancer Res.* **29**, 911–918 (2009).
 97. Lee, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis.* **3**, 198–210 (2016).
 98. He, Y., Roos, W. P., Wu, Q., Hofmann, T. G. & Kaina, B. The SIAH1–HIPK2–p53ser46 Damage Response Pathway is Involved in Temozolomide-Induced Glioblastoma Cell Death. *Mol. Cancer Res.* **17**, 1129–1141 (2019).
 99. Xing, W., Shao, C., Qi, Z., Yang, C. & Wang, Z. The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 3341–3348 (2015).
 100. Miglierini, P. *et al.* Impact of the per-operative application of GLIADEL wafers (BCNU, carmustine) in combination with temozolomide and radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme: Efficacy and toxicity. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **114**, 1222–1225 (2012).
 101. Gilbert, M. R. *et al.* A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **370**, 699–708 (2014).
 102. Chinot, O. L. *et al.* Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **370**, 709–722 (2014).
 103. Brown, C. E. *et al.* Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2561–2569 (2016).
 104. Astaras, C., de Micheli, R., Moura, B., Hundsberger, T. & Hottinger, A. F. Neurological Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Inhibitors: Diagnosis and Management. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **18**, 3 (2018).
 105. McGranahan, T., Therkelsen, K. E., Ahmad, S. & Nagpal, S. Current State of Immunotherapy for Treatment of Glioblastoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* **20**, (2019).
 106. Lacoeylle, F., Arlicot, N. & Faivre-Chauvet, A. Un état des lieux des aspects radiopharmaceutiques et cliniques de la radiothérapie vectorisée par émetteurs alpha et bêta. *Med. Nucl.* **42**, 32–44 (2018).
 107. Gulhke, S., Benderi, H., Diekmann, D., Rhodes, B. A. & Biersack, H. Experimental radiotherapy. **220**, 214–220 (1996).
 108. Nelson, C. A., Azure, M. T., Adams, C. T. & Zinn, K. R. The Somatostatin Analog 188Re-P2045 Inhibits the Growth of AR42J Pancreatic Tumor Xenografts. *J. Nucl. Med.* **55**, 2020–2025 (2014).
 109. Cyr, J. E. *et al.* Somatostatin receptor-binding peptides suitable for tumor radiotherapy with Re-188 or Re-186. Chemistry and initial biological studies. *J. Med. Chem.* **50**, 1354–1364 (2007).
 110. Vanpouille-Box, C. *et al.* Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with 188Re-lipid nanocapsules. *Biomaterials* **32**, 6781–6790 (2011).

111. Séhédic, D. *et al.* Locoregional confinement and major clinical benefit of ¹⁸⁸Re-loaded CXCR4-targeted nanocarriers in an orthotopic human to mouse model of glioblastoma. *Theranostics* **7**, 4517–4536 (2017).
112. Cikankowitz, A. *et al.* Characterization of the distribution, retention, and efficacy of internal radiation of ¹⁸⁸Re-lipid nanocapsules in an immunocompromised human glioblastoma model. *J. Neurooncol.* 1–10 (2016). doi:10.1007/s11060-016-2289-4
113. Gzell, C., Back, M., Wheeler, H., Bailey, D. & Foote, M. Radiotherapy in Glioblastoma : the Past , the Present and the Future Statement of Search Strategies Used and Sources of Information. *Clin. Oncol.* 1–11 (2016). doi:10.1016/j.clon.2016.09.015
114. Thompson, M. K. *et al.* Practice-changing radiation therapy trials for the treatment of cancer: where are we 150 years after the birth of Marie Curie? *Br. J. Cancer* **119**, 389–407 (2018).
115. Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R. & Yeoh, K.-W. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front. Mol. Biosci.* **1**, 1–9 (2014).
116. Prise, K. M. & O’Sullivan, J. M. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 351–360 (2009).
117. Mohseni-Meybodi, A., Mozdarani, H. & Mozdarani, S. DNA damage and repair of leukocytes from Fanconi anaemia patients, carriers and healthy individuals as measured by the alkaline comet assay. *Mutagenesis* **24**, 67–73 (2008).
118. Doan, N. B. *et al.* Identification of radiation responsive genes and transcriptome profiling via complete RNA sequencing in a stable radioresistant U87 glioblastoma model. *Oncotarget* **9**, 23532–23542 (2018).
119. Desouky, O., Ding, N. & Zhou, G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **8**, 247–254 (2015).
120. Han, X., Xue, X., Zhou, H. & Zhang, G. A molecular view of the radioresistance of gliomas. *Oncotarget* **8**, 100931–100941 (2017).
121. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756–760 (2006).
122. Baumann, M., Krause, M. & Hill, R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 545–554 (2008).
123. Alizadeh, E., Orlando, T. M. & Sanche, L. Biomolecular Damage Induced by Ionizing Radiation: The Direct and Indirect Effects of Low-Energy Electrons on DNA. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **66**, 379–398 (2015).
124. Hardee, M. E. *et al.* Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor- β . *Cancer Res.* **72**, 4119–4129 (2012).
125. Azzam, E. I., Jay-Gerin, J.-P. & Pain, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* **327**, 48–60 (2012).
126. Farmer, E. E. & Mueller, M. J. ROS-Mediated Lipid Peroxidation and RES-Activated Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 429–450 (2013).
127. Marín, A. *et al.* Bystander effects and radiotherapy. *Reports Pract. Oncol. Radiother.* **20**, 12–21

- (2015).
128. Faqih, F., Neshastehriz, A., Soleymanifard, S., Shabani, R. & Eivazzadeh, N. Radiation-induced bystander effect in non-irradiated glioblastoma spheroid cells. *J. Radiat. Res.* **56**, 777–783 (2015).
 129. Eriksson, D. & Stigbrand, T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biol.* **31**, 363–372 (2010).
 130. Wu, Q. *et al.* Macrophage biology plays a central role during ionizing radiation-elicited tumor response. *Biomed. J.* **40**, 200–211 (2017).
 131. Jo, G. H. *et al.* Radiation-Induced Autophagy Contributes to Cell Death and Induces Apoptosis Partly in Malignant Glioma Cells. *Cancer Res. Treat.* **47**, 221–241 (2014).
 132. Jeon, H. Y. *et al.* Irradiation induces glioblastoma cell senescence and senescence-associated secretory phenotype. *Tumor Biol.* **37**, 5857–5867 (2016).
 133. Gupta, K. & Burns, T. C. Radiation-Induced Alterations in the Recurrent Glioblastoma Microenvironment: Therapeutic Implications. *Front. Oncol.* **8**, 503 (2018).
 134. Cui, L. *et al.* Radiation induces autophagic cell death via the p53/DRAM signaling pathway in breast cancer cells. *Oncol. Rep.* **35**, 3639–3647 (2016).
 135. Rainaldi, G., Ferrante, A., Indovina, P. L. & Santini, M. T. Induction of apoptosis or necrosis by ionizing radiation is dose-dependent in MG-63 osteosarcoma multicellular spheroids. *Anticancer Res.* **23**, 2505–2518 (2003).
 136. Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. & Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: An ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 700–714 (2010).
 137. Erasmus, H., Gobin, M., Niclou, S. & Van Dyck, E. DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **769**, 19–35 (2016).

Chapitre 1

Mise en place du modèle de primo-culture de cellules
de GBM

Le GBM est une tumeur possédant une population hétérogène de cellules cancéreuses impliquées dans sa croissance et son développement. Une adaptation à l'environnement de ces cellules au cours de la progression tumorale et en réponse aux thérapies participe à l'hétérogénéité¹. La multipotence des cellules de type « souches cancéreuses » et la plasticité des cellules cancéreuses dans leur ensemble sont directement impliquées dans l'hétérogénéité tumorale². Depuis plusieurs années, les CSCs sont décrites pour leur capacité à résister aux stratégies thérapeutiques. Dans ce projet, nous avons donc décidé de collecter des prélèvements tumoraux afin de disposer de différentes cultures primaires ayant des profils génomiques variés et des réponses aux thérapies bien distinctes. À cet égard, il est important de définir les caractéristiques des CSCs, et de décrire les différentes voies de signalisation impliquées dans la radiorésistance des cellules tumorales.

1. Introduction

1.1. Caractéristiques des cellules souches cancéreuses

L'origine des CSCs n'a pas encore été élucidée et reste une source d'intérêt pour la communauté scientifique. Comme tout type de cellules souches, les CSCs sont capables de s'autorenouveler et sont multipotentes. A la différence des cellules souches saines, les CSCs ont des propriétés qui leur confèrent un pouvoir tumorigène^{3,4}. De plus, les CSCs sont résistantes aux différents traitements thérapeutiques tels que la chimiothérapie et la radiothérapie et semblent être impliquées dans les processus liés à la récurrence^{5,6}. De plus, les CSCs expriment des marqueurs membranaires et intracellulaires qui leur sont spécifiques.

1.1.1. Marqueurs membranaires

CD133 est une glycoprotéine membranaire à 5 domaines transmembranaires. C'est aussi le marqueur membranaire des CSCs le plus décrit. Les cellules cancéreuses exprimant CD133 forment des neurosphères *in vitro* et sont capables de générer des tumeurs chez l'animal³. L'expression de CD133 est importante pour l'autorenouvellement des cellules tumorales et la tumorigénicité. De plus, les cellules cancéreuses localisées dans une niche hypoxique présentent une plus forte expression de CD133⁷. Cette expression a été corrélée à un mauvais pronostic pour les patients porteur d'un GBM et les tumeurs les plus résistantes aux radiations sont décrites comme exprimant CD133^{8,9}. Néanmoins, CD133 n'est pas le seul marqueur membranaire retrouvé chez les CSCs. Ainsi, la nestine et CXCR4 peuvent aussi être utilisés comme marqueurs^{10,11}. Ceux-ci sont utilisés en association avec CD133 lors de la caractérisation, car les études ont montré qu'une sous-population de CSCs n'exprime

pas CD133¹². Cependant, malgré l'absence d'expression de CD133, ces cellules conservent leur capacité à former des neurosphères en culture, et des tumeurs chez l'animal.

1.1.2. Marqueurs intracellulaires

Les CSCs peuvent être caractérisées selon des marqueurs intracellulaires tels que des facteurs de transcription. On retrouve ainsi de nombreux points communs entre les facteurs de transcription exprimés par les cellules souches neurales et les CSCs. Dans la littérature, les facteurs suivants ont été décrits pour être exprimés par les CSCs : SOX2¹³, NANOG^{14,15}, OLIG2¹⁶, MYC¹⁷, MUSASHI1¹³, BMI1, Nestine¹⁸. Sox2 est un facteur de transcription requis pour le maintien des propriétés des cellules souches (autorenouveaulement...)¹⁹. L'expression de Sox2 a été montrée comme étant nécessaire au développement de la tumeur *in vivo*. En effet, les cellules tumorales n'exprimant plus Sox2 ne permettent pas le développement d'une tumeur dans un modèle de souris²⁰. Les CSCs expriment également des facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence tels que Octamer-binding transcription factor 4 (Oct4) et NANOG²¹. Les voies de signalisation impliquées dans la radiorésistance.

1.2. Les voies de signalisation impliquée dans la radiorésistance

Les CSCs sont résistantes aux rayonnements ionisants et un enrichissement en ces cellules après irradiation a été démontré⁶. Différentes voies de signalisation et modifications dans le contrôle du cycle cellulaire semblent être impliquées dans les mécanismes de radiorésistance. De plus, les CSCs sont capables d'échapper à la mort cellulaire²².

1.2.1. Chk1, Chk2 et ATM

Les protéines régulatrices des points de contrôle du cycle cellulaire semblent être impliquées dans la radiorésistance. En effet, après une irradiation, l'activation des voies Chk1, Chk2 (Checkpoint kinases 1 et 2) et ATM (Ataxia Telangiectasia Muted) permet l'arrêt du cycle cellulaire, puis une réparation des cassures double brins de l'ADN par un mécanisme NHEJ^{6,23}. Une inhibition de ces voies diminue le phénotype radiorésistant des CSCs.

1.2.2. Wnt/ β caténine

La voie de signalisation Wnt / β caténine est décrite pour son implication dans le développement des cellules souches neurales. Cette voie est aussi impliquée dans les mécanismes de radiorésistance dans

les cancers²⁴. Dans les tumeurs radiorésistantes, , cette voie de signalisation est beaucoup plus active, conduisant à une expression plus importante de la β caténine²⁴. Dans le cas du GBM, il existe une corrélation entre l'activation de cette voie et le pronostic du patient ^{25,26}. La voie Wnt / β caténine est impliquée dans la maintenance du phénotype des CSCs²⁷.

1.2.3. Notch

Notch est un récepteur transmembranaire possédant plusieurs ligands. La voie de signalisation induite par Notch est notamment impliquée dans le lignage des cellules. Cependant, Notch est également décrit pour son implication dans les mécanismes de radiorésistance dans différents types de cancer^{28,29}. Dans le GBM, il a été montré que les CSCs seraient plus sensibles au TMZ lorsque la voie de signalisation Notch est inhibée³⁰. De plus, en réponse à une irradiation, une suractivation de la voie Notch a été montrée dans un modèle mammosphère³¹.

1.3. Objectif

L'objectif de cette partie du projet est de mettre en évidence de nouvelles voies de signalisation ou profils génomiques qui confèrent un phénotype radiorésistant à une tumeur. Au cours des travaux de thèse, nous avons donc généré un pool de cellules primaires de GBM. Cette partie du projet se divise donc en plusieurs sous-parties:

- Caractérisation du profil génomique des tumeurs ;
- Caractérisation phénotypique des primo-cultures ;
- Caractérisation du pouvoir tumorigène de ces cellules.

2. Matériels & méthodes

2.1. Culture cellulaire

Les différentes cellules primaires de GBM sont cultivées en condition de normoxie c'est-à-dire dans un incubateur cellulaire régulé à 21 % d'O₂ et 5 % de CO₂ à 37 °C dans une atmosphère humide.

2.1.1. Mise en culture

Les cellules primaires ont été cultivées dans du milieu neurosphère composé de DMEM 1X low glucose (Lonza), Ham's F12 (Lonza), et 1% d'antibiotiques. Les facteurs de croissance suivants ont été ajoutés extemporanément dans le milieu de culture : B27 1X (17504044, Gibco), 20 ng/mL FGF2 (130-093-842, MACS), 20 ng/mL EGF (130-093-827, MACS), 5 ng/mL héparine (Sigma). Le prélèvement

tumoral a été conservé à 4 °C dans du Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Lonza) avant la mise en culture. Le tissu tumoral a ensuite été dissocié mécaniquement à l'aide d'un scalpel, puis centrifugé. Enfin, les cellules ont été filtrées sur un tamis cellulaire de 40 µm, puisensemencées dans une flasque T25. Les facteurs de croissance ont été rajoutés tous les 3-4 jours, et le milieu a été changé une fois par semaine.

2.1.2. Dissociation des primo-cultures

Les neurosphères ont été dissociées mécaniquement toutes les 2 à 4 semaines pour générer de nouvelles sphères. Le milieu de culture contenant les cellules a été centrifugé pendant 10 min à 1000 rpm. Les cellules ont été reprises dans de l'HBSS, incubés à 37 °C pendant 5 min, et dissociées par aspiration / refoulement à la pipette. Cette étape peut être répétée 6 fois, jusqu'à dissociation parfaite des sphères après vérification par microscopie. Les cellules ont ensuite été comptées sur une cellule de Malassez, etensemencées au nombre de 500 000 cellules par flasque T80.

2.1.3. Congélation des cellules

La congélation des cellules a été réalisée sous forme de sphères dans le milieu de congélation constitué de DMSO à 10% et de milieu de culture à 90%. Les cellules nouvellement congelées ont été stockées à -80 °C pendant 2 à 3 jours et ont ensuite été transférées dans de l'azote liquide.

2.2. Cytométrie en flux - Marquage direct

Les cellules primaires ont été marquées à l'aide des anticorps dirigés contre anti-CD133 APC (#130-111-080 ; Macs), anti-Sox 2 APC (#130-104-995 ; Macs), anti-nestine PerCP-CyTM5.5 (#561231 ; BDbiosciences), anti-Oct3/4 APC (#130-109-764 ; Macs), anti-O4 APC (#130-109-200, Macs) et anti-GFAP (#0334, Dako). Avant l'étape de marquage, les cellules ont été dissociées mécaniquement. Les protéines membranaires ont été marquées directement après dissociation. Pour marquer les protéines intracellulaires, les cellules ont été perméabilisées. Cette étape a été effectuée à l'aide du kit de perméabilisation/fixation (Kit BD perm wash) selon les recommandations du fournisseur. Les cellules ont ensuite été resuspendues à 1.10⁶ cellules par ml dans du PBS-0,5% Bovine Serum Albumine (BSA, Sigma). Dans une plaque 96 puits à fond conique, 100 µl de cellules ont été distribués. Les anticorps ont ensuite été ajoutés selon les recommandations du fournisseur pendant 20 min à 4 °C. Les analyses ont été réalisées sur le cytomètre en flux MACSQuant (MACS). Le logiciel Flowlogic (MACS) a été utilisé pour analyser les résultats.

2.3. SNP Array - Principe

L'analyse par SNP array (Single Nucleotide Polimorphism) est une technique de biologie moléculaire qui permet de détecter les gains ou les délétions présentes dans le génome. Les SNPs sont le type de variation le plus fréquent dans l'ADN, ayant lieu sur un site unique de l'ADN. Chaque individu possède des SNPs au sein de son génome et leur analyse permet de déterminer la susceptibilité à certaines maladies. De plus, l'analyse des SNPs permet de mettre en évidence les mutations présentes dans le génome des cellules tumorales. Les analyses SNPs ont été réalisées par le service d'anatomopathologie du CHU d'Angers sur une lame cytoSNP 850K (Illumina).

2.4. Modèles orthotopiques de GBM humain

Cette étape consiste à évaluer la vitesse de développement de la tumeur chez le rat nude (CrI:NIH-Foxn1^{rn}, Charles Rivers). Les animaux ont été anesthésiés avec un mélange kétamine (100 mg/kg) / xylazine (13 mg/kg) en intrapéritonéal. Les cellules tumorales ont été injectées dans le striatum de l'animal par stéréotaxie. Le site d'injection des cellules correspond à la région située à 3 mm en latéral par rapport à la scissure interhémisphérique et à 1 mm en antéro-postérieur par rapport au Bregma. Au cours de la procédure, la température rectale des animaux a été régulée à 37 °C au moyen d'une couverture chauffante.

Une solution de milieu DMEM contenant les cellules tumorales a ensuite été injectée avec un débit manuel de 0.5 µL/min. L'aiguille a été maintenue en place 10 minutes supplémentaires après la fin de l'injection, puis a été doucement retirée. En fin de procédure, la plaie a été nettoyée avec de la Bétadine et la peau a été suturée. Des images par IRM ont ensuite été prises 20 jours après implantation des cellules cancéreuses afin d'observer la présence d'une masse tumorale et de quantifier son volume. Par la suite, un suivi régulier a été mis en place pour observer l'évolution de la tumeur par IRM.

3. Résultats

3.1. Caractérisation des différents prélèvements tumoraux par SNP array

Nom	IDH	EGFR	CDKN2A	PDGFRa	MDM2	CDK4	MET
Glio2		1					1
Glio3	1		1				
Glio4			1				
Glio5						1	
Glio6		1	1				
Glio7							
Glio8	1		1				
Glio9		1	1				
Glio10		1	1				
Glio11							
Glio12							
Glio13							
Glio14		1	1				
Glio15							
Glio16			1				
Glio17			1				
Glio18						1	
Glio19			1				
Glio20						1	

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des mises en cultures réalisées et des différentes mutations identifiées.

Afin de représenter au mieux la tumeur initiale, et pour tenter d’identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ayant un effet radiosensibilisant, nous avons choisi d’établir une collection de cellules primaires humaines de GBM. La collection biologique d’organoïdes que j’ai réalisée au sein de l’équipe 17 du CRCINA (GLIAD) s’inscrit dans le cadre du travail ici réalisé (dirigé par le Dr Garcion et le Dr Hindré) et dans celui de la base Clinico-Biologique Glioblastome (BCB GB) (coordonnée par le Pr Menei, également membre de GLIAD). La collection biologique BCB GB est autorisée par les autorités de santé (MESR, Comité de protection des personnes, CNIL). Elle est référencée sous le n° BRIF (Bioresource Research Impact Factor) BB-0033-00093 et le CRB dans lequel est stockée une partie de nos échantillons est certifié ISO 9001 et NF96-900. Pour plus d’information cf : <http://www.biobanques.eu/fr/annuaire-des-biobanques/item/bcb-glioblastomes> et <http://lesdonnees.e-cancer.fr/Projets-de-Recherche/Base-de-donnees-Clinicobiologique-deGlioblastomes>.

En collaboration avec le service d’anatomopathologie et de neurochirurgie du CHU d’Angers, 22 fragments tissulaires tumoraux issus de patients opérés pour un GBM ont été obtenus au cours de la

thèse. Sur ces 22 fragments, uniquement 19 ont pu être analysés en termes de variations des SNP afin de déterminer leur profil génomique. Ces fragments ont ensuite été mis en culture sous forme de neurosphères (**Tableau 3**). Après avoir récupéré les différents fragments tumoraux, ceux-ci ont été dissociés et seulement 8 cultures ont proliféré dans nos conditions de culture.

Nous avons donc récupéré des cultures cellulaires avec des profils génomiques différents. Nous avons retrouvé des mutations sur les gènes suivants : IDH, EGF, CDN2A, CDK4, et MET (**Tableau 3**). Nous avons pu observer que la combinaison des gènes mutés n'est pas la même entre les différents GBM obtenus. Nous avons observé que CDKN2A est amplifié dans 10 des 19 échantillons prélevés. Ensuite, une mutation du gène codant pour EGFR est retrouvée dans 5 tumeurs sur 19. Dans les échantillons récoltés, nous avons obtenu deux prélèvements mutés pour IDH dont un de ces prélèvements a pu être amplifiés et congelés. De plus, 3 prélèvements ont une amplification de CDK4. Nous n'avons pas obtenu de tumeur amplifiée pour les gènes MDM2 ou PDGFRa.

Les cultures amplifiées et analysées par SNP array sont les suivantes : Glio3, Glio5, Glio6, Glio14 et Glio19.

3.2. Caractérisation des primo-cultures

En plus des nouvelles mises en culture réalisées par moi-même, nous avons décidé d'utiliser les Glio1, cellules primaires de GBM mises en culture avant mon arrivée. Une fois les cellules de GBM mises en culture, nous les avons amplifiées, congelées et nous avons caractérisé leur phénotype par cytométrie en flux. Dans cette partie, uniquement les résultats pour 2 primo-cultures (Glio1 et Glio3) seront présentés. L'expression des biomarqueurs suivants est analysée par cytométrie en flux : CD133, nestine, GFAP, Sox2, O4, Oct3/4.

Les neurosphères Glio1 ont été dissociées et marquées avec les anticorps dirigés contre les biomarqueurs cités ci-dessus. La nestine est fortement exprimée dans nos cellules (**Figure 13**). Nous n'avons pas détecté l'expression de O4 et Oct3/4 (résultats non montrés). Nous avons observé une faible expression de la GFAP (résultats non montrés), de Sox2 et CD133 (**Figure 13**). La population cellulaire au sein des Glio1 est hétérogène. En effet, nous ne détectons qu'une très faible proportion de CSCs exprimant CD133⁺ alors que la majorité de la population cellulaire est CD133⁻.

Nous avons ensuite caractérisé le phénotype des Glio3 par cytométrie en flux (**Figure 14**). Nous n'avons pas détecté l'expression de CD133 (**Figure 14**), ni de O4 et Oct3/4 (résultats non montrés).

Nous avons observé une faible expression de Sox2 (5,37%, **Figure 14**). Enfin, nous avons détecté une forte expression de la nestine (84,51%, **Figure 14**). Ces résultats permettent de confirmer l'origine neurale de nos cellules grâce à la forte expression de la nestine. Les Gli3 semblent être une population plus homogène qui n'exprime pas CD133.

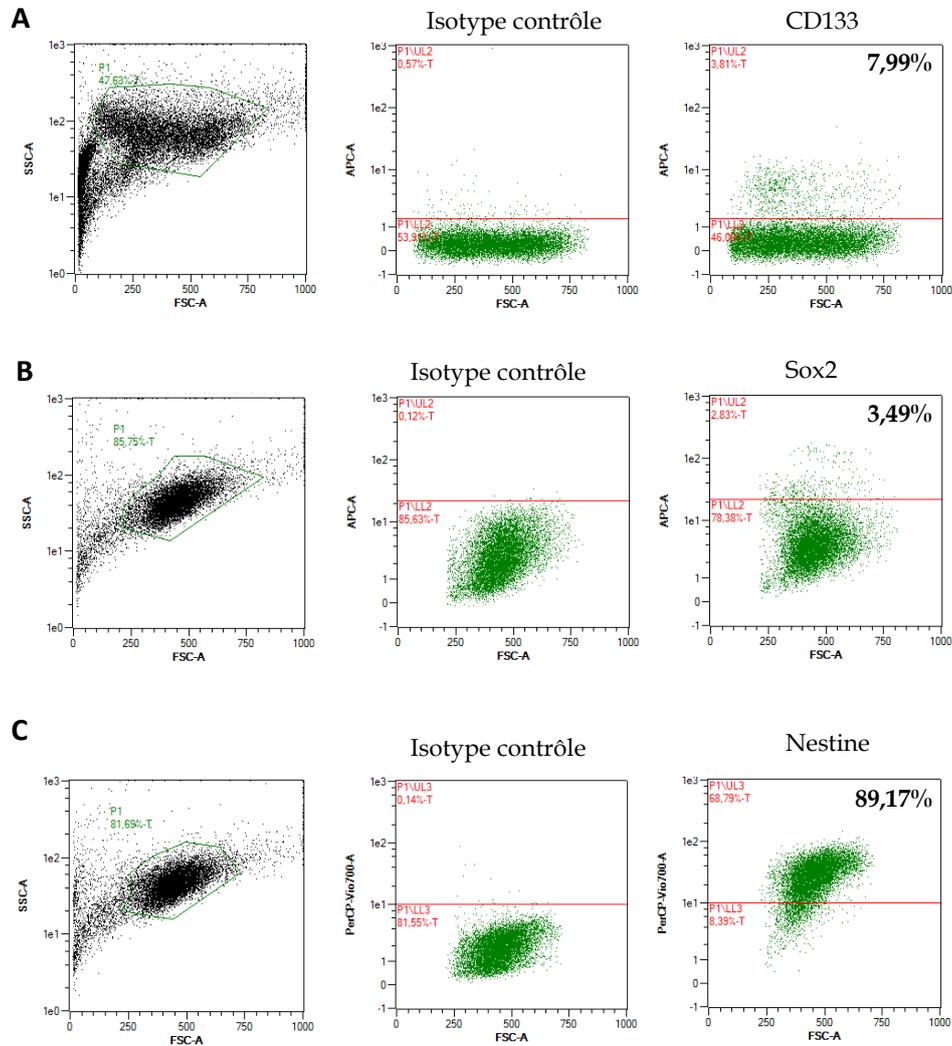


Figure 13 : Caractérisation phénotypique de la primo-culture Gli1 à 21% O₂.

Les cellules ont été cultivées à 21% O₂, puis l'expression de CD133 (A), Sox2 (B), de la nestine (C) et de leur isotype contrôle ont été analysés par cytométrie en flux. Le graphe représente une expérience représentative d'un triplicat. Le pourcentage indiqué représente le nombre relatif de cellules exprimant la protéine d'intérêt.

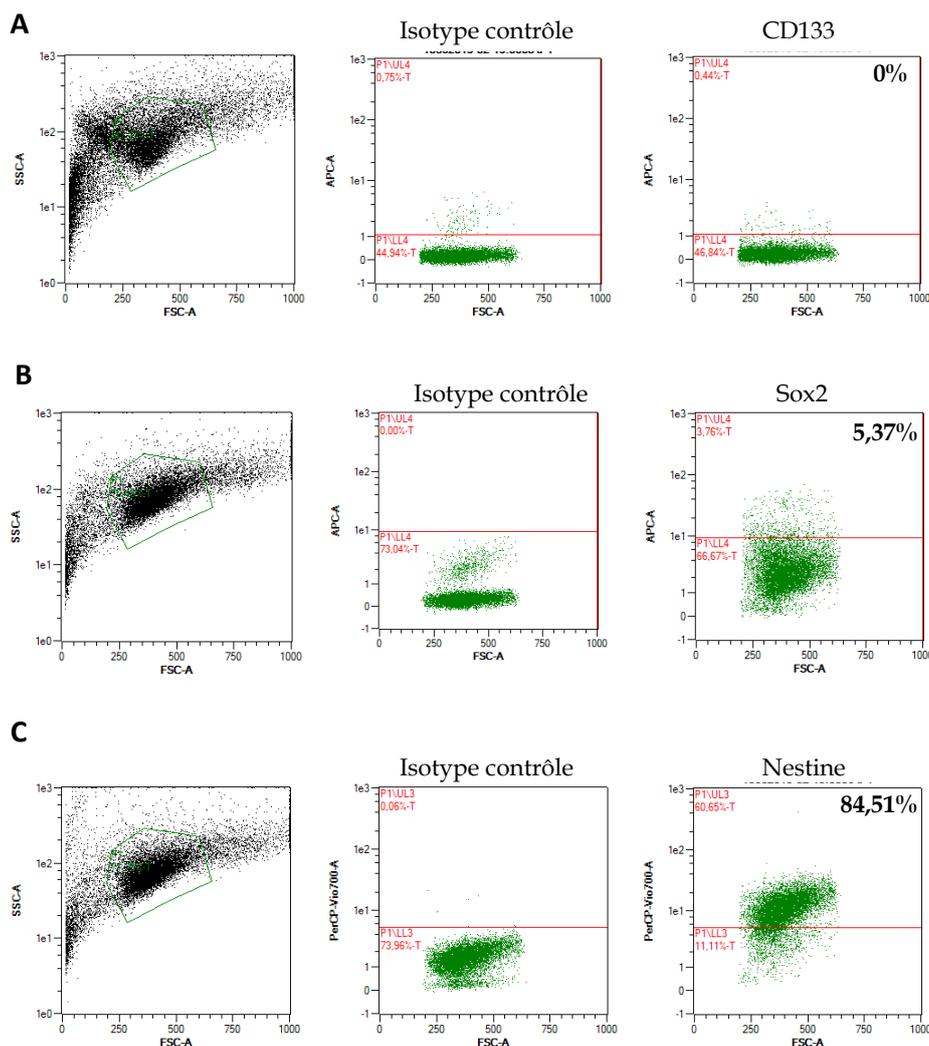


Figure 14 : Caractérisation phénotypique de la primo-culture Gli3 à 21% O₂.

Les cellules ont été cultivées à 21% d'O₂, puis l'expression de CD133 (A), Sox2 (B), de la nestine (C) et de leur isotype contrôle ont été analysés par cytométrie en flux. Le graphe représente une expérience représentative d'un triplicat. Le pourcentage indiqué représente le nombre relatif de cellules exprimant la protéine d'intérêt.

3.3. Pouvoir tumorigène des Gli1

Afin de finir la caractérisation des primo-cultures, nous avons testé le pouvoir tumorigène des Gli1 chez un modèle de rongeur. Nous avons donc injecté les cellules Gli1 dans le striatum de rats nude. L'expérience n'ayant pas encore été réalisée dans notre laboratoire, nous avons injecté deux quantités de cellule différentes : 50 000 ou 100 000 cellules par rat nude. Ensuite, le développement tumoral a été suivi mensuellement par IRM. Nous avons observé qu'après 132 jours et 165 jours post-injection

pour les rats ayant reçu 100 000 et 50 000 cellules respectivement, la tumeur était visible à l'IRM (Figure 15). L'injection de Glio1 dans un modèle de rat nude conduit à la formation d'une tumeur. Ces cellules expriment faiblement CD133 et sont tumorigènes chez l'animal. Cette expérience doit être répétée pour les Glio3, Glio5, Glio6, Glio14 et Glio19.

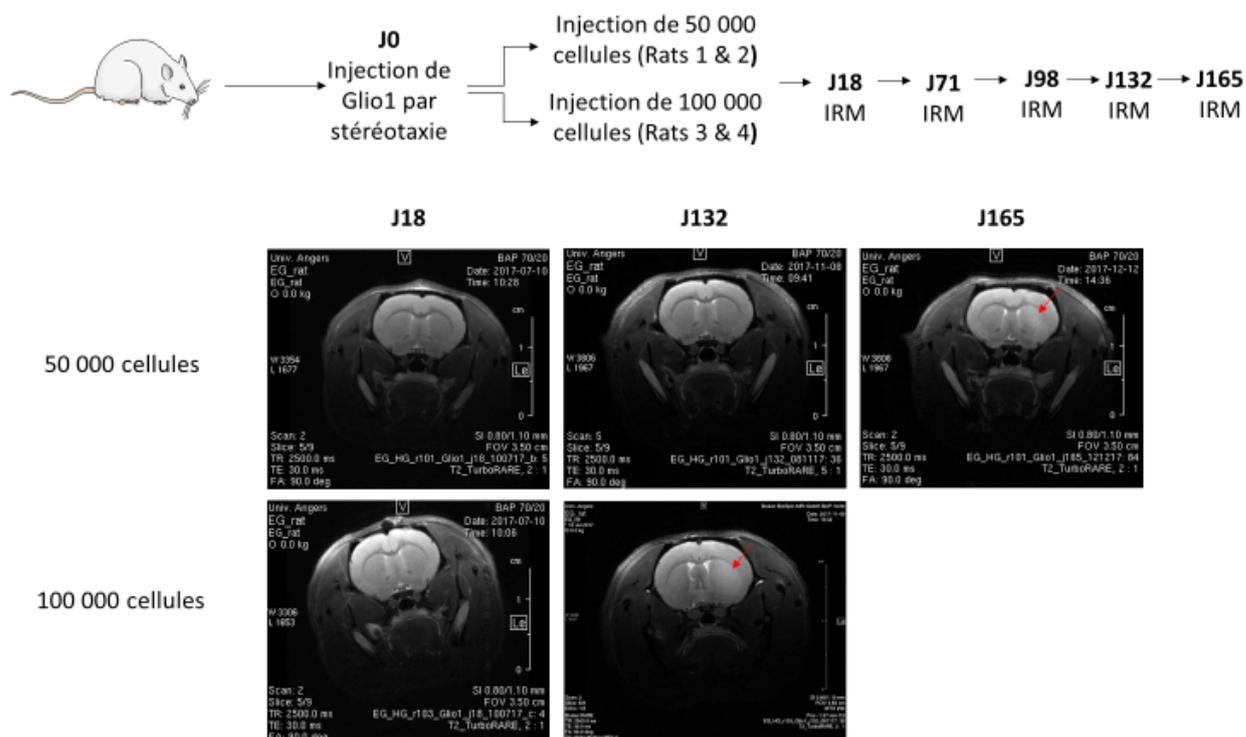


Figure 15 : Suivi de la progression tumorale chez des rats nude injectés avec la primo-culture Glio1.

n=2.

4. Discussion

L'hétérogénéité tumorale contribue au mauvais pronostic et est directement impliquée dans le phénotype radiorésistant de la tumeur^{32,33}. Ainsi, avoir à notre disposition une collection de primo-cultures de GBM est un avantage permettant de prendre en compte l'hétérogénéité de la tumeur dans la réponse aux différentes stratégies thérapeutiques. Les objectifs à long terme sur cette partie sont de:

- Mettre en évidence de nouvelles cibles radiosensibilisantes.
- Mettre en évidence des profils génomiques pouvant bénéficier d'une thérapie ciblant spécifiquement une population tumorale ou un autre contingent cellulaire (cellules immunitaires par exemple).

J'ai donc collecté 22 prélèvements qui ont ensuite été mis en culture sous forme de neurosphères. Ces primo-cultures ont été amplifiées et congelées, puis caractérisées par cytométrie en flux. La caractérisation de leur profil génomique (SNP array) a été réalisée par le service d'anatomopathologie du CHU d'Angers. Enfin, nous avons cherché à déterminer le pouvoir tumorigène de nos primo-cultures. Nous avons obtenu les résultats suivants :

- Nous possédons une collection de primo-cultures ayant des profils génomiques différents. Notre collection compte des cellules tumorales ayant des mutations pour les gènes suivants : IDH, EGFR, CDKN2A, CDK4 et MET.
- Les Gli01 sont une population de cellules tumorales hétérogènes. Une faible proportion de la population cellulaire est CD133⁺. Elles possèdent d'autres marqueurs caractéristiques des cellules souches et sont bien des cellules ayant une origine neurale.
- Les Gli01 conduisent bien au développement d'une tumeur *in vivo*.

4.1. Discussion technique sur le protocole de mise en culture

Nous avons donc eu la possibilité de faire 22 mises en culture au cours des deux dernières années et seulement 8 de ces tentatives ont proliféré dans nos conditions de culture. Plusieurs raisons peuvent expliquer l'échec des mises en cultures.

La taille du fragment tissulaire que nous avons obtenu est une première hypothèse. En effet, un prélèvement tumoral de petite taille peut ne pas contenir assez de matériels cellulaires pour que la mise en culture fonctionne. La taille des fragments a été très variable en fonction des prélèvements, et nous avons pu observer un échec constant pour les fragments de plus petite taille.

Une seconde hypothèse peut être le choix de notre méthode expérimentale. Le groupe de Dr Justin Lathia (Lerner Research Institute) utilise la méthode suivante : après avoir dissocié mécaniquement le prélèvement tumoral, les cellules sont injectées chez la souris nude. Après développement de la tumeur chez l'animal, elle est récoltée puis dissociée pour être mise en culture^{6,34,35}. Cette méthode semble posséder un bon taux de réussite par rapport à notre méthode, mais nécessite de passer par le modèle animal. Une comparaison des deux méthodes de mises en culture pourrait être envisagée par la suite afin d'avoir une réussite optimale.

4.2. Hétérogénéité tumorale

4.2.1. Discussion technique

La population de cellules tumorales de GBM est hétérogène. En fonction de la région de prélèvement, les profils génomiques des cellules tumorales ne sont pas les mêmes. Lors du prélèvement, nous obtenons donc une région réduite représentant la tumeur. De plus, lors de la mise en culture, nous sélectionnons la population cellulaire proliférant le mieux dans nos conditions de culture, cette sélection étant accentuée au fur et à mesure des passages. Afin de palier au mieux à cette sélection clonale, des analyses moléculaires (SNP array) et cellulaires (cytométrie en flux) ont été et seront mises en place régulièrement. Cela nous permet de vérifier que nous avons toujours la même population cellulaire au fur et à mesure des passages.

4.2.2. Profil génomique des primo-cultures

Le profil génomique des tumeurs est analysé par SNP array et permet de détecter les polymorphismes présents au sein du génome. Les analyses des SNP ont été réalisées sur 5 des 8 primo-cultures et présentent 3 profils génomiques différents. Dans les prélèvements tumoraux récoltés, nous avons détecté les mutations pour les gènes suivants : CDKN2A, CDK4, EGFR, IDH.

Les cellules amplifiées pour EFGR prolifèrent très rapidement en culture, contrairement aux cellules mutées pour IDH qui prolifèrent plus lentement. La voie de signalisation EGFR est une cible thérapeutique très étudiée pour le GBM et plusieurs études cliniques sont en cours³⁶. AZD9291, un inhibiteur de la voie EFGR/ERK, a été approuvé pour le cancer du poumon. Dans le GBM, l'inhibition de EGFR démontre une bonne efficacité dans une étude préclinique³⁷.

La mutation de CDKN2A est retrouvée classiquement chez les patients porteurs d'un GBM. CDKN2A est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et son inactivation affecte la progression du cycle cellulaire.

CDK4 est aussi impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire. Son inactivation favorise une prolifération incontrôlée des cellules tumorales^{38,39}. Un essai clinique de phase 2 ciblant CDK4 a été réalisé pour le GBM, mais n'a pas démontré d'efficacité sur les patients^{40,41}.

L'amplification de MET est uniquement présente dans les GBM. À ce jour, aucune corrélation n'a été trouvée entre la survie des patients et l'amplification de MET⁴². Des inhibiteurs de MET sont en cours

d'essai clinique pour le GBM. Enfin, la mutation d'IDH est couramment retrouvée dans les GBM secondaires. Elle est souvent associée à un meilleur pronostic pour les patients.

L'expression de CD133 est faible dans les deux populations cellulaires que nous avons analysées par cytométrie en flux. Nous avons réalisé les mises en cultures dans des conditions en normoxie (21% O₂), or, l'expression de CD133 est dépendante du taux d'oxygène *in vitro*⁴³. En effet, il a été décrit que l'expression de CD133 est en partie perdue dans des conditions en normoxie. Il ne faut cependant pas oublier que certaines CSCs n'expriment pas CD133^{8,34,44}. D'après les résultats obtenus, nous avons confirmé l'origine neurale des cellules primaires de GBM. Nous avons aussi pu mettre en évidence différentes populations selon l'expression de CD133. Nous avons donc une population de cellules hétérogènes qui présentent des marqueurs différents.

Le GBM est une tumeur hétérogène qui peut présenter un profil génomique différent en fonction de région étudiée. Il se peut donc que la mutation qui caractérise cette région ne soit pas la même dans une autre région de cette même tumeur. Or, lors du prélèvement, nous ne récupérons qu'une petite portion de cette tumeur. Ainsi, lors de la mise en culture, nous sélectionnons une population cellulaire présente à cet endroit précis. Nous devons prendre en compte l'hétérogénéité tumorale dans l'évaluation de la sensibilité des cellules tumorales aux différents traitements. La culture des cellules tumorales sous forme de sphéroïdes est un premier pas dans la prise en compte de l'hétérogénéité. Cette méthode de culture permet aux cellules de proliférer dans toutes les directions et de recréer un microenvironnement similaire à celui de la tumeur. Les cellules présentes au centre et à la périphérie de la sphère ne sont pas exposées aux mêmes signaux, et leur environnement est différent.

L'environnement tumoral et les traitements sont aussi impliqués dans l'hétérogénéité tumorale. Les traitements utilisés contre la tumeur ont aussi été décrits pour participer à la sélection clonale puisque certains clones sont résistants et vont donc survivre^{47,48}. Afin d'explorer cette partie, nous disposons donc d'une collection de cellules tumorales et nous pouvons comparer leur comportement en réponse à différentes stratégies thérapeutiques en modulant le type de radiothérapie (externe et vectorisée) mais en modulant aussi la dose délivrée et le type de rayonnement (α , β).

Par la suite, des expériences de co-cultures en présence de cellules appartenant à différents contingents du microenvironnement tumoral (les macrophages...) pourront être réalisées afin d'analyser l'impact du profil génomique sur la réponse aux rayonnements dans un environnement plus complexe.

4.3. Formation de la tumeur *in vivo* chez le rongeur

Pour terminer la caractérisation des différentes primo-cultures, nous avons évalué la capacité à former une tumeur chez l'animal. Pour réaliser cette expérience, nous avons choisi comme modèle le rat. Les primo-cultures étant très lentes à proliférer, nous avons réalisé cette expérience sur les Glio1 uniquement. Nous avons observé que la tumeur se développe au niveau du site d'injection et que celle-ci prend entre 4 et 6 mois pour être visible à l'IRM. La même expérience doit être réalisée pour les autres primo-cultures. Grâce à notre collection de cellules primaires de GBM, nous disposons d'un outil permettant la prise en compte de l'hétérogénéité tumorale dans l'étude de la réponse aux rayonnements.

4.4. Perspectives

Cette partie du projet a été initiée au cours de la seconde année de thèse. Il reste encore des expériences à réaliser afin de caractériser le phénotype de ces cellules et leur profil de radiorésistance. Nous avons choisi d'utiliser des cellules primaires de GBM cultivées sous forme de neurosphères alors que la vitesse de prolifération est très lente (un passage prend entre 2 et 3 semaines pour être réalisé). Sur les derniers mois de thèse, nous avons récolté et mis en culture 3 prélèvements tumoraux supplémentaires. Toutes les expériences que j'ai réalisées sur les Glio1 (caractérisation par cytométrie en flux, tumorigénicité...) doivent être répétées pour les cultures Glio3, Glio5, Glio6, Glio14 et Glio19 et sur les 3 nouvelles primo-cultures. Puis, le statut de radiosensibilité devra être déterminé pour chaque culture primaire présente dans notre collection. Ainsi, nous pourrons associer un profil génomique à un profil radiosensible ou radiorésistant à nos différentes primo-cultures. Suite à cela, il sera possible de mettre en évidence les différentes voies de signalisation impliquées dans la radiorésistance. Cette collection de cellules primaires de GBM pourra ensuite être utilisée pour tester l'efficacité des différentes stratégies thérapeutiques que nous développons dans l'équipe (radiothérapie vectorisée, piège à tumeur).

Références bibliographiques

1. Lawson, D. A., Kessenbrock, K., Davis, R. T., Pervolarakis, N. & Werb, Z. Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nat. Cell Biol.* **20**, 1349–1360 (2018).
2. Dirkse, A. *et al.* Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nat. Commun.* **10**, 1–16 (2019).
3. Singh, S. K. *et al.* Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res.* **63**, (2003).
4. Valent, P. *et al.* Cancer stem cell definitions and terminology: The devil is in the details. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 767–775 (2012).
5. Chen, L. *et al.* A model of cancer stem cells derived from mouse induced pluripotent stem cells. *PLoS One* **7**, (2012).
6. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756–760 (2006).
7. Bidlingmaier, S., Zhu, X. & Liu, B. The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells. *J. Mol. Med. (Berl)*. **86**, 1025–1032 (2008).
8. Beier, D. *et al.* CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* **67**, 4010–4015 (2007).
9. Zeppernick, F. *et al.* Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin. Cancer Res.* **14**, 123–129 (2008).
10. Jin, X., Jin, X., Jung, J.-E., Beck, S. & Kim, H. Cell surface Nestin is a biomarker for glioma stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **433**, 496–501 (2013).
11. Séhédic, D. *et al.* Locoregional confinement and major clinical benefit of 188re-loaded CXCR4-targeted nanocarriers in an orthotopic human to mouse model of glioblastoma. *Theranostics* **7**, 4517–4536 (2017).
12. Patru, C. *et al.* CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glioma-neuronal tumors. *BMC Cancer* **10**, 1–11 (2010).
13. Hemmati, H. D. *et al.* Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 15178–15183 (2003).
14. Ben-Porath, I. *et al.* An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genet.* **40**, 499–507 (2008).
15. Suvà, M. L. *et al.* Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell* **157**, 580–594 (2014).
16. Ligon, K. L. *et al.* Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* **53**, 503–517 (2007).
17. Kim, J. *et al.* A Myc network accounts for similarities between embryonic stem and cancer cell transcription programs. *Cell* **143**, 313–324 (2010).
18. Tunicci, P. *et al.* Genetic alterations and in vivo tumorigenicity of neurospheres derived from an adult glioblastoma. *Mol. Cancer* **3**, 25 (2004).
19. Favaro, R. *et al.* Sox2 Is Required to Maintain Cancer Stem Cells in a Mouse Model of High-

- Grade Oligodendroglioma. *Cancer Res.* **74**, 1833 LP – 1844 (2014).
20. Gangemi, R. M. R. *et al.* SOX2 Silencing in Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Causes Stop of Proliferation and Loss of Tumorigenicity. *Stem Cells* **27**, 40–48 (2009).
 21. Guo, G. *et al.* Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* **136**, 1063–1069 (2009).
 22. Tso, C.-L. *et al.* Primary Glioblastomas Express Mesenchymal Stem-Like Properties. *Mol Cancer Res* **4**, 607–19 (2006).
 23. Hambardzumyan, D. *et al.* PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev.* **22**, 436–448 (2008).
 24. Kim, S.-E. *et al.* Wnt stabilization of β -catenin reveals principles for morphogen receptor-scaffold assemblies. *Science* **340**, 867–870 (2013).
 25. Liu, C. *et al.* Wnt/beta-Catenin pathway in human glioma: expression pattern and clinical/prognostic correlations. *Clin. Exp. Med.* **11**, 105–112 (2011).
 26. Zuccarini, M. *et al.* The Role of Wnt Signal in Glioblastoma Development and Progression: A Possible New Pharmacological Target for the Therapy of This Tumor. *Genes (Basel)*. **9**, 105 (2018).
 27. Jin, Y.-R., Turcotte, T. J., Crocker, A. L., Han, X. H. & Yoon, J. K. The canonical Wnt signaling activator, R-spondin2, regulates craniofacial patterning and morphogenesis within the branchial arch through ectodermal-mesenchymal interaction. *Dev. Biol.* **352**, 1–13 (2011).
 28. Bazzoni, R. & Bentivegna, A. Role of Notch Signaling Pathway in Glioblastoma Pathogenesis. 1–25 (2019). doi:10.3390/cancers11030292
 29. Han, N. *et al.* Notch1 ablation radiosensitizes glioblastoma cells. *Oncotarget* **8**, 88059–88068 (2017).
 30. Phillips, H. S. *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* **9**, 157–173 (2006).
 31. Grudzien, P. *et al.* Inhibition of notch signaling reduces the stem-like population of breast cancer cells and prevents mammosphere formation. *Anticancer Res.* **30**, 3853–3867 (2010).
 32. Liu, Y. *et al.* Relationship between glioblastoma heterogeneity and survival time: An MR imaging texture analysis. *Am. J. Neuroradiol.* **38**, 1695–1701 (2017).
 33. Fayzullin, A. *et al.* Phenotypic and Expressional Heterogeneity in the Invasive Glioma Cells. *Transl. Oncol.* **12**, 122–133 (2019).
 34. Lathia, J., Mack, S., Mulkearns-Hubert, E., Valentim, C. & Rich, J. Cancer stem cells in glioblastoma Justin. *Genes Dev.* **26**, 758 (2015).
 35. Eyler, C. E. *et al.* Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2. *Cell* **146**, 53–66 (2011).
 36. An, Z., Aksoy, O., Zheng, T., Fan, Q. W. & Weiss, W. A. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: Signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene* **37**, 1561–1575 (2018).

37. Liu, X. *et al.* The third-generation EGFR inhibitor AZD9291 overcomes primary resistance by continuously blocking ERK signaling in glioblastoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**, 1–14 (2019).
38. Schettini, F. *et al.* CDK 4/6 Inhibitors as Single Agent in Advanced Solid Tumors. *Front. Oncol.* **8**, 608 (2018).
39. Touat, M., Idbaih, A., Sanson, M. & Ligon, K. L. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **28**, 1457–1472 (2017).
40. Bastien, J. I. L., McNeill, K. A. & Fine, H. A. Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date. *Cancer* **121**, 502–516 (2015).
41. Barros, L. R. C. *et al.* Transcriptional characterization of immunological infiltrates and their relation with glioblastoma patients overall survival AU - Pereira, Mariana Brutschin. *Oncoimmunology* **7**, e1431083 (2018).
42. Kwak, Y. *et al.* C-MET overexpression and amplification in gliomas. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 14932–14938 (2015).
43. Bourseau-Guilmain, E. *et al.* In vitro expansion of human glioblastoma cells at non-physiological oxygen tension irreversibly alters subsequent in vivo aggressiveness and AC133 expression. *Int. J. Oncol.* **40**, 1220–9 (2012).
44. Glumac, P. M. & LeBeau, A. M. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin. Transl. Med.* **7**, 1–14 (2018).
45. Klughammer, J. *et al.* The DNA methylation landscape of glioblastoma disease progression shows extensive heterogeneity in time and space. *Nat. Med.* **24**, 1611–1624 (2018).
46. Wenger, A. *et al.* Intratumor DNA methylation heterogeneity in glioblastoma: Implications for DNA methylation-based classification. *Neuro. Oncol.* **21**, 616–627 (2019).
47. Dagogo-Jack, I. & Shaw, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 81–94 (2018).
48. Radhakrishna, V. K. *et al.* Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nat. Med.* **22**, 262–269 (2016).

Chapitre 2 :

Targeting Tumor Associated Macrophages to Overcome Conventional Treatment Resistance in Glioblastoma

Glioblastoma (GBM) is the most common form of brain cancer with the worst prognosis. Even after combining multiple strategies (surgery, radio and chemotherapy) constituting the basis of the conventional treatments, recurrences occur systematically leading to the death of the patients. In recent years, new interesting therapeutic strategies are emerging in a certain number of cancers, but they have here, in the particular case of GBM to face a lot of more challenging issues among which isolation of the rest of the body by the BBB (Blood-Brain Barrier) and a unique microenvironment, the central nervous system (CNS) with unique neural and non-neural resident cells. A large proportion of the microenvironment consists of several types of immune cells. Among these, tumor-associated macrophages (TAMs) are of significant interest as they are often involved in facilitating tumor progression as well as development of resistance to standard therapies. In this review, the omnipresence of TAMs in GBM will be first discussed. Next, the peculiar case of resident microglia in the brain will be addressed. Furthermore, the roles of TAMs as an accomplice to GBM progression and resistance to treatment will be presented. Finally, the clinical trials targeting TAMs as a means of treating cancer will be summarized.

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most frequent form of brain tumors and it is associated with a poor prognosis. The median survival of GBM patients post diagnosis is around 15 months¹. Conventional treatments consist of surgery followed by external radiotherapy and concomitant chemotherapy based on temozolomide (TMZ)². However, recurrence inevitably occurs. Currently, no therapy can completely cure GBM; current treatments can only marginally improve the overall survival of patients. The current strategy focuses mostly on targeting the tumor cells, failing to account for other cellular constituents present in the tumor. Hence, to cure and achieve a complete resection of GBM tumors, new therapeutic strategies are in great demand.

GBM is a highly heterogeneous tumor, with diverse co-existing cell types that include tumor cells, endothelial cells, fibroblasts and different cell types of the immune system^{3,4,5}. The host defense is composed of both innate and adaptative immune cells and they are both involved in immune surveillance and suppression in cancer. As a tumor arises and evolves toward a more invasive and metastatic state, the immune system can play different role during those tumor stage. Normally, the immune system is able to eliminate abnormal cells such as tumor cells. However, starting one point in the process of tumorigenesis, they are unable to correctly do their job. It is mainly due to some

tumor cells having a non-immunogenic phenotype that won't be recognized and eliminated by the immune system. Thus, those cells can continue to proliferate abnormally. This step is called immune editing. The last step is the coercion of the immune system by the tumor also known as the immune escape phase. At that point, the tumor can recruit immune cells and change their original function and turn them into accomplices^{6,7}. Tumor cells can inhibit the cytotoxic function of the immune system by secreting immunosuppressive factors or recruiting immunosuppressive inflammatory cells. The dual role of immune cells is highly trendy nowadays because reversing the effect of tumor on them would lead back to a tumoricidal response. A particular emphasis has been placed on the immune system and especially on macrophages as they are the dominant infiltrating immune cell population in GBM. These cells interact with tumor cells to promote tumor growth and progression⁸. In relation to this, macrophages appear to be a promising target to improve the effectiveness of actual therapy as more and more information on their physiological and pathological roles in the brain is being uncovered.

Macrophages are the most abundant infiltrating immune cells in GBM tumor but their function can be altered from their homolog in healthy tissues^{9,10}. Macrophages located in the tumor microenvironment are called tumor associated macrophages (TAMs). Under normal physiological conditions, macrophages are implicated in different processes such as organ development, tissue homeostasis, host defense against infections. These cells can also participate in metabolic disorders, immune diseases and cancer development¹¹. In GBM, TAMs represent up to 30% of the tumor mass^{12,13}. Both the activation status and the number of TAMs present in the tumor microenvironment seem to influence GBM prognosis and bear data on prognostic¹⁴⁻¹⁶.

Macrophages are characterized by their plasticity and heterogeneity. They can be activated by different types of stimuli (growth factors, cytokines, microbial products, nucleotides) which in turn will affect macrophages differently¹⁷. *In vitro*, the stimulation of macrophages by interferon-g (IFN-g) and/or lipopolysaccharides (LPS) induces the classical (M1) macrophage polarization¹⁸. M1 macrophages helps with the generation of Thelper Type 1 (Th1) lymphocytes. Classically activated macrophages are good effectors to fight malignant tumors and are associated with chronic inflammation¹⁹. Those macrophages are characterized by a high expression of IL-12, IL-23, and a low expression of IL-10. They can also produce elevated levels of pro-inflammatory cytokines IL-1b, TNF- α (Tumor Necrosis Factor), and IL-6, and increase the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and reactive oxygen species (ROS). Another known stimulus for M1 macrophages is GM-CSF

(granulocyte macrophage colony-stimulating factor). It activates STAT5, which leads to the activation of PI3K AKT pathway and induces an M1 phenotype²⁰.

On the contrary, macrophages stimulated *in vitro* by IL-4 and/or IL-13 are called alternatively activated (M2) macrophages²¹. They are known effectors for promoting Th2 lymphocytes. They are involved in angiogenesis and tumor progression²². This phenotype is associated with a low expression of IL-12, IL-23 and a high expression of IL-10 and TGF- β . Furthermore, M2 also have a high level of arginase 1 (Arg1), mannose receptors, scavenger receptors. M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) and IL-34 also induce an M2 phenotype. Both M-CSF and IL-34 possess the same receptor named CD115 and activate the MAPKinase signaling leading to alternatively activated macrophages²⁰. Although TAMs are mainly described as either M1 or M2 macrophages, in the tumor this is more complex than it appears. M1 and M2 phenotypes are the extremity of the polarization status, and TAMs are represented through a continuum of phenotypes between those two polar states.

TAMs that are described in the tumor are mostly M2 macrophages. They have in most cases pro-tumorigenic functions that promote tumor growth, invasion, angiogenesis, and tumor metastasis. In the GBM microenvironment, both TAMs derived from blood monocytes and those that originate from resident macrophages called microglia can be found. Hence, macrophages appear to be an attractive target for new therapeutic strategies²³.

The goal of this review is to discuss whether macrophages could be worth considering as therapeutic targets for GBM and to summarize the existing drugs targeting macrophages. In the second part of this review, the presence of microglia in brain tumor will be discussed. Then, the roles of TAMs in regulating the tumor development, progression and the response to conventional therapy will be reviewed. Finally, a survey of clinical trials testing drugs against macrophages in cancer will be presented.

2. The presence of TAMs in GBM: Reality or not?

When talking about the tumor mass in GBM, TAMs are described to represent the main immune cells population. Nevertheless, even described as such, they are not taken in account in the GBM classification. The World Health Organization (WHO) classification of Central Nervous System (CNS) tumors was restructured in 2016. The molecular parameters are now included for diagnosis in contrast to the 2007 WHO classification that only included histological data^{24,25}. There the tumor is mainly

described and thought for its tumor cells population. However, we should not forget that GBM also consists of many different noncancerous cells which play a supportive or not role.

The tumor microenvironment is now emerging as an important regulator of cancer progression⁴. Even if the WHO classification now includes the tumor molecular data, no information on the tumor microenvironment has been included so far. Data from the literature seems to suggest that molecular distinction in GBM is correlated with differences in their microenvironment²⁶. The current diagnosis guidelines fail to account for the immune cell infiltration, despite the fact that no solid tumor has ever been seen without them. In 2012, a meta-analysis of the literature showed that a high density of TAMs appeared to be associated with a poor prognosis for head and neck cancer, ovarian cancer, breast cancer and with a better prognosis for colorectal cancer²⁷⁻²⁹. In the case of GBM, the presence of TAMs has already been well described³⁰⁻³². Interestingly, their localization in the tumor appear to be dependent on their phenotypes³³. In a mouse model, TAMs were observed near the perivascular areas in the tumor and they seem to be implicated in gliomagenesis⁸.

Furthermore, a study based on MR imaging in GBM showed that highly aggressive tumors were also correlated with the presence of TAMs³⁴. A study described TAMs as a predictive tool for survival as macrophages, Tregs cells, NK cells in glioblastoma were a sign of poor disease outcomes³⁵. Caponegro *et al* also described a correlation between the presence of TAMs and an unfavorable prognosis for GBM³⁶. Further evidence revealed that human GBM have a mixed population of M1/M2 macrophages, and the different levels of TAMs population correlated with the patients survival chances in IDH1R132H-non-mutant GBMs³⁷. Also, another study on high-grade gliomas showed that M2 macrophages were correlated with an unfavorable prognostic³⁸. Taking into account these findings, the presence of TAMs in GBM have been well proven. Macrophages are important for the progression of GBM and including them to the classification of these tumors may give more information on the prognosis.

3. Microglia: the resident macrophages of the CNS

Microglia are the resident macrophages of the brain and a healthy CNS macrophage population consists only of resident microglia. Resident microglia and peripheral macrophages have a distinct origin, as microglia arises from the yolk sac primitive macrophages during embryogenesis^{39,40}. Although their origin differs, they share common morphological and histological characteristics. Differentiating between microglia and peripheral macrophages is a difficult and quite formidable

task, since they share common markers on their surface. The blood brain barrier is impaired in neuropathological diseases, thus allowing an infiltration of monocytes from the periphery. In GBM, both resident microglia and peripheral macrophages can be detected⁴¹. The name TAMs may very well include both resident microglia and monocyte-derived macrophages^{42,43}. Microglial and blood derived monocytes have distinct function. Hence, it is crucial to understand their molecular differences and their specific roles in the tumor.

In order to separate macrophages of hematopoietic origin and resident microglia, CD45 was used in FACS analysis⁴⁴. However, resident microglia can upregulate their expression of CD45, making them indistinguishable from peripheral macrophages⁴⁵. A recent study investigating markers in microglia showed that only a small batch of genes differentiate resident microglia from peripheral macrophages⁴⁶. By using a genetically engineered mouse, it was showed that peripheral macrophages represent the majority of TAMs in the tumor, and resident microglia form a minor TAMs population⁴⁷. A 6 cytokine-related gene signature in resident microglia was shown to be sufficient to predict survival and identify M2 cells in GBM⁴⁸. Moreover, resident microglia and peripheral macrophages have different preferential localizations. Peripheral macrophages prefer perivascular areas while resident macrophages are usually situated near the peritumoral zone. Although many studies tried to decipher the origin of TAMs in the tumor, no clear answer has yet been obtained as the data are contradictory.

Resident microglia are described to be involved in many processes including tumor growth and progression^{49,50}. Microglia was shown to contribute to the invasiveness of GBM by upregulating SERPINA3 expression in glioblastoma stem cells (GSCs) that is implicated in the remodeling of extracellular matrix⁵¹. Resident microglia were also shown to mediate GBM progression and stemness through the activation of IRF7 that generate an inflammatory environment⁵². Resident microglia are also involved in antitumor immunity processes through the expression of TLR2 (Toll-like receptor) that downregulate their MHC class II expression⁵³. In a murine model, EZH2 expression in GBM was shown to be involved in the activation of TAMs toward the M2 phenotype, creating an immune deficient environment⁵⁴. Both resident and peripheral macrophages are uniquely involved in supporting GBM growth and progression. Hence, if we wish to target TAMs as a means of treating GBM, we must first classify this population into peripheral macrophages and resident microglia and counter their exact roles in GBM initiation and maintenance.

4. Tumor associated macrophages: a partner in crime for tumor cells

A tumor can influence its microenvironment, and inversely. Thus, the interactions between the tumor cells and the nearby noncancerous cells are crucial to promote tumor angiogenesis, peripheral immune tolerance, and tumor growth. As previously said, TAMs are highly represented inside the tumor microenvironment. They are known for their heterogeneous phenotype which, if we simplify, can be either with pro-tumor (M2) or anti-tumor function (M1). As TAMs are highly plastic cells, they can program themselves into both subpopulations. This gives them the ability to have different functions in different tumor areas.

4.1. Biology of the tumor

4.1.1. Tumor cells

The effect of TAMs on tumor cells is dependent on their type of activation. The reprogrammed M1 TAMs suppress the growth of glioblastoma cells⁵⁵ meanwhile the M2 macrophages are described to favor tumor growth and resistance to therapy⁵⁶.

A macrophage with pro-tumor function in the tumor microenvironment is a macrophage that enhances the tumor initiation and growth. TAMs and tumor cells actively communicate with each other leading to the tumor progression (**Figure 16**). Their communication is mediated by interleukins IL-6 and IL-10 and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)^{57,58}. These cytokines activate signaling pathways in the tumor cells that boost processes such as proliferation, invasion and vascularization (**Figure 16**). TGF- β 1 secretion by TAMs is responsible for the recruitment of CSCs positive for CD133 expression. Another consequence for TGF- β 1 secretion, is the production of MMP-9 by CSCs rendering them highly invasive⁵⁸. TAMs are able to secrete pleiotrophin (PTN), CSCs on their cell surface express the PTN receptor: PTPRZ1. Once PTN is recognized by its receptor, it stimulates CSCs maintenance and tumorigenic potential, and therefore promotes GBM growth⁵⁹. TAMs expressing PTN are also positive for the expression of CD163, an M2 lineage marker. Ying Wang et al. showed that macrophages support GBM invasiveness through the CCL4-CCR5 axis that enhances MMP-9 expression⁶⁰. Hypoxia was also shown to positively contribute to this mechanism by enhancing CCL4 and CCR5 expression. An increase of TAMs in a mouse model was shown to decrease the survival of the mice associated with a reduction of CD8+ T cells⁶¹. On top of that, EGFR activation level and TAMs infiltration were shown to be correlated too. Consequently, EGF can induce an upregulation of

vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) that favor the interaction between TAMs and tumor cells, which in turn promoted tumor cell invasion⁶². MerTK is a tyrosine kinase expressed by macrophages, it suppresses the innate immune response, its expression was shown to be more elevated in tumor recurrence. TAMs that express MerTK are also associated with tumor growth and resistance to treatment, thus making MerTK a potential therapeutic target⁶³. The molecular crosstalk between tumor cells and macrophages appears to be important for the tumor growth and malignant progression. Therefore, modulating the exchange between those two may be therapeutically relevant.

4.1.2. Angiogenesis

GBM is a highly hypoxic tumor with prominent necrotic regions due to the rapid proliferation of GBM cells. The cellular composition of the tumor core is quite different from the peritumoral area. The tumor core is more hypoxic, contains more CD163+ TAMs and has a higher expression of VEGF-A⁶⁴. A downstream effect of the hypoxia and necrosis is an increase in vascular proliferation. TAMs are located near the vascular area in the tumor microenvironment. Endothelial cells produce IL-6 that induces the expression of arginase-1 and thus the alternative phenotype in TAMs⁶⁵. This alternative activation is mediated by the hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α). *Wang et al* targeted IL-6 expression in a mice model and improved the survival of GBM-bearing mice.

VEGF, a major factor for vascularization was shown to be implicated in promoting pro-angiogenic function of TAMs in a glioblastoma rodent model⁶⁶. Glioma overexpressing VEGF were shown to be correlated with an increase in the expression of major histocompatibility complex I (MHC) and MHCII on macrophages. Endothelial and TAMs interaction leads to angiogenesis through the expression of TGF- β 1 and integrin α v β 3, which induces the activation of the SRC-PI3K-YAP signaling⁶⁷ (**Figure 16**). The pro-angiogenic properties of TAMs are mediated by the protein CRCR1. This protein activates PDGFB-PDGFR β pathways and promotes pericyte recruitment, migration, and tumor angiogenesis⁶⁸. In sum, TAMs have a proangiogenic function in GBM. Thus, targeting macrophages may improve the response to anti-angiogenic therapies^{69,70}. Indeed, inhibition of the recruitment of macrophages with a SDF-1 inhibitor in combination with a VEGF inhibitor was more effective and decreased tumor invasiveness and vascular density.

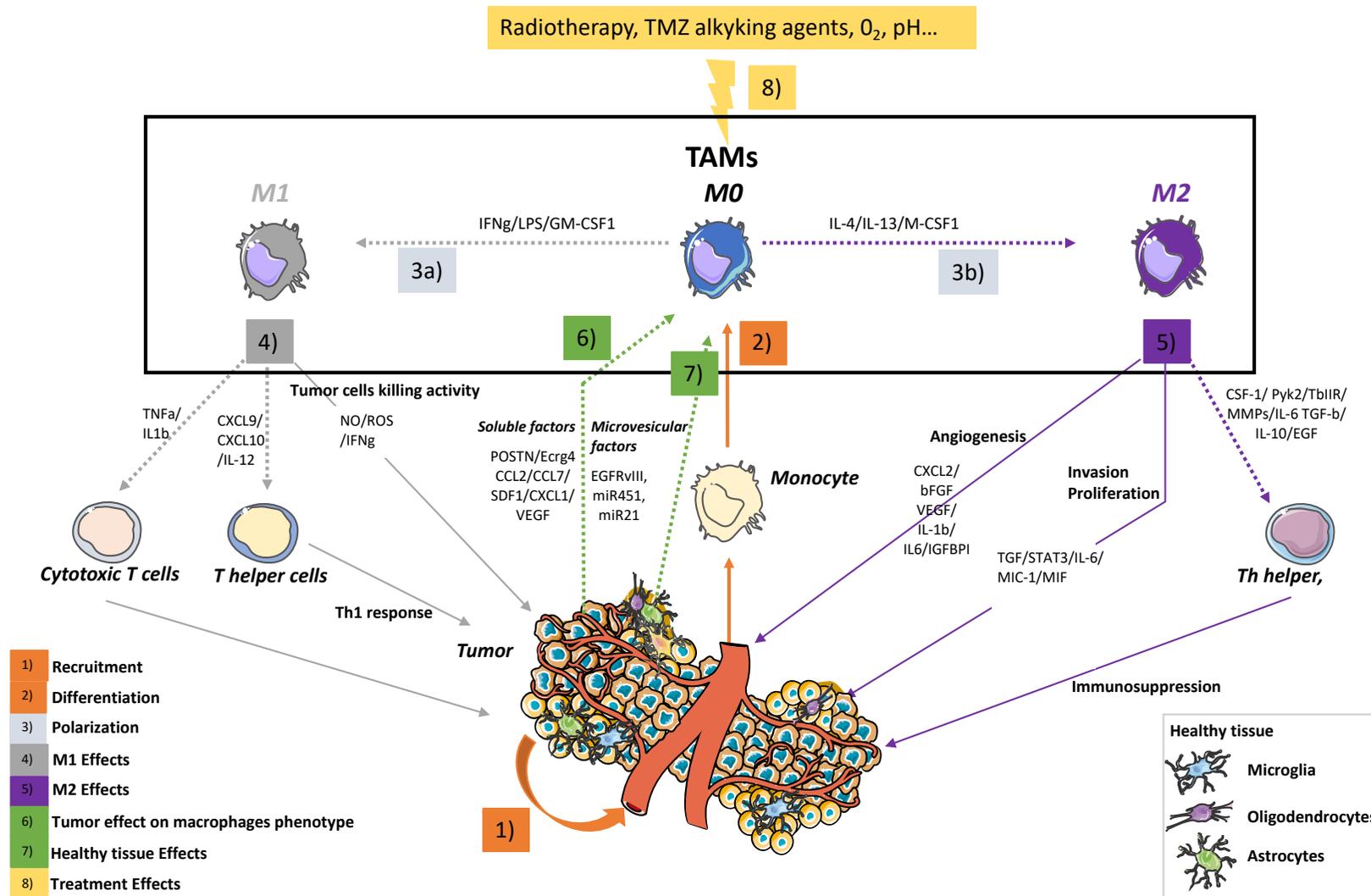


Figure 16: Tumor associated macrophages activities in glioblastoma progression (for legend see below)

Figure 15: This figure shows the pro-tumor (Angiogenesis, Invasion, Proliferation and immunosuppression properties) and anti-tumor (Tumor cells killing, Th1 response and anti-tumor activity) activities of TAMs in brain tumors. (1) Once the blood brain barrier is disrupted in GBM, it leads to circulating monocytes recruitment to the tumor site. (2) After their arrival at the tumor site, monocytes differentiate into M0 macrophages. (3) In order to support itself, tumor developed the ability to recruit TAMs for its own benefit. Tumor cells can recruit TAMs through the production of soluble factors (CCL2/CCL7/SDF1/CX3CL1/ VEGF/POSTN/Ecrg4)^{8,66,98,131-134} and microvesicular factors (EGFRvIII, miR451, miR21)^{120,123}. (4) Another player in the tumor environment that is very poorly described are the healthy brain cells which may probably interact with TAMs and may be involved in their programming. However, their interaction has yet to be studied more. (5) Environmental cues like radiotherapy, chemotherapy, O₂ level, pH are also involved in the programming and function of macrophages¹³⁵. (6) TAMs that are recruited can polarize into a continuum of macrophages states that are described by their two extremes: M1 (anti-tumor macrophages) (6a) or an M2 (pro-tumor macrophages) (6b) phenotype depending on the signal they receive (IFN γ /LPS/TNF α /GM-CSF for M1 and IL-4/IL-10/IL-13/M-CSF for M2)^{16,32,136}. (7) If M0 respond to M1 stimuli, they will polarize toward an M1 phenotype with anti-tumor properties such as the ability to directly kill tumor cells mediated by the production of NO, ROS, IFN γ ^{92,137}. They also mediate a pro-inflammatory response in the tumor through the activation of T helper 1 cells (Th1) by secreting CXCL9, CXCL10, IL-12¹³⁸. Finally, they can activate cytotoxic T cells with TNF α and IL1b, thus leading to a cytotoxic response against tumor cells. (8) However, if M0 macrophages respond to M2 stimuli, they will differentiate toward an M2 phenotype with properties such as enhancing the invasive and proliferative ability of GBM cells by secreting CSF-1, MMPs, Pyk2, T β IIR, TGF β , IL-6, IL-10 and EGF. They can also mediate the immunosuppressive environment in the tumor microenvironment through the expression of IL-6, MIC-1, MIF, STAT3 and TGF β . Finally, M2 TAMs also regulate angiogenesis through the following factors: IL-6, MIC-1, MIF, STAT3 and TGF β .

4.1.3. Immune environment

Each tumor is characterized by an immune suppressive environment that forms one hallmark of cancer⁷¹. This is partly contributed by the TAMs present in the tumor microenvironment

The expression of immune and inflammatory genes well-regulated in a tumor microenvironment. TAMs strongly inhibit the proliferation of T cells in the tumor microenvironment⁷². It was found that

IKKbeta levels were reduced for microglia in GBM; consequently, the NF-kappaB expression was decreased leading to a defective immune and inflammatory gene expression in macrophages⁷³. However, NF-kappaB signaling is required for peripheral macrophages polarization and immune suppression in GBM, making NF-kappaB a suitable target to improve overall survival in GBM⁷⁴. It was shown that an inhibition of transcription factors such as NF-kappaB, a mediator of M2 macrophages activation, led to slower tumor growth and prolonged survival in a mouse model. It also decreased T cell induction rendering the tumor less immunosuppressive⁷⁵. Targeting NF-KappaB may improve the effectiveness of the current standard therapies.

TAMs express IL-4Ralpha that promotes immunosuppression. They also express arginase that is critical for T cell inhibition^{76,77}. Chemokine ligand 22 (CCL22) is produced by TAMs and its expression is associated with a low survival rate and CD4+ T cells activation⁷⁸. Another regulator of the immunosuppressive environment in GBM is fibrinogen-like protein 2 (FGL2). Its expression is shown to be correlated with higher number of CD4+ T cells and M2 macrophages⁷⁹. The colony stimulating factor receptor (CSF1R) is required for the recruitment of TAMs in the tumor microenvironment. It is also involved in promoting the polarization of macrophages toward the M2 phenotype. Inhibition of CSF1R attenuates the recruitment of TAMs and also increases the CD8+ T cell infiltration⁸⁰ (**Figure 16**). One more regulator of the immune microenvironment is the receptor tyrosine kinase AXL that is expressed in TAMs⁸¹. Its inhibition in a GBM mouse model helped to prolong survival. Furthermore, myeloid derived suppressor cell (MDSC) such as TAMs have been described to be activated by tumor cells through MIF expression. Overall, targeting TAMs may disturb the immunosuppressive environment of the tumor, allowing the immune cells to function more effectively

Box 1: Non-cancerous brain cells alters macrophages polarization and function. Cancerous cells cooperate with its surrounding such as the tumor microenvironment. The brain is also the home of specific cell type with their own characteristics and function, although those cells are not part of the tumor, they can also interact with it. The interaction between cells residing in the brain and TAMs are very poorly studied. However, the interaction between macrophages and healthy cells is more described for other pathology which will be quickly reviewed in this box. Both neurons and astrocytes can produce CX3CL1, the receptor for CX3CL1 is found on microglia⁵⁰. CX3CL1 promotes TAMs recruitment and increases the expression of MMPs and thus invasive properties. When an ischaemic

stroke happens, ischaemic neurons are able to prime microglia toward an M1 phenotype during an injury⁸². Another cell type is oligodendrocyte, they are cells that accounts for the formation of myelin sheath in the brain. It was found that near the tumor border macrophages and oligodendrocyte progenitor cells colocalized. At this site of colocalization, those cells induced stemness and resistance to therapy for GBM cells⁸³. Non-cancerous cells of the brain interact with macrophages and lead them to polarize them toward a specific phenotype.

4.2. TAMs & therapeutics

4.2.1. TAMs & surgical resection

Surgical resection is the current standard treatment for GBM. However, limited data on the biological consequences of surgical resection of the tumor have been published so far. It was reported that surgical resection increases proliferation and angiogenesis⁸⁴. After surgical resection, TAMs were shown to express higher level of CD163, a M2 macrophages marker, and their localization was close to the site of recurrence⁸⁵. Both TAMs and oligodendrocyte progenitor cells are localized near the tumor periphery. They enhance the stemness and chemo-radioresistance in GBM cells⁸³. It was shown that tumor with TAMs expressing the telomerase were correlated with a partial resection⁸⁶. The inability to surgically remove the whole tumor contributes to the poor prognosis and recurrence of GBM.

4.2.2. TAMs & radiotherapy

Macrophages inside the tumor mass are involved in multiple phenomena that include radiation resistance. The radiation in itself induces changes in the tumor microenvironment and renders the tumor more aggressive. In fact, recurrence mostly appears near the irradiated area⁸⁷. Radiotherapy induces a rapid inflammatory response leading to TAMs recruitment. This inflammatory response is correlated with a short survival period⁸⁸. In a radioresistant GBM model, the total RNA was sequenced and it was found that there was a positive regulation of macrophage chemotaxis following radiation⁸⁹. Also, in a murine glioma model, an increase in SDF-1 at the tumor invasion front after radiotherapy was correlated with the recruitment of TAMs and radioresistance⁹⁰. TAMs participate in the induction of glioblastoma cell differentiation to a mesenchymal state through NF-KappaB, an event that correlate with radiation resistance⁹¹. Recently, Leblond et al. showed that M1 macrophages are more sensitive to radiation than M2 macrophages⁹². The proportion of M2 macrophages in

irradiated tissues is thus increased. Moreover, M2 macrophages were described to contribute to relapses in oral cancer by promoting vascularization after radiation treatment⁹³. Irradiation of the tumor leads to the alteration of multiple pathways. In particular, it modifies the macrophages activation type, rendering them more supportive to the tumor growth.

4.2.3. TAMs & chemotherapy

The standard treatment of GBM affects the molecular profiles of the tumor. Temozolomide (TMZ) is commonly used to treat GBM. TAMs that express CD74 were described to be involved in TMZ resistance by inducing Akt and Erk1/2 activation in tumor cells⁹⁴. Gene expression profiling showed that the tumor found after treatment was not matching the primary tumor which did not receive any treatment. After treatment, the polarization toward the M2 phenotype was upregulated⁹⁵. Tumor protein 53 (p53) is involved in promoting the development of the tumor. GBM with the p53 isoform $\Delta 133p53\beta$ had increased CD163-positive macrophages⁹⁶. Moreover, $\Delta 133p53\beta$ supports cancer stemness in cancer⁹⁷. In addition, it is correlated with resistance to TMZ⁹⁶. GBM is able to evade the toxic effect of the chemotherapy but it can equally evade the action of the immune system. Hence, a cocktail of multiple drugs targeting different pathways may provide the most effective therapy for GBM that can improve the overall survival.

Target	Drugs	Inhibitor type	Clinical trial	Benefit
CCL2-CCR2 AXIS	Carlumab	mAb	NCT00992186 ¹³⁹ (completed, has results) NCT01204996 ¹⁴⁰ (Completed) NCT00537368 ¹⁴¹ (Completed)	Progression of the disease was observed
	PF-04136309	Small molecule	NCT02732938 ¹⁴² (Terminated)	Unknown
	MLN1202	mAb	NCT01015560 ¹⁴³ (Completed, has results)	Well tolerated.
	CCX872-B	Small molecule	NCT03778879 ¹⁴⁴ (Not yet recruiting)	Unknown
	BMS-813160	Small molecule	NCT03496662 ¹⁴⁵ (Recruiting)	Unknown
CD47	Hu5F9-G4	mAb	NCT02953509 ¹⁴⁶ (Recruiting) NCT03248479 ¹⁴⁷ (Recruiting) NCT02216409 ¹⁴⁸ (Active, not recruiting) NCT02678338 ¹⁴⁹ (Recruiting) NCT02953782 ¹⁵⁰ (Recruiting)	Unknown
	TTI-621	Small molecule	NCT03530683 ¹⁵¹ (Recruiting) NCT02663518 ¹⁵² (Recruiting)	Unknown
	ALX148	Small molecule	NCT03013218 ¹⁵³ (Recruiting)	Unknown
	SRF231	mAb	NCT03512340 ¹⁵⁴ (Recruiting)	Unknown
	CC-90002	mAb	NCT02367196 ¹⁵⁵ (Recruiting)	Unknown
	IBI188	mAb	NCT03763149 ¹⁵⁶ (Not yet recruiting) NCT03717103 ¹⁵⁷ (Recruiting)	Unknown

Table 4: Clinical trial targeting the recruitment of macrophages

5. Current therapies targeting tumor associated macrophages in cancer

5.1. Targeting the recruitment of TAMs

One strategy to target TAMs is to block their recruitment to the tumor site. It can be achieved by targeting the chemokine ligand 2 (CCL2) - chemokine receptor 2 (CCR2) axis. CCL2 is an inflammatory chemokine that can recruit macrophages and Treg leading to an immunosuppressive environment⁹⁸. To achieve this, a human IgG1k mAb called Carlumab was developed. A survey of clinical trials involving the CCL2-CCR2 axis is provided in [Table 4](#).

A phase 2 study showed that this antibody was well-tolerated. However, it did not block the CCL2-CCR2 axis, nor had an antitumor activity as a single agent in metastatic prostate cancer⁹⁹ (NCT00992186). When Carlumab was combined with four other chemotherapies, the treatment was still well tolerated but the suppression of CCL2-CCR2 axis remained elusive¹⁰⁰ (NCT01204996). In other studies, Carlumab was shown to transiently suppress CCL2 and had preliminary antitumor activity¹⁰¹ (NCT00537368). PF-04136309 combined with chemotherapy was also shown to be well-tolerated and led to a response in the tumor¹⁰².

5.2. Reprogramming of TAMs toward an antitumoral phenotype

As mentioned previously, TAMs can exist in different functional states between the M1 and M2 phenotypes, making them highly heterogeneous and plastic cells¹⁰³. Thus, they can either be pro-tumoral or tumoricidal¹⁰⁴. Reprogramming the TAMs toward a tumoricidal state may be a plausible therapeutic strategy. Different strategies are actually studied at the clinical level. These are reported in [Table 5](#).

Target	Drugs	Inhibitor type	Clinical trial	Benefit
CD40	APX005M	mAb	NCT03502330 ¹⁵⁸ (Recruiting); NCT02482168 ¹⁵⁹ (Active, not recruiting); NCT03123783 ¹⁶⁰ (Recruiting); NCT03389802 ¹⁶¹ (Recruiting); NCT03165994 ¹⁶² (Recruiting)	Unknown
	Selicrelumab	mAb	NCT02304393 ¹⁶³ (Recruiting)	Unknown
	ChiLob 7/4	mAb	NCT01561911 ¹⁶⁴ (Completed)	Unknown
	CP-870,893	mAb	NCT00607048 ¹⁶⁴ (Completed)	Unknown
	CDX-1140	Small molecule	NCT03329950 ¹⁶⁵ (Recruiting)	Unknown
TLR7	LHC165	Small molecule	NCT03301896 ¹⁶⁶ (Recruiting)	Unknown
	Imiquimod	Small molecule	NCT01421017 ¹⁶⁷ (Completed) NCT00899574 ¹⁶⁸ (Completed, has results)	Well tolerated. Partial responder with a tumor regression & immune response was observed
	NKTR-262	Small molecule	NCT03435640 ¹⁶⁹ (Recruiting)	Unknown
	IMO-8400	Small molecule	NCT02252146 ¹⁷⁰ (Completed, has results)	Lack of efficacy
	Resiquimod	Small molecule	NCT00821652 ¹⁷¹ (Completed)	Unknown
	DSP-0509	Small molecule	NCT03416335 ¹⁷² (Recruiting)	Unknown
TLR8	VTX-2337	Small molecule	NCT02431559 ¹⁷³ (Completed); NCT01294293 ¹⁷⁴ (Completed); NCT01334177 ¹⁷⁴ (Completed); NCT02452697 ¹⁷⁵ (Recruiting)	Unknown
TLR9	EMD 1201081	Small molecule	NCT01040832 ¹⁷⁶ (Completed, has results)	EMD 1201081 was well tolerated in combination with cetuximab, but no clinical efficacy was observed ¹⁷⁷
	DUK-CPG-001	Small molecule	NCT02452697 ¹⁷⁵ (Recruiting)	Unknown
	IMO-2055	Small molecule	NCT00719199 ¹⁷⁸ (Completed); NCT00633529 ¹⁷⁹ (Completed)	Unknown
	CMP-001	Small molecule	NCT03618641 ¹⁸⁰ (Recruiting); NCT03507699 ¹⁸¹ (Recruiting)	Unknown
	SD-101	Small molecule	NCT03007732 ¹⁸² (Recruiting); NCT03410901 ¹⁸³ (Recruiting); NCT02927964 ¹⁸⁴ (Recruiting); NCT02254772 ¹⁸⁵ (Completed, has results)	Well tolerated but progression of the tumor was observed

Table 5: Clinical trial with TLR agonist for macrophages reprogramming

5.2.1. Inhibition of CD47

Inhibition of CD47 is an effective strategy as this can facilitate the process of phagocytosis of tumor cells by macrophages. CD47 inhibits phagocytosis through its interaction with thrombospondin 1 and signal regulatory protein- α (SIRP α) that sends out a 'do not eat me' signal. Many tumors are described to overexpress CD47^{105,106}. Inhibition of CD47 in a preclinical model showed a modification of microglia phenotypes in GBM that was correlated with better survival¹⁰⁷. Furthermore, *in vivo*, the anti-CD47 treatment is able to shift the macrophages phenotype toward an M1 type¹⁰⁸ and induces anti-tumor effects¹⁰⁹. The preclinical study of Hu5F9-G4 in pediatric malignant primary brain model demonstrated that this CD47 inhibitor is a safe and effective therapeutic agent¹¹⁰. Hu5F9-G4 was also shown to be well tolerated in a clinical trial¹¹¹ (NCT02216409, **Table 5**). TTI-621, a small molecule inhibiting CD47, is being investigated in an ongoing clinical trial.

5.2.2. Inhibition of CD40

CD40 is expressed on monocytes, macrophages, dendritic cells, and B cells. It is a receptor that belongs to the TNF receptor superfamily. Many clinical trials against CD40 are ongoing (**Table 5**). In a mouse model, targeting CD40 was useful in producing antitumor effects that greatly improved the overall survival¹¹². Targeting CD40 resulted in an alteration of the immune cell number and led to an antitumor response^{113,114}. In a mouse model, the combination of CSF1R and CD40 inhibition induced the reprogramming of TAMs¹¹⁵, thus allowing the protective response of T cells¹¹⁶.

5.2.3. TLR antagonist

Toll-like receptors (TLRs) are normally activated by bacterial particles and viral nucleic acids (RNA or DNA), which leads to the macrophage polarization towards the pro-inflammatory phenotype. Using a TLR agonist to reprogram macrophages was thus of interest in cancer treatment. Numerous TLR7 ligands, TLR9 ligands and one TLR8 ligand have been tested for their antitumoral properties in clinical trials (Table 4). For example, Imiquimod, a TLR7 agonist, has been tested and it was well tolerated and associated to tumor regression and increased lymphocytic infiltrate¹¹⁷ (NCT00899574). The TLR7 agonist, 852A, was also well tolerated with reversible side effects¹¹⁸. IMO-2055, a TLR9 agonist demonstrated a possible antitumor activity when combined with erlotinib and bevacizumab¹¹⁹ (NCT00633529).

Box 2: The content of exosomes as a therapeutic target to control TAMs phenotype. Exosomes are microvesicles (30-120 μ m) that are secreted through exocytosis by various cells. They exert a variety of biological effects. GBM cells can secrete exosomes that carries proteins such as EGFR variantIII (EGFRvIII)¹²⁰. The content of exosomes was shown to be different between the O2 level as cancer cells can adapt to their surroundings¹²¹. Exosomes can mediate immunosuppressive properties in GBM through their internalization in monocytes. Once they are internalized, it causes a rearrangement of the monocytes cytoskeleton and induces an M2 phenotype¹²². *Vos et al* visualized the effect of GBM-derived exosomes on TAMs, they observed a shift of their cytokine profile to an immune-suppressive profile¹²³. They also saw an elevation of miR-21 in TAMs associated with a decrease of c-Myc mRNA level. GBM-derived exosome was shown to modify the expression of cell surface protein, cytokine expression (IL-6 and VEGF) and increase phagocytic activity in macrophages¹²⁴. Also, blood sample from patient with GBM were analyzed and shown positive for the presence of GBM-derived exosomes containing immunoglobulin (Ig)G2 and IgG4 antibody isotypes¹²⁵. Those exosomes were able to induce the expression of CD163, an indicator of the M2 phenotype. Exosomes appears to be important for the communication between tumor cells and TAMs in GBM. As they are a tool to control the tumor microenvironment, targeting them may impair the regulator effect of GBM cells on TAMs immunosuppressive properties.

5.3. Depletion of TAMs

TAMs are dependent on the CSF1R signaling pathway for their activation. Therefore, CSF1R appears to be a way to target macrophages specifically. Many small molecules and antibodies were developed against CSF1R, and numerous clinical trials have been completed or are ongoing (**Table 6**). PLX3397 is a small molecule targeting CSF1R, and it reduced the number of TAMs in a preclinical GBM model and showed an antitumor activity^{126,127}. In clinical studies, PLX3397 was also well tolerated and showed anti-tumor responses after treatment¹²⁸ (NCT01004861). In the case of GBM, PLX3397 was also well tolerated but showed no efficacy¹²⁹ (NCT01349036). BLZ945, another small molecule inhibitor of CSF1R can alter the polarization of TAMs in glioma¹⁶. It is currently being assessed in a clinical trial.

Another way to deplete the number of TAMs in the tumor is to use bisphosphonates. They are described for both direct and indirect anti-tumoral effects such as induction of tumor apoptosis and

inhibition of cell adhesion. More importantly, they affect the behavior of TAMs¹³⁰. Bisphosphonates are divided in two classes depending on their structure and mechanism of action. Clodronate belongs to the first group while zoledronate belongs to the second group. Both zoledronate and clodronate are still being assessed in clinical trials (**Table 6**).

6. Conclusion

We know that in the GBM microenvironment, both resident microglia and peripheral macrophages are present. Their presence is correlated with a better outcome or a worse one depending on dominating macrophages phenotype. Hence, there is an urgent need to better define their specific roles in tumor initiation and progression. One more reason to study TAMs is because of their implication in the way the tumor responds to therapy and due to their localization on the recurrence site. It is becoming clear that macrophages may be a useful target to improve the outcome in GBM. Currently, many drugs targeting macrophages are being tested at the clinical level. However, only a few of them are tested specifically for GBM. The immune landscape in GBM, and in cancer in general, must be investigated further as there is a lack of efficacy at the clinical stage when TAMs are targeted. In our opinion, if choosing to target TAMs in cancer, it must be in complement with other therapy to potentially improve the overall effect. In summary, TAMs seem to be a promising target to overcome resistance that arises in GBM.

Target	Drugs	Inhibitor type	Clinical trial	Benefit
CSF1R	Pexidartinib	Small molecule	NCT02777710 ¹⁸⁶ (Recruiting)	Unknown
	DCC-3014	Small molecule	NCT03069469 ¹⁸⁷ (Recruiting)	Unknown
	LY3022855	mAb	NCT03153410 ¹⁸⁸ (Recruiting) NCT02718911 ¹⁸⁹ (Completed) NCT03101254 ¹⁹⁰ (Recruiting)	Unknown
	PLX3397	Small molecule	NCT01004861 ¹⁹¹ (Completed) NCT02452424 ¹⁹² (Completed) NCT01349036 ¹⁹³ (Completed) NCT02371369 ¹⁹⁴ (Active, not recruiting)	Unknown
	MCS110	Small molecule	NCT03694977 ¹⁹⁵ (Not yet recruiting)	Unknown
	IMC-CS4	Small molecule	NCT01346358 ¹⁹⁶ (Completed)	Unknown
	Cabiralizumab	mAb	NCT03697564 ¹⁹⁷ (Not yet recruiting) NCT02526017 ¹⁹⁸ (Active, not recruiting)	Unknown
	SNDX-6352	mAb	NCT03238027 ¹⁹⁹ (Recruiting)	Unknown
	JNJ-40346527	Small molecule	NCT03557970 ²⁰⁰ (Not yet recruiting)	Unknown
	ARRY-382	Small molecule	NCT02880371 ²⁰⁰ (Recruiting) NCT01316822 ²⁰¹ (Completed)	Unknown
	BLZ945	Small molecule	NCT02829723 ²⁰² (Recruiting)	Unknown
	RO5509554	Small molecule	NCT01494688 ²⁰³ (Completed)	Unknown
NA	Clodronate	Bisphosphonate	NCT01198457 ²⁰⁴ (Completed) NCT00009945 ²⁰⁵ (Completed, has results) NCT00909142 ²⁰⁶ (Completed) NCT00003232 ²⁰⁷ (Completed) NCT00127205 ²⁰⁸ (Active, not recruiting)	Treatment with clodronate suggest a benefit in recurrence rates for postmenopausal women with breast cancer ²⁰⁹
	Zoledronate	Bisphosphonate	NCT00301873 ²¹⁰ (Completed, has results) NCT00885326 ²¹¹ (Active, not recruiting) NCT01345019 ²¹² (Active, not recruiting)	

Table 6: Clinical trial using drugs to deplete the tumor of macrophages

References

1. Stupp, R. *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.* **10**, 459–466 (2009).
2. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 987–996 (2005).
3. Charles, N. A., Holland, E. C., Gilbertson, R., Glass, R. & Kettenmann, H. The brain tumor microenvironment. *Glia* **59**, 1169–1180 (2011).
4. Quail, D. F. & Joyce, J. A. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* **31**, 326–341 (2017).
5. Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–1437 (2013).
6. Brown, N. F., Carter, T. J., Ottaviani, D. & Mulholland, P. Harnessing the immune system in glioblastoma. *Br. J. Cancer* **119**, 1171–1181 (2018).
7. Finn, O. J. A Believer’s Overview of Cancer Immunosurveillance and Immunotherapy. *J. Immunol.* **200**, 385–391 (2018).
8. Feng, X. *et al.* Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. *Oncotarget* **6**, 15077–15094 (2015).
9. Nishie, A. *et al.* Macrophage Infiltration and Heme Oxygenase-1 Expression Correlate with Angiogenesis in Human Gliomas. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1107 LP – 1113 (1999).
10. Hussain, S. F. *et al.* The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro. Oncol.* **8**, 261–279 (2006).
11. Sica, A., Erreni, M., Allavena, P. & Porta, C. Macrophage polarization in pathology. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 4111–4126 (2015).
12. 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.* **74**, 269–277 (1987).
13. Graeber, M. B., Scheithauer, B. W. & Kreutzberg, G. W. Microglia in brain tumors. *Glia* **40**, 252–259 (2002).
14. Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J. & Takeya, M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J. Pathol.* **216**, 15–24 (2008).
15. Lu-Emerson, C. *et al.* Increase in tumor-associated macrophages after antiangiogenic therapy is associated with poor survival among patients with recurrent glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **15**, 1079–1087 (2013).
16. Pyonteck, S. M. *et al.* CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* **19**, 1264 (2013).
17. Poh, A. R. & Ernst, M. Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Front. Oncol.* **8**, 49 (2018).
18. Nielsen, S. R. & Schmid, M. C. Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis. *Mediators Inflamm.* **2017**, 9624760 (2017).

19. Atri, C., Guerfali, F. Z. & Laouini, D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1801 (2018).
20. Jeannin, P., Paolini, L., Adam, C. & Delneste, Y. The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages. *FEBS J.* **285**, 680–699 (2018).
21. Murray, P. J. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
22. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **6**, 13 (2014).
23. Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* **41**, 49–61 (2014).
24. Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97–109 (2007).
25. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* **131**, 803–820 (2016).
26. Zhernakova, A., Garmaeva, S., Fu, J., Chen, L. & Wijmenga, C. A system biology perspective on environment-host-microbe interactions. *Hum. Mol. Genet.* **27**, R187–R194 (2018).
27. Zhang, Q. *et al.* Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One* **7**, e50946–e50946 (2012).
28. Zhao, X. *et al.* Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget* **8**, 30576–30586 (2017).
29. Yuan, D. *et al.* Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain. *Biomaterials* **142**, 1–12 (2017).
30. Séhédic, D. *et al.* Locoregional confinement and major clinical benefit of 188re-loaded CXCR4-targeted nanocarriers in an orthotopic human to mouse model of glioblastoma. *Theranostics* **7**, 4517–4536 (2017).
31. Saha, D., Martuza, R. L. & Rabkin, S. D. Macrophage Polarization Contributes to Glioblastoma Eradication by Combination Immunovirotherapy and Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Cell* **32**, 253–267.e5 (2017).
32. Roesch, S., Rapp, C., Dettling, S. & Herold-Mende, C. When Immune Cells Turn Bad-Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 436 (2018).
33. Schiffer, D., Annovazzi, L., Casalone, C., Corona, C. & Mellai, M. Glioblastoma: Microenvironment and Niche Concept. *Cancers* **11**, (2018).
34. Zhou, J. *et al.* MR Imaging Characteristics Associate with Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma and Provide an Improved Signature for Survival Prognostication. *Am. J. Neuroradiol.* **39**, 252 LP – 259 (2018).
35. Barros, M. H. M., Hauck, F., Dreyer, J. H., Kempkes, B. & Niedobitek, G. Macrophage polarisation: An immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One* **8**, e80908 (2013).
36. Caponegro, M. D., Moffitt, R. A. & Tsirka, S. E. Expression of neuropilin-1 is linked to glioma associated microglia and macrophages and correlates with unfavorable prognosis in high

- grade gliomas. *Oncotarget* **9**, 35655–35665 (2018).
37. Zeiner, P. S. *et al.* Distribution and prognostic impact of microglia/macrophage subpopulations in gliomas. *Brain Pathol.* **0**, (2018).
 38. Sørensen, M. D., Dahlrot, R. H., Boldt, H. B., Hansen, S. & Kristensen, B. W. Tumour-associated microglia/macrophages predict poor prognosis in high-grade gliomas and correlate with an aggressive tumour subtype. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **44**, 185–206 (2018).
 39. Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D. & Huber, T. Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 45 (2013).
 40. Ginhoux, F. & Williams, M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**, 439–449 (2016).
 41. Lisi, L. *et al.* Expression of iNOS, CD163 and ARG-1 taken as M1 and M2 markers of microglial polarization in human glioblastoma and the surrounding normal parenchyma. *Neurosci. Lett.* **645**, 106–112 (2017).
 42. Szulzewsky, F. *et al.* Glioma-associated microglia/macrophages display an expression profile different from M1 and M2 polarization and highly express Gpnmb and Spp1. *PLoS One* **10**, e0116644–e0116644 (2015).
 43. Kloepper, J. *et al.* Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 4476 LP – 4481 (2016).
 44. Badie, B., Schartner, J., Vorpahl, J. & Preston, K. Interferon- γ Induces Apoptosis and Augments the Expression of Fas and Fas Ligand by Microglia in Vitro. *Exp. Neurol.* **162**, 290–296 (2000).
 45. Müller, A., Brandenburg, S., Turkowski, K., Müller, S. & Vajkoczy, P. Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells. *Int. J. Cancer* **137**, 278–288 (2015).
 46. Walentynowicz, K. A. *et al.* In Search for Reliable Markers of Glioma-Induced Polarization of Microglia. *Front. Immunol.* **9**, 1329 (2018).
 47. Chen, Z. *et al.* Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Res.* **77**, 2266–2278 (2017).
 48. Cai, J. *et al.* Identification of a 6-cytokine prognostic signature in patients with primary glioblastoma harboring M2 microglia/macrophage phenotype relevance. *PLoS One* **10**, e0126022–e0126022 (2015).
 49. Bryukhovetskiy, I. S. *et al.* Hematopoietic stem cells as a tool for the treatment of glioblastoma multiforme. *Mol. Med. Rep.* **14**, 4511–4520 (2016).
 50. Matias, D. *et al.* Microglia/Astrocytes–Glioblastoma Crosstalk: Crucial Molecular Mechanisms and Microenvironmental Factors . *Frontiers in Cellular Neuroscience* **12**, 235 (2018).
 51. Li, Y. *et al.* SERPINA3 induced by astroglia/microglia co-culture facilitates glioblastoma stem-like cell invasion. *Oncol. Lett.* **15**, 285–291 (2018).
 52. Li, Z. *et al.* Interferon Regulatory Factor 7 Promoted Glioblastoma Progression and Stemness by Modulating IL-6 Expression in Microglia. *J. Cancer* **8**, 207–219 (2017).
 53. Qian, J. *et al.* TLR2 Promotes Glioma Immune Evasion by Downregulating MHC Class II

- Molecules in Microglia. *Cancer Immunol. Res.* **6**, 1220 LP - 1233 (2018).
54. Yin, Y. *et al.* EZH2 suppression in glioblastoma shifts microglia toward M1 phenotype in tumor microenvironment. *J. Neuroinflammation* **14**, 220 (2017).
 55. Li, T.-F. *et al.* Harnessing the cross-talk between tumor cells and tumor-associated macrophages with a nano-drug for modulation of glioblastoma immune microenvironment. *J. Control. Release* **268**, 128-146 (2017).
 56. Xue, N. *et al.* Chlorogenic acid inhibits glioblastoma growth through repolarizing macrophage from M2 to M1 phenotype. *Sci. Rep.* **7**, 39011 (2017).
 57. Wagner, S. *et al.* Microglial/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas. *Int. J. Cancer* **82**, 12-16 (1999).
 58. Ye, X. *et al.* Tumor-Associated Microglia/Macrophages Enhance the Invasion of Glioma Stem-like Cells via TGF- β 1 Signaling Pathway. *J. Immunol.* **189**, 444 LP - 453 (2012).
 59. Shi, Y. *et al.* Tumour-associated macrophages secrete pleiotrophin to promote PTPRZ1 signalling in glioblastoma stem cells for tumour growth. *Nat. Commun.* **8**, 15080 (2017).
 60. Wang, Y. *et al.* Hypoxia and macrophages promote glioblastoma invasion by the CCL4-CCR5 axis. *Oncol. Rep.* **36**, 3522-3528 (2016).
 61. Chae, M. *et al.* Increasing glioma-associated monocytes leads to increased intratumoral and systemic myeloid-derived suppressor cells in a murine model. *Neuro. Oncol.* **17**, 978-991 (2015).
 62. Zheng, Y., Yang, W., Aldape, K., He, J. & Lu, Z. Epidermal growth factor (EGF)-enhanced vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression promotes macrophage and glioblastoma cell interaction and tumor cell invasion. *J. Biol. Chem.* **288**, 31488-31495 (2013).
 63. Wu, J. *et al.* MerTK as a therapeutic target in glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **20**, 92-102 (2018).
 64. Tamura, R. *et al.* Difference in Immunosuppressive Cells Between Peritumoral Area and Tumor Core in Glioblastoma. *World Neurosurg.* **120**, e601-e610 (2018).
 65. Wang, Q. *et al.* Vascular niche IL-6 induces alternative macrophage activation in glioblastoma through HIF-2 α . *Nat. Commun.* **9**, 559 (2018).
 66. Turkowski, K. *et al.* VEGF as a modulator of the innate immune response in glioblastoma. *Glia* **66**, 161-174 (2018).
 67. Cui, X. *et al.* Hacking macrophage-associated immunosuppression for regulating glioblastoma angiogenesis. *Biomaterials* **161**, 164-178 (2018).
 68. Zhu, C. *et al.* CECR1-mediated cross talk between macrophages and vascular mural cells promotes neovascularization in malignant glioma. *Oncogene* **36**, 5356-5368 (2017).
 69. Deng, L. *et al.* SDF-1 Blockade Enhances Anti-VEGF Therapy of Glioblastoma and Can Be Monitored by MRI. *Neoplasia (United States)* **19**, 1-7 (2017).
 70. Gagner, J. P. *et al.* Multifaceted C-X-C Chemokine Receptor 4 (CXCR4) Inhibition Interferes with Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy-Induced Glioma Dissemination. *Am. J. Pathol.* **187**, 2080-2094 (2017).
 71. Hanahan, D. *et al.* Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-74 (2011).
 72. Kumar, R. *et al.* Modulating glioma-mediated myeloid-derived suppressor cell development with sulforaphane. *PLoS One* **12**, 1-26 (2017).

73. Mieczkowski, J. *et al.* Down-regulation of IKK β expression in glioma-infiltrating microglia/macrophages is associated with defective inflammatory/immune gene responses in glioblastoma. *Oncotarget* **6**, 33077–33090 (2015).
74. Achyut, B. R. *et al.* Canonical NF κ B signaling in myeloid cells is required for the glioblastoma growth. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).
75. Barberi, T. *et al.* Absence of host NF- κ B p50 induces murine glioblastoma tumor regression, increases survival, and decreases T-cell induction of tumor-associated macrophage M2 polarization. *Cancer Immunol. Immunother.* **67**, 1491–1503 (2018).
76. Kohanbash, G. *et al.* GM-CSF promotes the immunosuppressive activity of glioma-infiltrating myeloid cells through interleukin-4 receptor- α . *Cancer Res.* **73**, 6413–6423 (2013).
77. Flavahan, W. A. *et al.* Cancer Stem Cell-Secreted Macrophage Migration Inhibitory Factor Stimulates Myeloid Derived Suppressor Cell Function and Facilitates Glioblastoma Immune Evasion. *Stem Cells* **34**, 2026–2039 (2016).
78. Zhou, M. *et al.* Serum macrophage-derived chemokine/CCL22 levels are associated with glioma risk, CD4 T cell lymphopenia and survival time. *Int. J. Cancer* **137**, 826–836 (2015).
79. Latha, K. *et al.* The Role of Fibrinogen-Like Protein 2 on Immunosuppression and Malignant Progression in Glioma. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **111**, 1–9 (2018).
80. Strachan, D. C. *et al.* CSF1R inhibition delays cervical and mammary tumor growth in murine models by attenuating the turnover of tumor-associated macrophages and enhancing infiltration by CD8+T cells. *Oncoimmunology* **2**, 1–12 (2013).
81. Sadahiro, H. *et al.* Activation of the Receptor Tyrosine Kinase AXL Regulates the Immune Microenvironment in Glioblastoma. *Cancer Res.* **78**, 3002 LP – 3013 (2018).
82. Hu, X. *et al.* Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* **43**, 3063–3070 (2012).
83. Hide, T. *et al.* Oligodendrocyte Progenitor Cells and Macrophages/Microglia Produce Glioma Stem Cell Niches at the Tumor Border. *EBioMedicine* **30**, 94–104 (2018).
84. Kong, B., Michalski, C. W., Friess, H. & Kleeff, J. Surgical procedure as an inducer of tumor angiogenesis. *Exp. Oncol.* **32**, 186–189 (2010).
85. Zhu, H. *et al.* Surgical debulking promotes recruitment of macrophages and triggers glioblastoma phagocytosis in combination with CD47 blocking immunotherapy. *Oncotarget* **8**, 12145–12157 (2017).
86. Hung, N. A. *et al.* Telomere profiles and tumor-associated macrophages with different immune signatures affect prognosis in glioblastoma. *Mod. Pathol.* **29**, 212–226 (2016).
87. Gupta, K. & Burns, T. C. Radiation-Induced Alterations in the Recurrent Glioblastoma Microenvironment: Therapeutic Implications. *Front. Oncol.* **8**, 503 (2018).
88. Tabatabaei, P. *et al.* Radiotherapy induces an immediate inflammatory reaction in malignant glioma: a clinical microdialysis study. *J. Neurooncol.* **131**, 83–92 (2017).
89. Doan, N. B. *et al.* Identification of radiation responsive genes and transcriptome profiling via complete RNA sequencing in a stable radioresistant U87 glioblastoma model. *Oncotarget* **9**, 23532–23542 (2018).

90. Wang, S. C., Yu, C. F., Hong, J. H., Tsai, C. S. & Chiang, C. S. Radiation Therapy-Induced Tumor Invasiveness Is Associated with SDF-1-Regulated Macrophage Mobilization and Vasculogenesis. *PLoS One* **8**, (2013).
91. Bhat, K. P. L. *et al.* Mesenchymal Differentiation Mediated by NF- κ B Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma. *Cancer Cell* **24**, 331–346 (2013).
92. Leblond, M. M. *et al.* M2 macrophages are more resistant than M1 macrophages following radiation therapy in the context of glioblastoma. *Oncotarget* **8**, 72597–72612 (2017).
93. Okubo, M. *et al.* M2-polarized macrophages contribute to neovasculogenesis, leading to relapse of oral cancer following radiation. *Sci. Rep.* **6**, 1–12 (2016).
94. Kitange, G. J. *et al.* Expression of CD74 in high grade gliomas: a potential role in temozolomide resistance. *J. Neurooncol.* **100**, 177–186 (2010).
95. Hudson, A. L. *et al.* Glioblastoma Recurrence Correlates With Increased APE1 and Polarization Toward an Immuno-Suppressive Microenvironment. *Front. Oncol.* **8**, (2018).
96. Kazantseva, M. *et al.* Elevation of the TP53 isoform $\Delta 133p53\beta$ in glioblastomas: an alternative to mutant p53 in promoting tumor development. *J. Pathol.* **246**, 77–88 (2018).
97. Arsic, N. *et al.* The p53 isoform $\Delta 133p53\beta$ promotes cancer stem cell potential. *Stem cell reports* **4**, 531–540 (2015).
98. Chang, A. L. *et al.* CCL2 Produced by the Glioma Microenvironment Is Essential for the Recruitment of Regulatory T Cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* **76**, 5671–5682 (2016).
99. Pienta, K. J. *et al.* Phase 2 study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 (CCL2), in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Invest. New Drugs* **31**, 760–768 (2013).
100. Brana, I. *et al.* Carlumab, an anti-C-C chemokine ligand 2 monoclonal antibody, in combination with four chemotherapy regimens for the treatment of patients with solid tumors: an open-label, multicenter phase 1b study. *Target. Oncol.* **10**, 111–123 (2015).
101. Sandhu, S. K. *et al.* A first-in-human, first-in-class, phase i study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 in patients with solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **71**, 1041–1050 (2013).
102. Nywening, T. M. *et al.* Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: a single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial. *Lancet. Oncol.* **17**, 651–662 (2016).
103. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* **11**, 889–896 (2010).
104. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature* **496**, 445–55 (2013).
105. Zhao, H. *et al.* CD47 promotes tumor invasion and metastasis in non-small cell lung cancer. *Sci. Rep.* **6**, 1DUMMY (2016).
106. Zhang, H. *et al.* HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of

- phagocytosis and maintenance of cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E6215–E6223 (2015).
107. Hutter, G. *et al.* Microglia are effector cells of CD47-SIRP α antiphagocytic axis disruption against glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 997–1006 (2019).
 108. Zhang, M. *et al.* Anti-CD47 Treatment Stimulates Phagocytosis of Glioblastoma by M1 and M2 Polarized Macrophages and Promotes M1 Polarized Macrophages In Vivo. *PLoS One* **11**, e0153550–e0153550 (2016).
 109. Li, F. *et al.* Blocking the CD47-SIRP α axis by delivery of anti-CD47 antibody induces antitumor effects in glioma and glioma stem cells. *Oncoimmunology* **7**, e1391973–e1391973 (2017).
 110. Gholamin, S. *et al.* Disrupting the CD47-SIRP α anti-phagocytic axis by a humanized anti-CD47 antibody is an efficacious treatment for malignant pediatric brain tumors. *Sci. Transl. Med.* **9**, 1–14 (2017).
 111. Sikic, B. I. *et al.* A first-in-class, first-in-human phase 1 pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) study of Hu5F9-G4, an anti-CD47 monoclonal antibody (mAb), in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **36**, 3002 (2018).
 112. Shoji, T. *et al.* Local convection-enhanced delivery of an anti-CD40 agonistic monoclonal antibody induces antitumor effects in mouse glioma models. *Neuro. Oncol.* **18**, 1120–1128 (2016).
 113. Vonderheide, R. H. *et al.* Phase i study of the CD40 agonist antibody CP-870,893 combined with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Oncoimmunology* **2**, 1–10 (2013).
 114. Nowak, A. K. *et al.* A phase 1b clinical trial of the CD40-activating antibody CP-870,893 in combination with cisplatin and pemetrexed in malignant pleural mesothelioma. *Ann. Oncol.* **26**, 2483–2490 (2015).
 115. Hoves, S. *et al.* Rapid activation of tumor-associated macrophages boosts preexisting tumor immunity. *J. Exp. Med.* jem.20171440 (2018). doi:10.1084/jem.20171440
 116. Perry, C. J. *et al.* Myeloid-targeted immunotherapies act in synergy to induce inflammation and antitumor immunity. *J. Exp. Med.* **215**, 877–893 (2018).
 117. Adams, S. *et al.* Rejection of Skin Metastases in Patients With Breast Cancer. *Clin. cancer reserch* **18**, 6748–6757 (2013).
 118. Dudek, A. Z. *et al.* First in human phase I trial of 852A, a novel systemic toll-like receptor 7 agonist, to activate innate immune responses in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 7119–7125 (2007).
 119. Smith, D. A. *et al.* Antitumor activity and safety of combination therapy with the Toll-like receptor 9 agonist IMO-2055, erlotinib, and bevacizumab in advanced or metastatic non-small cell lung cancer patients who have progressed following chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **63**, 787–796 (2014).
 120. Ranjan, A. *et al.* Exosomes as a biomarker platform for detecting epidermal growth factor receptor-positive high-grade gliomas. *J. Neurosurg.* 1091–1101 (2017). doi:10.3171/2016.11.jns161187

121. Zhang, G. *et al.* CD133 positive U87 glioblastoma cells-derived exosomal microRNAs in hypoxia- versus normoxia-microenvironment. *J. Neurooncol.* **135**, 37–46 (2017).
122. Gabrusiewicz, K. *et al.* Glioblastoma stem cell-derived exosomes induce M2 macrophages and PD-L1 expression on human monocytes. *Oncoimmunology* **7**, (2018).
123. Van Der Vos, K. E. *et al.* Directly visualized glioblastoma-derived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain. *Neuro. Oncol.* **18**, 58–69 (2016).
124. De Vrij, J. *et al.* Glioblastoma-derived extracellular vesicles modify the phenotype of monocytic cells. *Int. J. Cancer* **137**, 1630–1642 (2015).
125. Harshyne, L. A., Nasca, B. J., Kenyon, L. C., Andrews, D. W. & Hooper, D. C. Serum exosomes and cytokines promote a T-helper cell type 2 environment in the peripheral blood of glioblastoma patients. *Neuro. Oncol.* **18**, 206–215 (2016).
126. Coniglio, S. J. & Segall, J. E. Review: Molecular mechanism of microglia stimulated glioblastoma invasion. *Matrix Biol.* **32**, 372–380 (2013).
127. Yan, D. *et al.* Inhibition of colony stimulating factor-1 receptor abrogates microenvironment-mediated therapeutic resistance in gliomas. *Oncogene* **36**, 6049–6058 (2017).
128. Tap, W. D. *et al.* Structure-Guided Blockade of CSF1R Kinase in Tenosynovial Giant-Cell Tumor. *N. Engl. J. Med.* **373**, 428–437 (2015).
129. Butowski, N. *et al.* 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 (2016).
130. Van Acker, H. H., Anguille, S., Willemen, Y., Smits, E. L. & Van Tendeloo, V. F. Bisphosphonates for cancer treatment: Mechanisms of action and lessons from clinical trials. *Pharmacol. Ther.* **158**, 24–40 (2016).
131. Chen, Z. & Hambardzumyan, D. Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Front. Immunol.* **9**, 1004 (2018).
132. Hambardzumyan, D., Gutmann, D. H. & Kettenmann, H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat. Neurosci.* **19**, 20 (2015).
133. Zhou, W. *et al.* Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat. Cell Biol.* **17**, 170–182 (2015).
134. Lee, J. *et al.* Thrombin-processed EcrG4 recruits myeloid cells and induces antitumorigenic inflammation. *Neuro. Oncol.* **17**, 685–696 (2015).
135. Hardee, M. E. *et al.* Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor- β . *Cancer Res.* **72**, 4119–4129 (2012).
136. Kast, R. E. *et al.* Glioblastoma-synthesized G-CSF and GM-CSF contribute to growth and immunosuppression: Potential therapeutic benefit from dapsone, fenofibrate, and ribavirin. *Tumor Biol.* **39**, 1010428317699797 (2017).
137. Kennedy, B. C. *et al.* Tumor-associated macrophages in glioma: friend or foe? *J. Oncol.* **2013**, 486912 (2013).
138. Poon, C. C., Sarkar, S., Yong, V. W. & Kelly, J. J. P. Glioblastoma-associated microglia and

- macrophages: Targets for therapies to improve prognosis. *Brain* **140**, 1548–1560 (2017).
139. A Study of the Safety and Efficacy of Single-agent Carlumab (an Anti-Chemokine Ligand 2 [CCL2]) in Participants With Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00992186>.
 140. A Study of the Safety and Efficacy of CNTO 888 in Combination With SoC (Standard of Care) Chemotherapy in Patients With Solid Tumors. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01204996>.
 141. First Study of the Safety of CNTO 888 in Patients With Solid Tumors.
 142. Ph1b/2 Study of PF-04136309 in Combination With Gem/Nab-P in First-line Metastatic Pancreatic Patients (CCR2i). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02732938>.
 143. S0916, MLN1202 in Treating Patients With Bone Metastases. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01015560>.
 144. Pre-operative Stereotactic Body Radiation Therapy for Pancreatic Adenocarcinoma With or Without CCX872-B. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03778879>.
 145. BMS-813160 With Nivolumab and Gemcitabine and Nab-paclitaxel in Borderline Resectable and Locally Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03496662>.
 146. Trial of Hu5F9-G4 in Combination With Rituximab in Relapsed/Refractory B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02953509>.
 147. Hu5F9-G4 Monotherapy or Hu5F9-G4 in Combination With Azacitidine in Patients With Hematological Malignancies. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03248479>.
 148. Phase 1 Trial of Hu5F9-G4, a CD47-targeting Antibody. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02216409>.
 149. CAMELLIA: Anti-CD47 Antibody Therapy in Haematological Malignancies. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02678338>.
 150. Trial of Hu5F9-G4 in Combination With Cetuximab in Patients With Solid Tumors and Advanced Colorectal Cancer. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02953782>.
 151. A Trial of TTI-622 in Patients With Advanced Relapsed or Refractory Lymphoma or Myeloma (TTI-622-01). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03530683>.
 152. A Trial of TTI-621 for Patients With Hematologic Malignancies and Selected Solid Tumors. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02663518>.
 153. A Study of ALX148 in Patients With Advanced Solid Tumors and Lymphoma.
 154. Study of SRF231 in Patients With Advanced Solid and Hematologic Cancers. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03512340>.
 155. A Phase 1, Dose Finding Study of CC-90002 in Subjects With Advanced Solid and Hematologic Cancers. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02367196>.
 156. A Study Evaluating the Safety, Tolerability, and Initial Efficacy of Recombinant Human Anti-cluster Differentiation Antigen 47 (CD47) Monoclonal Antibody Injection (IBI188) in Patients

- With Advanced Malignant Tumors and Lymphomas. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03763149>.
157. A Phase 1 Study Evaluating the Safety, Tolerability, and Initial Efficacy of Recombinant Human Anti-cluster Differentiation Antigen 47 (CD47) Monoclonal Antibody Injection (IBI188) in Patients With Advanced Malignancies. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03717103>.
 158. APX005M With Nivolumab and Cabiralizumab in Advanced Melanoma, Non-small Cell Lung Cancer or Renal Cell Carcinoma.
 159. Study of the CD40 Agonistic Monoclonal Antibody APX005M.
 160. CD40 Agonistic Antibody APX005M in Combination With Nivolumab. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03123783>.
 161. Phase I Study of APX005M in Pediatric CNS Tumors. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03389802>.
 162. APX005M With Concurrent Chemoradiation for Resectable Esophageal and Gastroesophageal Junction Cancers.
 163. A Study of Selicrelumab (RO7009789) in Combination With Atezolizumab in Participants With Locally Advanced and/or Metastatic Solid Tumors. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02304393>.
 164. A Phase I Study of the Chimeric Anti-CD40 Monoclonal Antibody ChiLob 7/4 to Treat Advanced Malignancies Refractory to Conventional Anti-cancer Treatment. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01561911>.
 165. A Study of CDX-1140 as Monotherapy or in Combination in Patients With Advanced Malignancies. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03329950>.
 166. Study of the Safety and Efficacy of LHC165 Single Agent and in Combination With PDR001 in Patients With Advanced Malignancies. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03301896>.
 167. Toll-like Receptor (TLR) 7 Agonist, Cyclophosphamide, and Radiotherapy for Breast Cancer With Skin Metastases. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01421017>.
 168. Imiquimod for Breast Cancer Patients With Chest Wall Recurrence or Skin Metastases.
 169. A Study of NKTR-262 in Combination With NKTR-214 and With NKTR-214 Plus Nivolumab in Patients With Locally Advanced or Metastatic Solid Tumor Malignancies (REVEAL). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03435640>.
 170. Dose Escalation Study in Patients With Relapsed or Refractory DLBCL and MyD88 L265P Mutation. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02252146>.
 171. Randomized, Double Blind, Placebo-controlled Topical Resiquimod Adjuvant for NY-ESO-1 Protein Vaccination. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00821652>.
 172. A Study of DSP-0509 in Patients With Advanced Solid Tumors to Determine the Safety and the Pharmacokinetic Profile. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03416335>.
 173. A Phase 1/2 Study of Motolimod (VTX-2337) and MEDI4736 in Subjects With Recurrent, Platinum-Resistant Ovarian Cancer for Whom Pegylated Liposomal Doxorubicin (PLD) is

- Indicated. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02431559>.
174. TLR8 Agonist VTX-2337 and Pegylated Liposomal Doxorubicin Hydrochloride or Paclitaxel in Treating Patients With Recurrent or Persistent Ovarian Epithelial, Fallopian Tube, or Peritoneal Cavity Cancer. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01294293>.
 175. Ph2 NK Cell Enriched DCIs w/wo RLR9 Agonist, DUK-CPG-001 From Donors Following Allogeneic SCT (NK-DCI).
 176. EMD 1201081 in Combination With Cetuximab in Second-Line Cetuximab-Naïve Subjects With Recurrent or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01040832>.
 177. Ruzsa, A. *et al.* Phase 2, open-label, 1:1 randomized controlled trial exploring the efficacy of EMD 1201081 in combination with cetuximab in second-line cetuximab-naïve patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (R/M SCCHN). *Invest. New Drugs* **32**, 1278–1284 (2014).
 178. Study of FOLFIRI Plus Cetuximab Plus IMO-2055 in Patients With Colorectal Cancer. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00719199>.
 179. Safety of Adding IMO-2055 to Erlotinib + Bevacizumab in 2nd Line Treatment for Patients With NSCLC. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00633529>.
 180. CMP-001 in Combo With Nivolumab in Stage IIIB/C/D Melanoma Patients With Clinically Apparent Lymph Node Disease. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03618641>.
 181. Combined Immunotherapy and Radiosurgery for Metastatic Colorectal Cancer. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03507699>.
 182. Pembrolizumab in Combination With Intratumoral SD-101 Therapy. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03007732>.
 183. TLR9 Agonist SD-101, Anti-OX40 Antibody BMS 986178, and Radiation Therapy in Treating Patients With Low-Grade B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03410901>.
 184. TLR9 Agonist SD-101, Ibrutinib, and Radiation Therapy in Treating Patients With Relapsed or Refractory Grade 1-3A Follicular Lymphoma. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02927964>.
 185. A Phase I/II Study of Intratumoral Injection of SD-101. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02254772>.
 186. Evaluation of Safety and Activity of an Anti-PDL1 Antibody (DURVALUMAB) Combined With CSF-1R TKI (PEXIDARTINIB) in Patients With Metastatic/Advanced Pancreatic or Colorectal Cancers (MEDIPLEX). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02777710>.
 187. Study of DCC-3014 in Patients With Advanced Malignancies. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03069469>.
 188. Pilot Study With CY, Pembrolizumab, GVAX, and IMC-CS4 (LY3022855) in Patients With Borderline Resectable Adenocarcinoma of the Pancreas. Available at:

- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03153410>.
189. A Study of LY3022855 in Combination With Durvalumab or Tremelimumab in Participants With Advanced Solid Tumors. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02718911>.
 190. LY3022855 With BRAF/MEK Inhibition in Patients With Melanoma. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03101254>.
 191. Safety Study of PLX108-01 in Patients With Solid Tumors. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01004861>.
 192. A Combination Clinical Study of PLX3397 and Pembrolizumab To Treat Advanced Melanoma and Other Solid Tumors. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02452424>.
 193. A Phase 2 Study of PLX3397 in Patients With Recurrent Glioblastoma. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01349036>.
 194. Phase 3 Study of Pexidartinib for Pigmented Villonodular Synovitis (PVNS) or Giant Cell Tumor of the Tendon Sheath (GCT-TS) (ENLIVEN). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02371369>.
 195. Biomarker Study of PDR001 in Combination With MCS110 in Gastric Cancer. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03694977>.
 196. A Study of IMC-CS4 in Subjects With Advanced Solid Tumors. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01346358>.
 197. Nivolumab + Cabiralizumab + Gemcitabine Versus Gemcitabine in Patients With Stage IV Pancreatic Cancer Achieving Disease Control in Response to First-line Chemotherapy (GemCaN Trial). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03697564>.
 198. *Study of Cabiralizumab in Combination With Nivolumab in Patients With Selected Advanced Cancers (FPA008-003)*.
 199. A Phase 1 Study to Investigate SNDX-6352 Alone or in Combination With Durvalumab in Patients With Solid Tumors. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03238027>.
 200. CSF1R Inhibitor JNJ-40346527 in Treating Participants With Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03557970>.
 201. A Study of ARRY-382 in Patients With Selected Advanced or Metastatic Cancers. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01316822>.
 202. Phase I/II Study of BLZ945 Single Agent or BLZ945 in Combination With PDR001 in Advanced Solid Tumors. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02829723>.
 203. A Study of RO5509554 as Monotherapy and in Combination With Paclitaxel in Participants With Advanced Solid Tumors. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01494688>.
 204. Study to Investigate Adherence of Patients to Clodronate (Bonefos) Treatment (BONA). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01198457>.
 205. Clodronate With or Without Chemotherapy and/or Hormonal Therapy in Treating Women With Stage I or Stage II Breast Cancer. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00009945>.

206. Bonefos and the Consumption of Analgesics (BICAM). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00909142>.
207. Combination Chemotherapy in Treating Pain in Patients With Hormone Refractory Metastatic Prostate Cancer. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00003232>.
208. S0307 Phase III Trial of Bisphosphonates as Adjuvant Therapy for Primary Breast Cancer. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00127205>.
209. Paterson, A. H. G. *et al.* Oral clodronate for adjuvant treatment of operable breast cancer (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol B-34): a multicentre, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet. Oncol.* **13**, 734–742 (2012).
210. Zoledronate in Preventing Osteoporosis in Patients With Primary Malignant Glioma. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00301873>.
211. N2007-02:Bevacizumab,Cyclophosphamide,& Zoledronic Acid in Patients W/ Recurrent or Refractory High-Risk Neuroblastoma. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00885326>.
212. Denosumab Compared to Zoledronic Acid in the Treatment of Bone Disease in Patients With Multiple Myeloma. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01345019>.

Chapitre 3

Influence « conjointe » des macrophages et des cellules
cancéreuses de GBM sur la réponse tumorale aux
rayonnements ionisants

Dans cette partie du projet, nous nous sommes intéressés à mieux caractériser les interactions entre les macrophages et les cellules du GBM, en réponse aux rayonnements ionisants. Pour cela, je vais brièvement compléter l'introduction générale en faisant quelques rappels sur les macrophages périphériques et leur origine. Je discuterai ensuite du rôle des TAMs, population immunitaire dominante dans les GBM et plus particulièrement de leur influence sur le pronostic associé à la tumeur. Je parlerai également des facteurs connus pouvant moduler le phénotype des macrophages dans le cas du GBM. J'introduirai ensuite brièvement les différents marqueurs permettant la caractérisation des macrophages M1 et M2 dans notre projet. Enfin, je ferai le point sur les différents modèles d'étude existants pour les macrophages et microglies.

1. Introduction sur les macrophages

Les macrophages participent à l'immunité innée et sont capables de remplir différentes fonctions (phagocytose, inflammation, activation des cellules immunitaires). Afin de défendre l'ensemble du corps, les monocytes issus de la moelle osseuse peuvent infiltrer les tissus et se différencier en macrophage en réponse à différents stimuli.

1.1. La monocytopoïèse

La monocytopoïèse s'effectue dans la moelle osseuse. Les cellules souches hématopoïétiques « HSC » se différencient en cellules souches myéloïdes « GMP » (**Figure 17**). Chez la souris, les HSC sont le précurseur commun pour les granulocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes qui appartiennent toutes au système immunitaire inné. Des signaux vont ensuite induire la différenciation du précurseur GMP en précurseur commun entre les cellules dendritiques et les monocytes « MDP » (**Figure 17**)¹. L'action de GM-CSF et du M-CSF oriente la différenciation de MDP vers le précurseur monocyttaire « cMOP » (**Figure 16**). Le précurseur cMOP va ensuite pouvoir se différencier en deux types de monocyte, fonctionnellement différents, qui expriment LY6C fortement (LY6C^{hi}) ou faiblement (LY6C^{low}). Ces monocytes vont ensuite rejoindre la circulation sanguine et les monocytes LY6C^{hi} vont soit être recrutés vers le site inflammatoire, soit se convertir en monocytes LY6C^{low}². La fonction des monocytes LY6C^{low} est de surveiller l'intégrité de la paroi endothéliale. En cas de dommage, les monocytes induisent le recrutement des neutrophiles afin de procéder à la réparation de l'endothélium vasculaire^{3,4}. L'équivalent des monocytes LY6C^{hi} / LY6C^{low} est retrouvé chez l'Homme et correspond aux monocytes CD14⁺ / CD14^{low}CD16⁺ respectivement⁵.

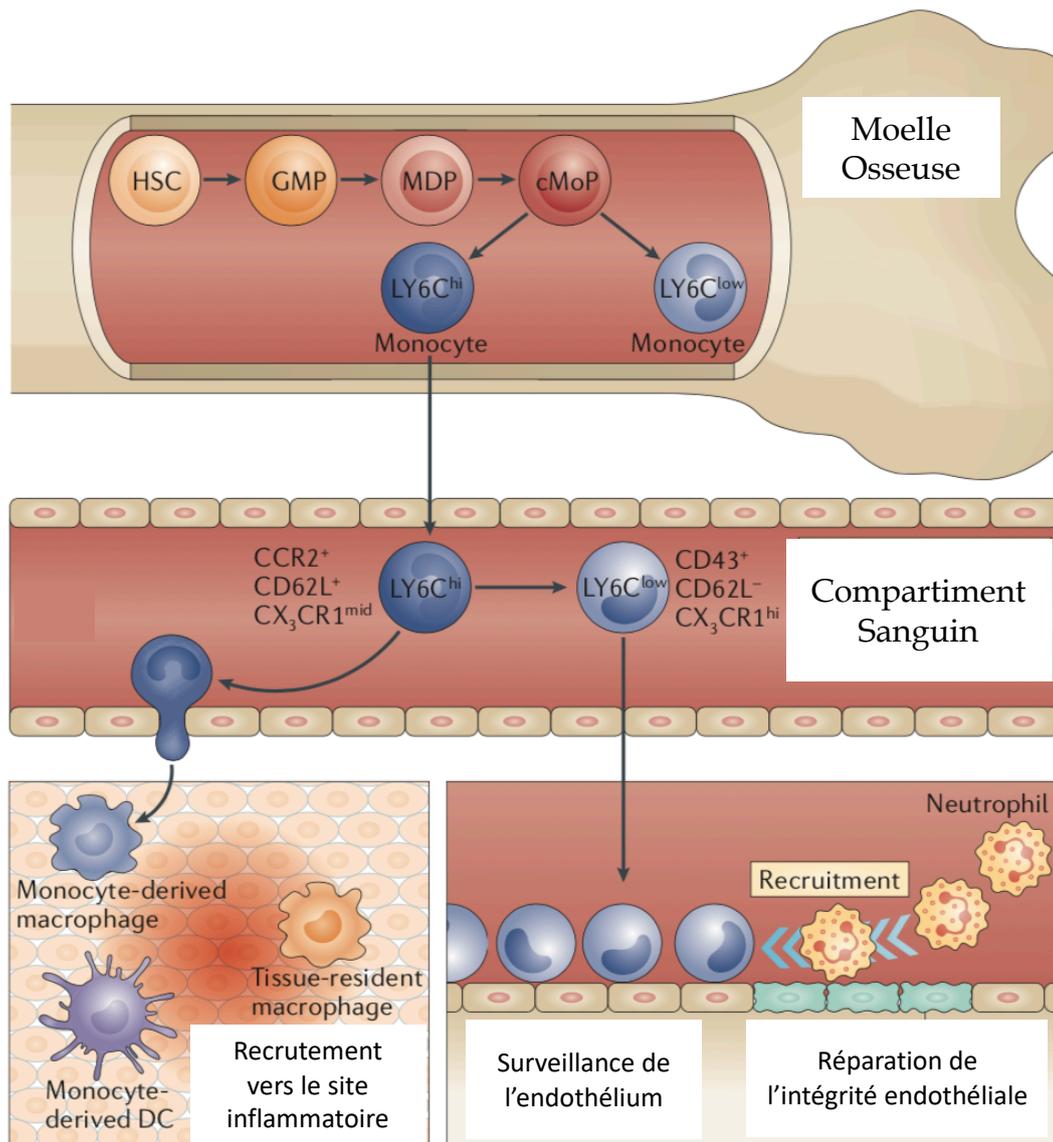


Figure 17 : La monocytopoïèse chez la souris d'après *Ginhoux et al* 2014

1.2. Les macrophages dans le GBM

L'hétérogénéité de la tumeur est représentée par la diversité au sein de la population des cellules tumorales et par les différentes cellulaires présentes dans le microenvironnement^{6,7}. Plusieurs études indiquent que les TAMs composent 15 à 30% de la masse tumorale^{8,9}. De plus, l'infiltration des TAMs au sein de la tumeur augmente progressivement¹⁰⁻¹³.

1.2.1. Influence sur le pronostic

La présence de TAMs donne une indication sur le pronostic des patients et sur leurs capacités à répondre aux différents traitements. Une étude a montré qu'un fort infiltrat en TAMs est corrélé à un GBM agressif¹⁴. Dans le GBM, lorsque les TAMs expriment fortement TNF α la survie d'un modèle murin est prolongée¹⁵. De plus, il a été observé que les GBM IDH non mutés présentent une importante infiltration en cellules inflammatoires contrairement au GBM IDH mutés¹⁶.

1.2.2. Facteurs influençant le phénotype des macrophages

Des molécules de signalisation et des facteurs de transcription sont impliqués dans l'activation des TAMs. La voie CSF-1-CSF-1R (colony-stimulating factor-1 receptor) est la plus décrite dans la littérature. Les macrophages sont dépendants de CSF-1 pour plusieurs fonctions. L'inhibition de CSF-1R fait partie des stratégies thérapeutiques ciblant les TAMs et a permis de stopper la progression tumorale¹⁷⁻¹⁹. Le facteur GM-CSF est reconnu par les TAMs et induit leur polarisation vers un phénotype pro-tumoral. Dans le cancer du sein, les cellules tumorales secrètent du GM-CSF qui induit la polarisation des TAMs vers un phénotype anti-tumoral²⁰. En plus des cellules tumorales, les autres contingents cellulaires du microenvironnement secrètent des facteurs contrôlant la polarisation des TAMs. En effet, les facteurs induits par l'hypoxie HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 α) et HIF2 α induisent la polarisation des TAMs vers un phénotype M2 montré par la production d'iNOS, marqueur associé à ce phénotype²¹. Plus récemment, les microARN (miARN) ont été décrits comme régulateur du phénotype des TAMs^{22,23}. Le miARN-155 est capable de cibler la sous-unité IL-13R α 1 du récepteur de l'IL-13 diminuant ainsi l'expression des gènes associés au phénotype M2²⁴. Récemment, il a aussi été montré que le miARN-98 est impliqué dans l'activation de type M1 des TAMs²⁵.

1.3. Les différents marqueurs associés aux TAMs

Le phénotype pouvant être acquis par les TAMs forme un continuum. Les macrophages M1 et M2 définissent les phénotypes extrêmes de ce continuum. Les macrophages ayant un phénotype M1 sont caractérisés par leur capacité à libérer des cytokines telles qu'IL-6, TNF α , CCL2, ROS^{26,27}. Les macrophages de phénotype M2 ont la capacité de produire des facteurs anti-inflammatoires et immunosuppresseurs (CD163, IL-10-CCL22).

1.3.1. Marqueurs M1

a) CD80

CD80 est exprimé sur divers types de cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques et les macrophages. C'est une glycoprotéine transmembranaire de 45-60kDa contenant deux domaines extracellulaires. L'expression de CD80 est nécessaire pour l'activation des LT CD8+ lors de la réponse immunitaire²⁸. La liaison de CD80 avec CD28, qui lui est exprimé à la surface des LT, permet de fournir au LT un signal d'activation. Le niveau d'expression de CD80 est plus fort dans les gliomes de hauts grades que dans ceux de bas grades²⁹. Les macrophages exprimant fortement CD45 expriment aussi CD80. Ces TAMs présentent donc un phénotype mixte, car ils produisent à la fois des cytokines pro et anti-inflammatoires³⁰.

b) TNF α

TNF α (Tumor Necrosis Factor α) est exprimé par différents types cellulaires dont les macrophages, les LT, les neutrophiles et les cellules NK. C'est une cytokine pro-inflammatoire, de 36 kDa constituée de deux feuilletts bêta. TNF α est impliqué dans le processus d'inflammation mis en place lors de la réponse immunitaire innée³¹. Cette cytokine peut induire la mort des cellules tumorales par apoptose³². L'expression de TNF α a été détectée chez des patients atteints d'un GBM et est impliquée dans l'agressivité de la tumeur^{33,34}.

1.3.2. Marqueurs M2

a) CD163

CD163 est une protéine exprimée par les monocytes et les macrophages³⁵. Le poids moléculaire de cette protéine est de 130kDa. C'est un récepteur de la super famille des récepteurs scavenger de classe B. Il existe 5 isoformes de CD163 possédant une structure différente au niveau de leur domaine cytoplasmique. CD163 possède différentes fonctions, dont l'homéostasie cellulaire et la régénération tissulaire, et participe aux processus anti-inflammatoires^{35,36}. Les macrophages exprimant CD163 sont localisés préférentiellement à l'intérieur de la tumeur plutôt qu'en périphérie³⁷. L'expression de CD163 est corrélée à un mauvais pronostic des patients porteurs d'un GBM^{26,38,39}.

b) IL-10

L'IL-10 (Interleukine 10) est une protéine produite par différentes cellules immunitaires, dont les macrophages. Son poids moléculaire est de 18kDa. C'est une cytokine anti-inflammatoire qui inhibe

la production d'autres cytokines telles que l'IL-2 ou le TNF α par exemple. Cette cytokine possède également une activité immunosuppressive. Dans le GBM, l'IL-10 est produite par la microglie en réponse à une augmentation de l'expression de l'ARG1 et STI1⁴². La prolifération des cellules de GBM est induite par l'expression de l'IL-10 *in vitro*⁴³.

c) CCL24

La chemokine (C-C motif) ligand 24 (CCL24) est produite par les macrophages et les cellules dendritiques. C'est une cytokine de petite taille qui fait 8,8 kDa. CCL24 est une chimiokine permettant de recruter les LT. Elle est reconnue par le récepteur CCR3 (chemokine receptor 3). C'est un marqueur associé aux macrophages M2⁴⁴. CCL24 est décrit comme un facteur de mauvais pronostic dans le carcinome hépatocellulaire et favorise l'angiogenèse⁴⁵.

1.4. Les modèles d'études pour les macrophages

Différents modèles cellulaires ont été développés afin d'étudier les TAMs. Dans ces modèles sont inclus : les cultures primaires de macrophages issus de patients, les lignées immortalisées et les macrophages primaires issus de souris¹⁶ (Figure 18).

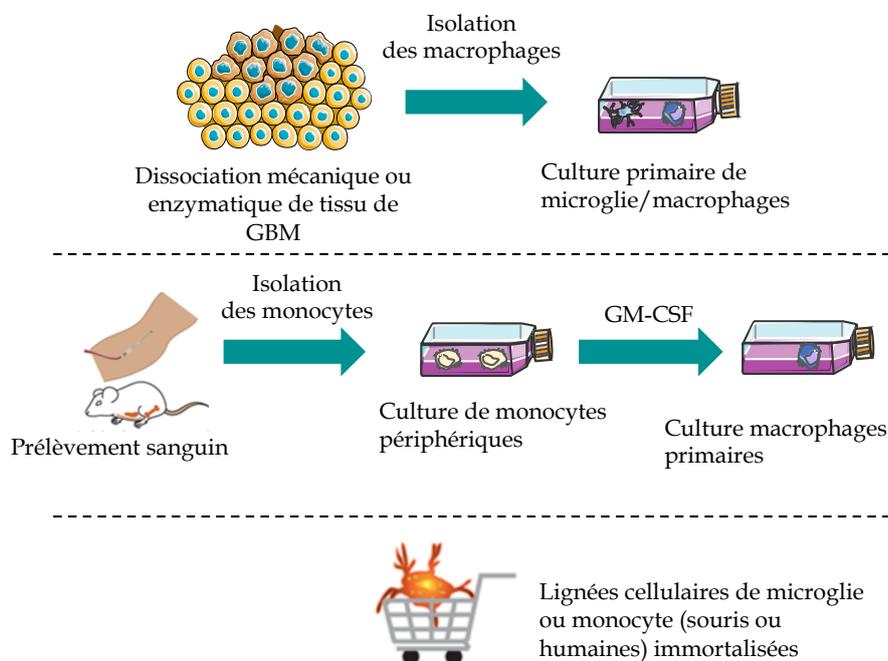


Figure 18 : Présentation des différents modèles permettant l'étude de la microglie et des macrophages d'après Poon *et al.* (2017).

1.4.1. Macrophages primaires Humains

Pour étudier les TAMs dans le GBM ou autres cancers, l'idéal est d'isoler les TAMs présents dans le tissu tumoral. Il existe pour cela différentes stratégies. Il est possible de réaliser une centrifugation avec un gradient de Percoll sur du tissu dissocié et/ou trier les cellules selon l'expression du marqueur CD11. En effet, analyser l'expression de CD11 permet de différencier les monocytes des cellules dendritiques. L'expression des marqueurs CD14 et CD16 peut également être analysée afin d'identifier les macrophages. Néanmoins, cette stratégie possède deux inconvénients : elle nécessite une très grande quantité de tissu et de nombreuses cellules meurent au cours de l'expérience. De plus, la technique de tri cellulaire ne permet pas d'obtenir une population cellulaire pure. Des astrocytes et d'autres types cellulaires peuvent aussi être isolés avec cette technique^{46,47}.

L'autre stratégie permettant d'obtenir des macrophages primaires Humains est l'utilisation de monocytes périphériques. Ils sont très facilement accessibles puisqu'une prise de sang suffit à les récolter. Le marqueur membranaire CD14 est utilisé pour trier les monocytes périphériques. Les monocytes fraîchement isolés peuvent ensuite être différenciés en les traitant avec du GM-CSF^{48,49} ou du CSF-1⁵⁰. L'avantage de cette méthode est la simplicité d'accès aux monocytes périphériques. Cependant, il a été montré que la signature transcriptomique entre les macrophages d'origine périphérique et les TAMs n'est pas la même⁵¹⁻⁵³.

1.4.2. Macrophages primaires issus de souris

La souris est le modèle le plus utilisé pour étudier les macrophages. Il est possible d'induire un développement spontané de gliome chez les souris en modifiant l'expression de certains gènes connus pour leur rôle dans la tumorigenèse (par exemple : PTEN et TP53)^{54,55}. Ces modèles peuvent ensuite être utilisés afin d'isoler les TAMs présents au sein de la tumeur. Cependant, on retrouve une limite similaire à celle décrite dans le point précédent pour les macrophages Humains, c'est-à-dire, le besoin d'une grande quantité de matériel⁵⁶. De plus, les altérations génétiques nécessaires pour induire une tumeur peuvent avoir des conséquences sur les processus immunitaires telles que des effets sur l'expansion clonal ou sur la lymphopoïèse⁵⁷. Comme chez l'Humain, un prélèvement sanguin peut être effectué afin d'isoler des monocytes périphériques. Cependant, des différences importantes existent entre les macrophages humains et ceux de la souris. L'avantage principal est qu'il est plus simple de distinguer les deux phénotypes M1 et M2 chez la souris par rapport à l'Homme (Arg1 et iNOS sont amplement suffisants).

1.4.3. Lignée cellulaire

Des lignées cellulaires immortalisées, telles que les THP-1, peuvent être utilisées pour étudier le phénotype des macrophages. Un des points limitants de l'utilisation des lignées est que leur population est homogène^{58,59}. Les THP-1 ne sont donc pas capables de reproduire toutes les réponses retrouvées dans des macrophages Humains. De plus, l'expression de seulement 12 protéines sur 41 varie dans le même sens entre les THP-1 et les macrophages primaires⁶⁰. L'utilisation de ces lignées est très controversée, car celles-ci ne répondent pas aux mêmes signaux que les macrophages primaires et n'expriment pas les mêmes marqueurs membranaires. Cependant, les THP-1 restent le modèle le plus simple d'accès pour étudier le phénotype des macrophages *in vitro*, mais ces expériences devront à terme être complétées avec l'utilisation de macrophages primaires.

1.5. Objectifs

Les cellules tumorales et le microenvironnement sont deux acteurs importants dans la radio-résistance, dans la progression tumorale, et probablement dans le développement de la récurrence. Les TAMs sont la principale population de cellules inflammatoires infiltrantes dans le GBM. Nous nous sommes donc intéressés aux interactions entre les cellules de GBM et les macrophages nouvellement recrutés en réponse aux radiations ionisantes. Afin de prendre en compte l'hétérogénéité de la tumeur, nous avons utilisé des cellules primaires humaines de GBM « Gli01 ». La population cellulaire Gli01 est hétérogène avec une faible proportion des cellules CD133⁺ (cf Chapitre 1). Pour cela, nous avons irradié (8Gy) ou non les cellules Gli01 afin de préparer le milieu conditionné. Ce milieu a ensuite été utilisé pour étudier l'effet des facteurs sécrétés par les cellules tumorales sur le phénotype des TAMs.

Les objectifs de ce chapitre sont les suivants :

- Déterminer si les cellules de GBM et leur état d'irradiation influencent le phénotype des macrophages.
- Déterminer si le phénotype des macrophages impacte la réponse aux radiations ionisantes des cellules souches tumorales.

2. Matériels et méthodes

2.1. Culture cellulaire

2.1.1. Condition de culture des THP-1

Les THP-1 sont une lignée cellulaire de monocytes humains couramment employée pour étudier les fonctions macrophagiques et utilisée dans le laboratoire. Les cellules sont cultivées dans du milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640, Lonza) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) et 1% d'antibiotique à 37°C, 5% CO₂ dans une atmosphère humide. Les cellules ont été passées deux fois par semaine lorsqu'elles atteignaient environ 80% de confluence.

2.1.2. Différenciation et polarisation des THP-1

Dans chaque puits 3,2x10⁶ cellules ont étéensemencées puis traitées pendant 24h avec 80nM de PMA (P8139, Sigma). C'est l'étape de différenciation de monocyte en macrophage. Les cellules ont ensuite été lavées avec du Phosphate Buffer Saline 1X (PBS, Lonza) avant d'être réincubées pendant 24h dans du milieu RPMI-1640 sans SVF. Les THP-1 sont ensuite traités avec du milieu conditionné contrôle, non irradié ou irradié (8 Gy). Pour certaines expériences, les cellules sont également incubées pendant 24h et 72h avec les cytokines polarisantes suivantes :

- IFN γ (20ng/mL) (130-096-484, Myltenyi Biotec) et LPS (10pg/mL) ;
- IL-4 (20ng/mL) (130-093-917, Myltenyi Biotec) et IL-13 (20ng/mL) (130-112-410,

Myltenyi Biotec).

2.2. Condition d'irradiation

Les cellules Glioblastoma ont été irradiées sur l'irradiateur Faxitron (Edimex). L'énergie utilisée pour les irradiations a été de 160Kev. L'intensité du champ électrique est définie à 6,3mA. La dose d'irradiation a été fixée à 8 Gy (soit 1,33 Gy/min).

2.3. Préparation du milieu conditionné issu de cellules tumorales de GBM

Dans une flasque T80, nous avonsensemencé 500 000 cellules dans du milieu neurosphère complété avec les différents facteurs de croissance (cf Chapitre 1). Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C

pendant 6 jours, et les facteurs de croissance ont été rajoutés tous les 3 à 4 jours (Figure 19). Au 6^e jour de culture, le milieu de culture des cellules a été changé. Le lendemain, les cellules sont irradiées à 8 Gy ou non (0 Gy), puis celles-ci sont incubées pendant 24h supplémentaires. Le milieu de culture est ainsi récolté, centrifugé à 1200 rpm pendant 10 min et filtré sur un filtre de 0.22µm. Le milieu conditionné obtenu est ainsi congelé à -20°C pendant une période maximale de 2 mois. Dans les futures expériences, nous parlerons de milieux conditionnés 0 Gy (CM 0Gy) et 8 Gy (CM 8Gy).

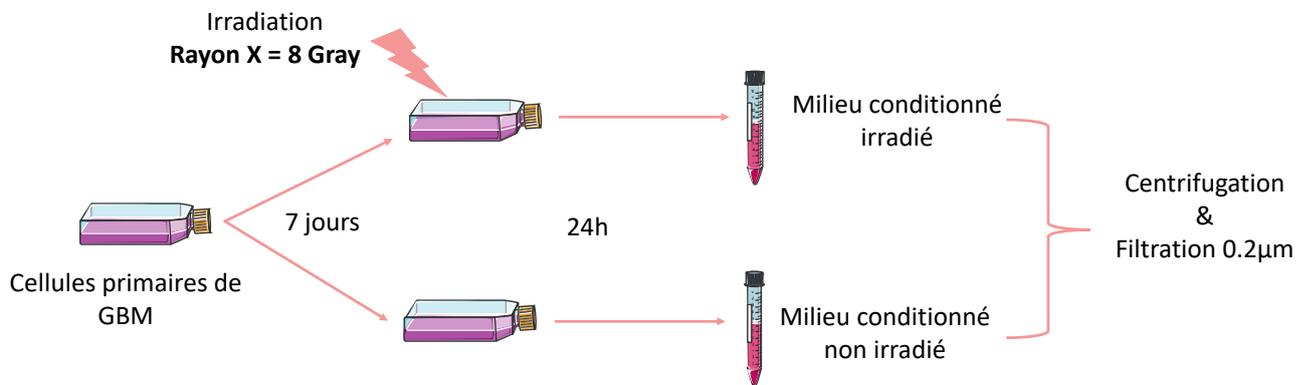


Figure 19 : Représentation schématique du protocole de préparation du milieu conditionné irradié et non irradié.

2.4. Cytométrie en flux

Après 24h et 72h de traitement avec le milieu conditionné, les THP-1 ont été incubés avec de l'acutase pendant 10 min pour les détacher. Les cellules ont ensuite été récoltées, et comptées avec du bleu de trypan. Les THP-1 ont ensuite été dilués à une concentration de 1.10^6 cellules par mL dans du PBS-BSA0,5%. Le marquage direct est ensuite réalisé en suivant le protocole du chapitre 1. Les anticorps utilisés sont les suivants : FITC souris anti-humain CD64 (#555527, BD pharmigen), PE souris anti-humain CD80 (#557227, BD pharmigen), PE souris anti-humain CD163 (#556018, BD Pharmigen,) et FITC souris anti-humain CD206 (#551135, BD Pharmigen,), IgG PE contrôle (#130-113-762, MACS), IgG FITC contrôle (#130-098-847, MACS).

2.5. RT-qPCR

Les THP-1 ont été récoltés 24 et 72h après traitement, et les culots secs ont été congelés à -20°C. Les cellules ont d'abord été lysées avec le tampon RLT (Qiagen), puis les ARN totaux ont été extraits avec le kit MicroRNeasy (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. Le dosage des ARN a été effectué à l'aide du nanodrop. La rétrotranscription (RT) des ARN en ADNc a été réalisée à l'aide du kit SuperScript II (Invitrogen). La réaction de RT a été réalisée selon les conditions suivantes : 10 minutes à 25 °C puis 1 heure à 42°C et 5 minutes à 70°C. Le kit MAXIMA syber Green Mastermix (Thermofisher) a été utilisé pour préparer les échantillons pour la qPCR. Les ADNc ont ensuite été analysés par qPCR à l'aide de l'appareil LightCycler (Roche). Les conditions de qPCR sont les suivantes : 95°C pendant 10 minutes, suivi de 40 cycles de 15 secondes à 95°C, puis 30 secondes à 60°C. Les niveaux d'expression des ADNc ont été normalisés par rapport à l'expression de l'ARNm GAPDH.

2.6. Test ELISA

Des plaques 96 puits ont été pré-coatées avec les anticorps de capture suivants : M-CSF (2ug/ml), GM-CSF (2ug/ml) et IL-34 (1ug/ml). Le lendemain, le surnageant contenant l'anticorps de capture a été éliminé et les plaques ont été lavées avec du wash buffer (R&D system, #). Une étape de saturation a ensuite été réalisée en 1h avec du Reagent diluent 1X. 100µl d'échantillon ou de gamme standard ont été déposés dans chaque puits (duplicat pour gamme, triplicat pour les échantillons). Après 2h d'incubation, les échantillons ont été incubés avec l'anticorps de détection. Enfin, nous avons réalisé l'étape de marquage et de révélation en incubant nos échantillons avec de la Streptavidin-HRP pendant 20 min. Ensuite, un lecteur de microplaques Clariostar (BMGLabtech) a été utilisé pour lire l'absorbance à 450nm.

2.7. Co-culture de cellules tumorales et de THP-1

Les cellules primaires de GBM « Glio1 » ont étéensemencées à une concentration de 100 000 cellules par puits, et incubées à 37°C pendant 6 jours. Les facteurs de croissance ont été rajoutés tous les 3-4 jours. En parallèle, les THP-1 ont étéensemencés sur des inserts 0,4µM (#051707, Millipore) et ont été traités en suivant le protocole classique de différenciation et de polarisation. À la fin du traitement de polarisation, les THP-1 ont été re-incubés dans du milieu RPMI sans SVF afin de ne pas induire la différenciation des Glio1. Les inserts contenant les macrophages ont ensuite été transférés au contact

des cellules de GBM. Les cellules ont été incubées ensemble pendant 24h avant d'être traitées ou non par irradiation (8 Gy). Les bio-assays ont ensuite été réalisés 2h ou 48h après irradiation.

2.8. Test de viabilité

La viabilité des cellules de GBM après irradiation (8 Gy) a été mesurée par un test de réduction à la résazurine (#R1017, Sigma). Ce test est considéré comme un test sensible et reproductible pour mesurer la réponse des cellules face aux rayonnements ionisants⁶¹. 24h et 72h après irradiation les cellules tumorales Gli01 ont été incubées avec la solution de résazurine (1X) pendant 2h à 37°C. L'intensité de fluorescence a ensuite été mesurée (530 nm Ex/590 nm Em) en utilisant le lecteur de microplaque Clariostar. Les données ainsi obtenues ont été comparées avec leurs contrôles respectifs et exprimées en pourcentage.

2.9. Comet assay - Condition alcaline

2.9.1. Principe

Le comet assay est une méthode basée sur un gel d'électrophorèse qui permet de mesurer la formation de dommage à l'ADN sur des cellules eucaryotes. C'est une méthode sensible qui permet de détecter les cassures double et simple brin (lyse alcaline) ou seulement les cassures double brin (lyse basique)⁶².

2.9.2. Protocole

Afin de détecter les dommages à l'ADN induits par l'irradiation, un comet assay en condition alcaline a été réalisé sur les cellules souches tumorales 2h après irradiation. Les cellules tumorales ont été dissociées 2h après irradiation selon le protocole classique (cf chapitre 1). Les Gli01 ont été diluées à une concentration 250 000 cellules par ml. 50µl de cellules ont été mélangés à 450µl de Low Gelling Agarose 1% (Sigma ; type VII, cat. No.A4018-10G). La solution d'agarose est ensuite déposée sur une lame de microscope et recouverte d'une lamelle, puis incubée pendant 10min à 4°C avant d'être transférée dans le tampon de lyse pendant la nuit (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100). Le lendemain, un lavage dans le tampon d'électrophorèse a été réalisé (0,03 M NaOH, 2 mM Na₂EDTA) avant de lancer l'électrophorèse à 0,74V/cm pendant 30 min. Une étape de neutralisation a ensuite été réalisée pendant 20min dans un tampon de TrisHCl. Les comètes ont ensuite été marquées avec du SYBRGreen (1/50 000) pendant 20 min. Les photographies des comètes ont été faites par microscopie à épifluorescence (Grossissement x20) (Zeiss) équipée d'une caméra

(Photometric CoolSNAP ES). Le tail moment a été mesuré en utilisant OpenComet 1.3 sur ImageJ (deux expériences, 200 cellules analysées).

2.10. Analyses statistiques

Les données sont représentées sous forme de moyenne avec les écarts types. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism 6 (GraphPad). Une analyse ANOVA entre plusieurs groupes a été réalisée suivie d'un test Holm Sidak.

3. Résultats

3.1. Influence des cellules tumorales de GBM sur le phénotype des macrophages

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les cellules tumorales de GBM ont une influence sur le phénotype les macrophages nouvellement recrutés dans le tissu tumoral, nous avons traité les THP-1 différenciés en macrophages avec du milieu conditionné issu de la culture pendant 24h et 72h. Puis, nous avons analysé l'expression de marqueurs M1 (CD80, TNFa) et M2 (CD206, CD163, CCL24, IL-10) par RT-qPCR et cytométrie en flux. Le milieu conditionné a été obtenu à partir de cellules de GBM appelées « Glio1 ». Ce milieu a été récolté 24h après avoir irradié à 8 Gy les cellules tumorales. Dans ce manuscrit, les milieux conditionnés irradié et non irradié seront notés CM 8 Gy et CM 0 Gy respectivement.

Nous avons observé que lorsque les THP-1 se polarisent au contact du milieu issu des Glio1, une diminution significative de l'expression génique des marqueurs M2 CD206 et IL-10 est observée à 24h et de CCL24 à 72h (**Figure 19A**) par rapport à la condition contrôle (polarisation dans du milieu contrôle). À 72h, l'IL-10 est trop faiblement exprimé dans toutes nos conditions pour que son expression soit détectable en RT-qPCR. L'expression de l'IL-10 est donc probablement induite par le traitement PMA jusqu'à atteindre un seuil maximal d'expression. Nous n'observons pas de différence significative au niveau de l'expression protéique de CD163, un marqueur M2, après 24h et 72h de traitement par rapport au contrôle (**Figure 19B**).

Au contraire, nous avons observé une augmentation significative de CD80 (marqueur M1) à la fois en messenger et au niveau protéique après 24h et 72h de traitement (**Figure 20A,B**). Nous n'avons pas

observé de changement significatif pour l'expression de TNF α (**Figure 20A**), un autre marqueur M1, après les deux temps de traitement. Ce set d'expérience suggère en conséquence que les cellules tumorales de GBM sécrètent des facteurs influençant la polarisation des TAMs vers un phénotype M1 dans un environnement non irradié.

3.2. Influence de l'état d'irradiation des cellules souches de GBM sur le phénotype des macrophages

Dans le GBM, les macrophages sont la population de cellules immunitaires dominante. De plus, nous savons que les radiations induisent un recrutement des monocytes, et que les macrophages M2 sont résistants à ces radiations. Pour étudier l'hypothèse selon laquelle l'état d'irradiation des cellules tumorales influence la polarisation des macrophages nouvellement recrutés, nous avons traité des macrophages avec du milieu conditionné issu de cellules tumorales irradiées (CM 8 Gy). Nous avons observé que le milieu conditionné irradié induit une diminution significative de l'expression de CD80 après 72h de traitement (**Figure 21B**). Cette diminution est uniquement observée au niveau protéique (**Figure 21A,B**). Les cellules tumorales Gli1 sécrètent donc des facteurs solubles ou présents dans des microvésicules, qui régulent l'expression protéique de CD80. L'irradiation des cellules tumorales modifie le sécrétome des cellules tumorales qui ne serait plus capable de réguler l'expression de CD80. Nous n'avons pas observé de changement sur l'expression de TNF α , un marqueur M1, après 24h et 72h de traitement avec le milieu conditionné. L'irradiation des cellules tumorales n'a pas eu d'influence sur l'expression des marqueurs M2 (**Figure 20**). L'état d'irradiation des cellules tumorales semble donc changer leur sécrétome, et induit une diminution de l'expression de CD80 par les TAMs.

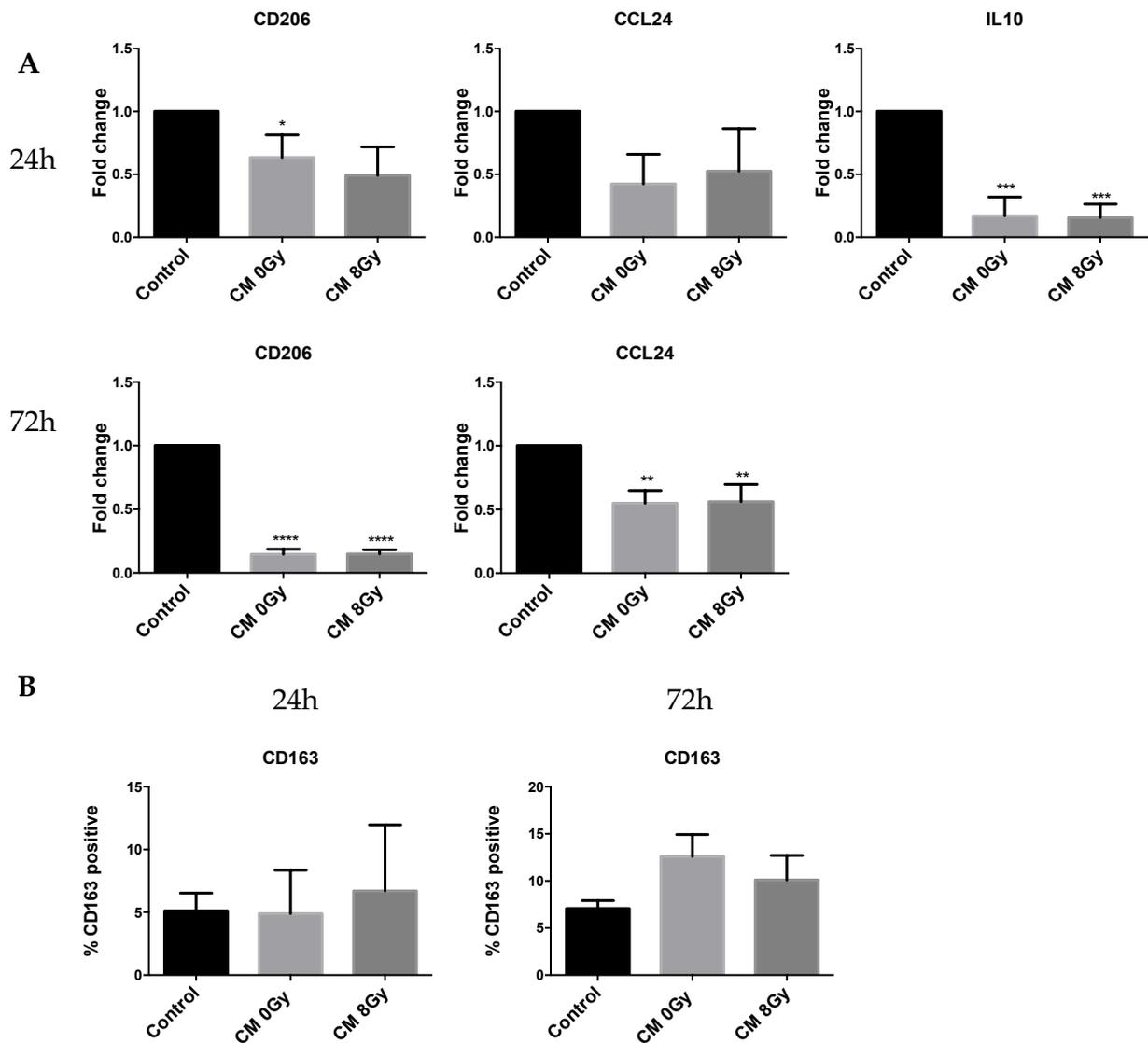


Figure 20 : Les cellules souches tumorales Gli01 diminuent l'expression de marqueur M2 par les THP-1.

- A. Niveau d'expression en ARNm marqueur M2 (CD206, CCL24 et IL10) chez les THP-1 après 24h et 72h de culture dans le milieu conditionné non irradié (0 Gy) et irradié (8 Gy). B. Niveau d'expression protéique du marqueur M2 (CD163) après 24h et 72h de culture en milieu conditionné. n=3. *p <0,05 **p<0,01 ***p<0,005 **** p<0,001. CM 0 Gy = Milieu conditionné 0 Gy ; CM 8 Gy = Milieu conditionné 8 Gy.

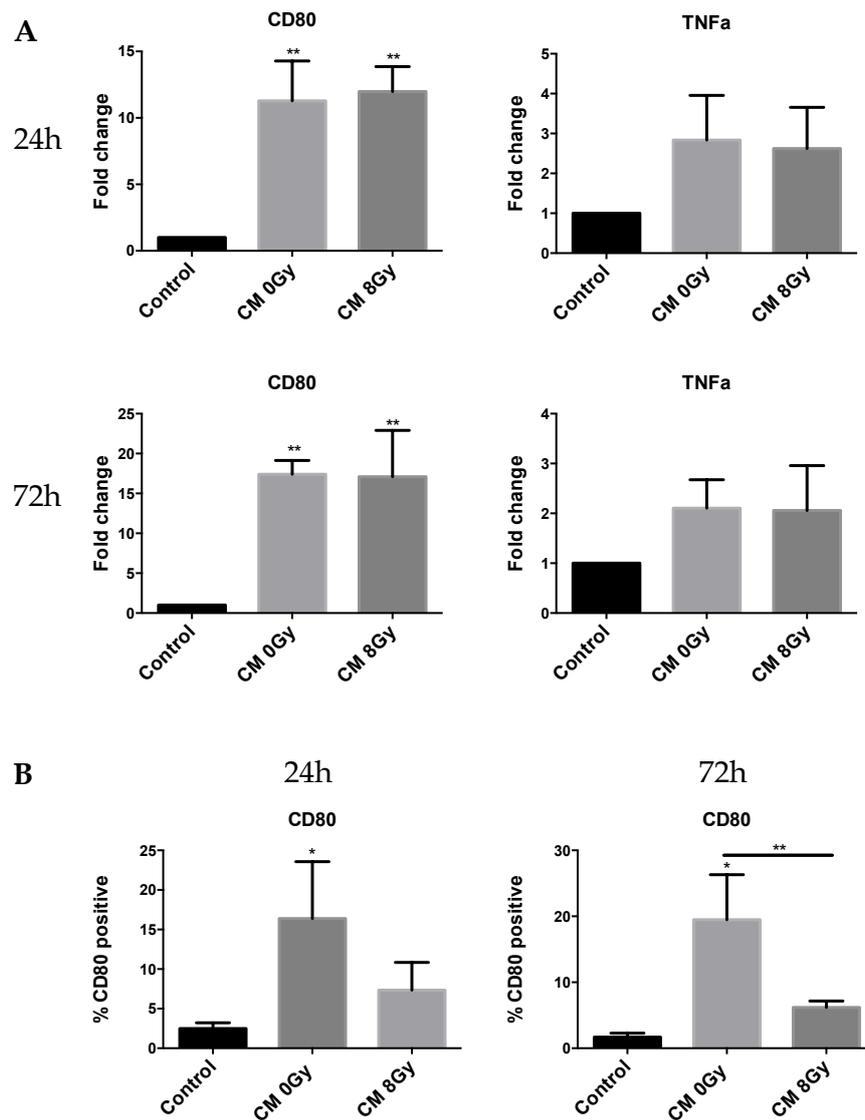


Figure 21 : Les cellules tumorales souches Gli01 et leur état d'irradiation diminuent l'expression de CD80 par les THP-1.

- A. Niveau d'expression en ARNm marqueur M1 (CD80 et TNFα) chez les THP-1 après 24h et 72h de culture dans le milieu conditionné non irradié (CM 0 Gy) et irradié (CM 8 Gy). B. Niveau d'expression protéique du marqueur M1 (CD80) après 24h et 72h de culture en milieu conditionné. n=3. *p < 0,05 **p < 0,01.

3.3. Influence des cellules tumorales de GBM et de leur état d'irradiation dans un environnement pré-conditionné en LPS/IFN γ sur la capacité des macrophages à répondre au traitement

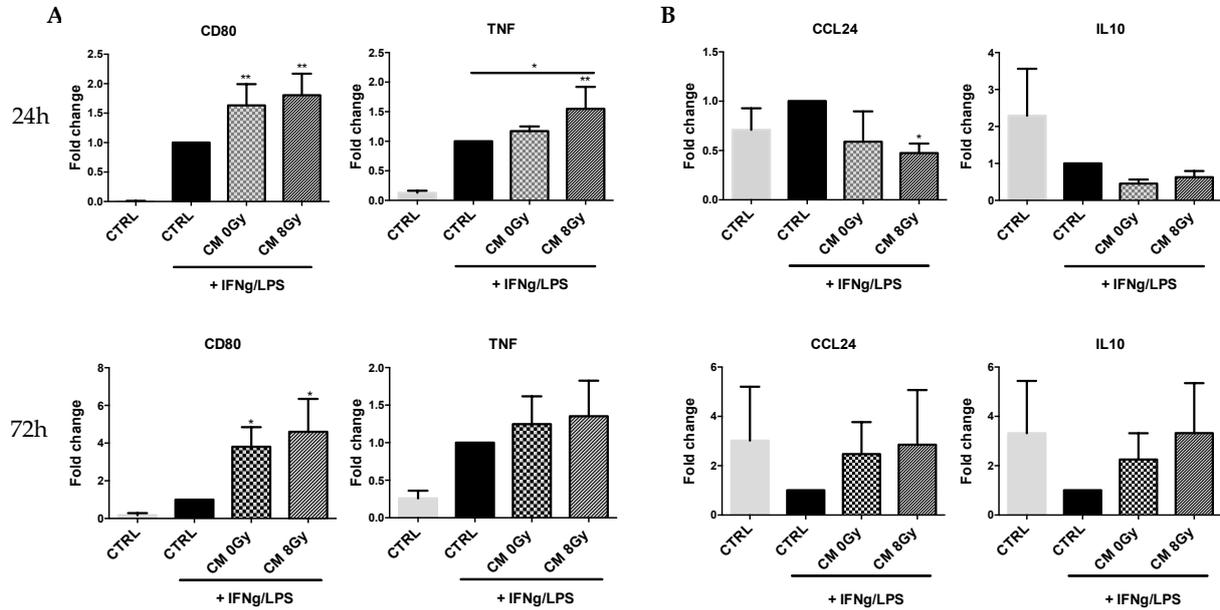


Figure 22 : Les facteurs produits par les cellules tumorales Gli01 augmentent la transcription de CD80 et TNF α par les THP-1

Niveau d'expression en ARNm des marqueur M1 (CD80 et TNF α) (A) et M2 (CCL24, IL10) (B) chez les THP-1 après 24h et 72h de culture dans le milieu conditionné non irradié (0 Gy) et irradié (8 Gy) en présence d'un traitement IFN γ /LPS. n=3. *p < 0,05 **p < 0,01. CM 0 Gy = Milieu conditionné 0Gy ; CM 8 Gy = Milieu conditionné 8 Gy.

Après avoir montré que les cellules tumorales et leur état d'irradiation modulent le phénotype des macrophages nouvellement recrutés sur le site tumoral, nous avons étudié si un microenvironnement pro-M1 (présence de cytokine IFN γ /LPS) et les facteurs sécrétés par les cellules de GBM irradiées et non irradiées influencent la polarisation des TAMs. Nous avons analysé l'expression en messagers et protéique de marqueurs M1 (TNF α , CD80) et M2 (CCL24, IL10, CD163) par RT-qPCR et cytométrie en flux respectivement.

Après 24h et 72h de traitement, une augmentation significative des messagers TNF α (Figure 22A) et CD80 est observée en présence de milieu conditionné non irradié (Figure 23). L'expression protéique de CD80 est augmentée en réponse au traitement IFN γ /LPS. L'augmentation en ARNm de CD80 induite par les facteurs sécrétés des Gli01 n'est pas observée au niveau protéique et cela peut être

expliqué par un niveau d'expression maximal de CD80 à la membrane. Le milieu conditionné irradié n'a pas démontré d'effet particulier sur les THP-1 sur l'expression des différents marqueurs étudiés. En présence des cytokines IFN γ /LPS et du milieu conditionné, l'expression de CD163, un marqueur M2, augmente de manière significative après 72h de traitement (Figure 23). Les cellules tumorales influencent l'expression de CD163 dans un microenvironnement polarisant pro-M1. Cependant, l'état d'irradiation des cellules tumorales n'a pas d'effet sur la polarisation des macrophages dans cet environnement.

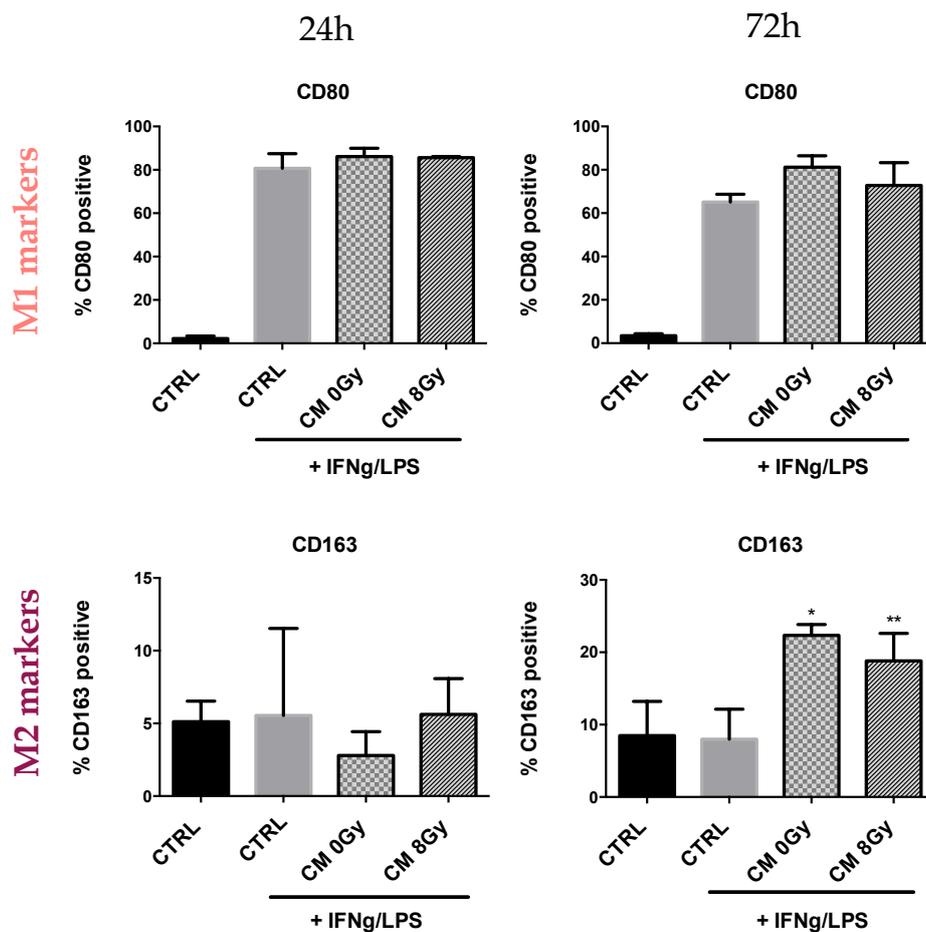


Figure 23 : Les macrophages THP-1 répondent aux signaux environnementaux pro-M1 et aux stimuli des cellules de GBM.

Niveau d'expression protéique des marqueurs M1 (CD80) (A) et M2 (CD163) (B) chez les THP-1 après 24h et 72h de culture dans le milieu conditionné non irradié (CM 0 Gy) et irradié (CM 8Gy) en réponse à un traitement LPS/IFN γ . n=3. *p < 0,05 **p < 0,01.

3.4. Caractérisation du contenu du milieu conditionné issu des cellules primaires de GBM

Afin de mieux définir les composants pouvant être impliqués dans la polarisation des macrophages, nous avons caractérisé le contenu du milieu conditionné produit à l'aide des cellules tumorales Gli01. Nous avons récupéré le milieu de culture des Gli01 obtenu 24h après irradiation, filtré, puis congelé. Nous avons ensuite réalisé un test ELISA dirigé contre l'IL-34, GM-CSF, M-CSF afin de déterminer si les cellules tumorales en produisaient en réponse aux radiations. Nous n'avons pas observé d'expression de l'IL-34, GM-CSF et M-CSF dans le milieu conditionné. L'effet que nous voyons sur les THP-1 n'est donc pas lié à l'expression de ces 3 cytokines.

3.5. Rôle du phénotype des macrophages sur la formation d'adduit et la survie des cellules souches tumorales en réponse à des radiations ionisantes

Dans le but de déterminer si le phénotype des macrophages influence les dommages induits sur l'ADN des cellules tumorales de GBM après une irradiation, nous avons co-cultivé les cellules Gli01 avec des THP-1 traités préalablement avec des cytokines polarisantes pro-M1 ou pro-M2. Les cellules en co-culture ont ensuite été irradiées (8 Gy) ou non, puis 2h et 48h après, nous avons réalisé des comet assay et des tests de viabilité. Une augmentation significative du tail moment pour les Gli01 en présence de macrophages faiblement différenciés THP-1(PMA) a été observée. Les TAMs faiblement polarisés semble potentialiser la formation d'adduits à l'ADN sur les cellules tumorales Gli01 après une irradiation de 8 Gy (**Figure 24A,B**).

Cependant, lorsque l'on s'intéresse à la survie des cellules tumorales en présence de TAMs présentant un phénotype prédéfini, nous n'observons pas de différence entre les différentes conditions. Le test de viabilité a été réalisé 48h après irradiation, il est possible que nous ayons réalisé l'expérience trop tôt, ne permettant pas de visualiser une différence de viabilité. Les Gli01 en présence de THP-M0 présentent plus de dommage en cas d'irradiation et sont donc plus sensibles. Cependant, cela n'induit pas une plus forte mortalité à 48h (**Figure 24C**).

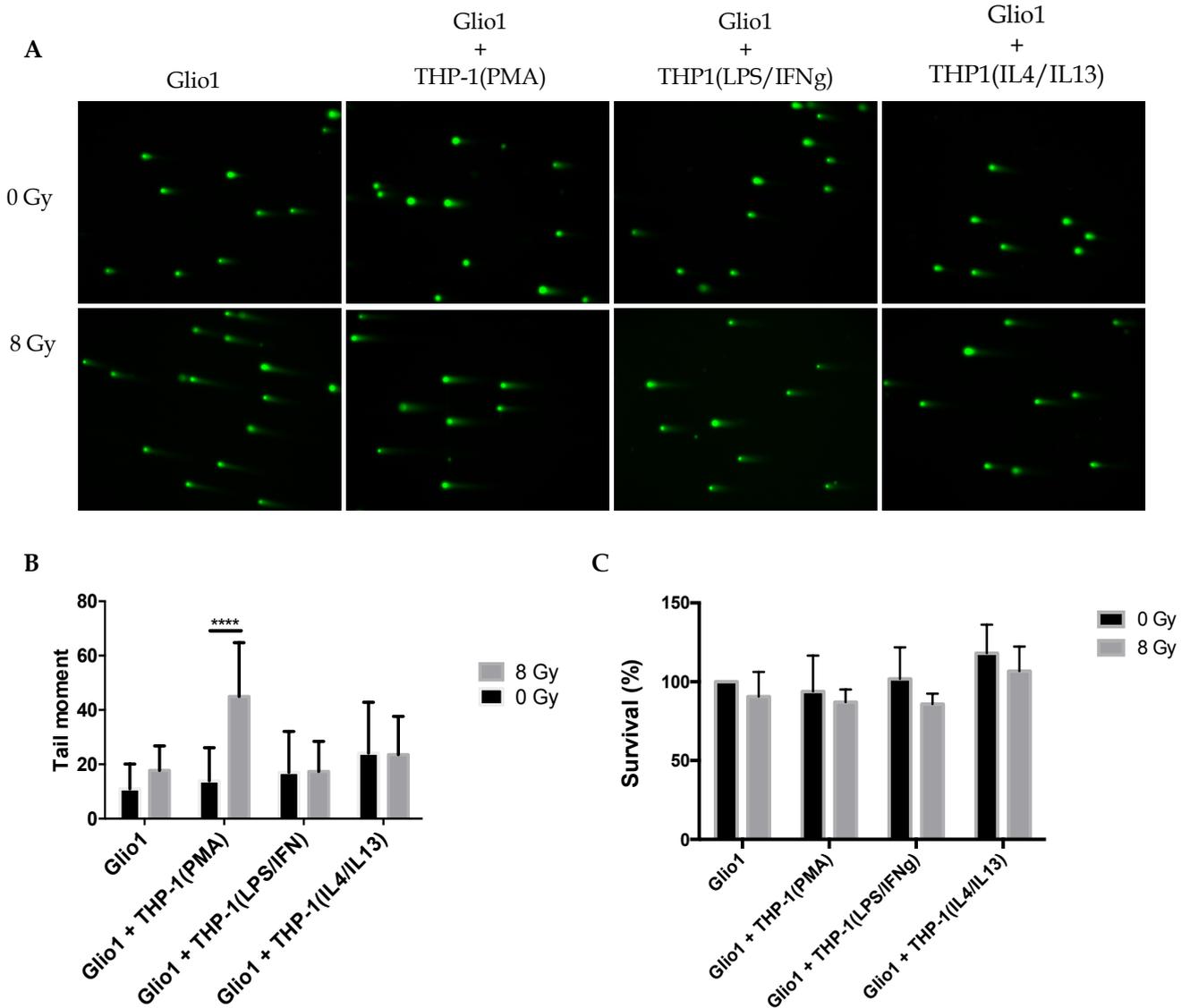


Figure 24 : Les macrophages M0 sensibilisent les cellules de GBM à un traitement par irradiation. Les cellules tumorales Glioblastoma ont été mises en co-culture avec les THP-1 et ont ensuite été irradiées à 8 Gy. La présence d'adduit à l'ADN 2h après irradiation a été analysée par comet assay sous des conditions de lyse alcaline (A). La formation de comètes a été quantifiée sur les cellules tumorales irradiées (B). (C) La survie des cellules tumorales en co-culture avec des THP-1 a été mesurée 48h après irradiation. (n= 200 cellules dans deux tests ; ****p<0,0001).

4. Discussion

L'équipe dans laquelle j'ai effectué mes travaux de thèse cherche à développer des méthodes innovantes pour traiter le GBM. Les travaux, précédemment réalisés par cette équipe, ont montré que les nanocapsules lipidiques chargées avec le radioélément rhénium-188 amélioraient la survie de rongeurs porteurs d'un GBM^{63,64}. Le projet initial était d'étudier les effets biologiques induits par différents types de rayonnements ionisants (rayon X, émission β) sur la tumeur. D'après la littérature, nous savions au préalable que les cellules tumorales de GBM et les TAMs interagissent ensemble et ces échanges ont tendance à favoriser la progression tumorale ainsi que la résistance aux traitements^{65,66}. Nous nous sommes intéressés à mieux comprendre la relation existante entre ces deux types cellulaires dans la réponse à une irradiation.

Depuis quelques années, la relation entre les TAMs et les cellules tumorales lors de la progression tumorale et dans la réponse aux traitements est de plus en plus étudiée. Ces études reposent sur deux stratégies d'expérimentation différentes en étudiant soit les interactions directes *via* une technique de co-culture^{67,68}, soit les interactions indirectes en utilisant un milieu conditionné issu d'un des deux types cellulaires^{69,70}. Dans le GBM, il y a peu d'étude décrivant les échanges entre les TAMs et les cellules tumorales en réponse à une irradiation. Ainsi, nous avons établi deux modèles d'expérimentation utilisant soit du milieu conditionné issu de cellules de GBM, soit un modèle de co-culture directe entre les TAMs et les cellules de GBM. Les cellules de GBM « Glio1 » et la lignée de monocytes « THP-1 » ont été choisies pour réaliser les expériences. Dans le chapitre 1, nous avons montré que les Glio1 sont une population cellulaire hétérogène possédant des clones CD133⁺. Pour rappel, CD133 est un marqueur des CSCs⁷¹ décrit pour être associé à un phénotype radio-résistant⁷².

Les travaux de cette thèse nous ont donc apporté les réponses suivantes :

- Les cellules tumorales, irradiées ou non, sécrètent des facteurs qui influencent le phénotype des TAMs. L'état d'irradiation des cellules de GBM modifie le sécrétome et conduit à une diminution de l'expression de CD80, un marqueur M1, par les TAMs.
- Dans un environnement permettant une polarisation de type M1, les TAMs répondent aux cytokines présentes dans l'environnement, mais sont aussi influencés par les cellules tumorales.
- Les TAMs faiblement polarisés potentialisent la formation de cassures de l'ADN sur les cellules de GBM.

4.1. Impact du choix du protocole de différenciation et de polarisation des THP-1 sur les macrophages obtenus

Pour ce projet, nous avons décidé d'utiliser des cellules commerciales de monocytes « THP-1 » plutôt que des macrophages primaires issus de patients. La simplicité d'acquisition et d'utilisation de la lignée cellulaire THP-1 a porté notre choix sur ce modèle. En parallèle, nous avons choisi de travailler sur des cellules primaires issues de GBM humains cultivés sous forme de neurosphères.

Les monocytes THP-1 doivent subir une étape de différenciation pour obtenir des macrophages⁷³. Ensuite, une étape de polarisation est nécessaire afin d'orienter l'activation des THP-1 vers un phénotype M1 ou M2. Or, de nombreux protocoles sont décrits pour ces deux étapes⁷⁴⁻⁷⁶. Ces variations expérimentales peuvent se répercuter sur les marqueurs exprimés par les THP-1⁷⁷. Ainsi, les temps de traitement, la concentration en cytokines et en PMA utilisée sont les paramètres les plus variables. Plus précisément, pour l'étape de différenciation, le temps de traitement, la concentration et le temps de repos post-traitement varient d'un protocole à un autre^{78,79}. Nous avons fixé le protocole associé à cette étape en début de projet. Les THP-1 ayant déjà été utilisés dans notre laboratoire, nous avons utilisé le protocole de différenciation préalablement mis au point⁸⁰.

Les mêmes problèmes sont à évoquer concernant l'étape de polarisation dont les temps de traitement sont très variables (entre 16h et 72h de traitement selon les protocoles). Nous avons donc choisi de traiter les THP-1 pendant 24h et 72h lors de l'étape de polarisation⁶⁹. Au cours de nos expériences, nous ne sommes pas parvenus à induire un phénotype M2 en réponse au traitement polarisant de type IL-4/IL-13. Nous avons mesuré l'expression de CD163 et CD206 qui ne sont peut-être pas induits dans nos cellules. De plus, nous avons caractérisé nos THP-1 par cytométrie en flux. Les résultats obtenus mériteraient d'être complétés par des tests ELISA dirigés contre IL-12/IL-23 pour le phénotype M1 et par l'IL-10/IL-6 pour l'activation de type M2. Néanmoins, avoir autant de protocoles pour la différenciation et la polarisation des THP-1 est problématique. Les THP-1 obtenus ne vont pas exprimer les mêmes marqueurs d'un protocole à l'autre et nous induisons ainsi une variabilité expérimentale au sein de la population des THP-1⁸¹.

Afin de compléter ce projet, nous devons évaluer l'effet de notre milieu conditionné sur des macrophages primaires humains. En effet, les THP-1 et les macrophages primaires ne répondent pas de la même manière aux différents stimuli et les marqueurs exprimés par ces deux cellules sont

différents⁸²⁻⁸⁴. La lignée cellulaire « THP-1 » reste un modèle cellulaire intéressant pour étudier les macrophages *in vitro*, mais nécessiterait une homogénéisation des protocoles existants.

4.2. La nomenclature des TAMs

Un autre point que je souhaitais aborder dans cette discussion est la complexité des macrophages chez l'Humain. Les TAMs ont tout d'abord été étudiés chez la souris puis les notions découvertes ont été transposées à l'Homme. Cependant, chez la souris, les TAMs activés en macrophages M1 ou M2 peuvent être caractérisés grâce à seulement deux marqueurs⁸⁵⁻⁸⁷. En effet, l'expression de iNOS et de ARG1, toutes impliquée dans le métabolisme des macrophages, est suffisante pour identifier les macrophages M1 et M2 respectivement^{5,85}. Cependant, chez l'Humain, le métabolisme des TAMs est plus proche entre les deux types d'activation. Ainsi l'expression de iNOS/ARG1 n'est pas suffisante pour différencier les deux phénotypes. De plus, comme je l'ai dit précédemment, les TAMs sont présents sous plusieurs phénotypes qui forment un continuum^{88,89}. Ainsi, nous rencontrons une limite dans la nomenclature que nous appliquons aujourd'hui pour définir les TAMs. En effet, des TAMs exprimant à la fois des marqueurs M1 et M2 peuvent être observés. Ainsi, peut-on vraiment dire qu'un macrophage exprimant des marqueurs M2 et quelques marqueurs M1 est un macrophage de phénotype M2 ? Dans les années à venir, il serait intéressant de retravailler la nomenclature actuelle des TAMs pour arriver à une classification plus réaliste par rapport à nos observations.

4.3. Effet des cellules tumorales et de l'environnement sur le phénotype des THP-1

4.3.1. Influence des cellules de GBM sur la polarisation des TAMs

Le rôle des cellules tumorales sur la polarisation des macrophages a été montré dans plusieurs types de cancer, dont le cancer du sein, et plus récemment pour le GBM. Cependant, les acteurs impliqués dans l'activation des TAMs n'ont pas tous été identifiés. Nous avons donc montré que les cellules tumorales de GBM influencent la polarisation des TAMs vers un phénotype M1 par la production de facteur sécrété. En 2018, Gabrusiewicz *et al.* ont montré que dans le cas du GBM, les exosomes sécrétés par les CSCs induisent une polarisation des TAMs vers un phénotype M2 malgré une augmentation de l'expression de CD80⁹⁰. Les exosomes sont donc un moyen de communication entre les cellules tumorales et les TAMs. Une autre étude, menée par Vos *et al.*, a montré la sécrétion de vésicules extracellulaires dans le GBM et que ces vésicules sont internalisées principalement par les macrophages et les monocytes⁹¹. Puis, Vrij *et al.* ont eux aussi décrit les vésicules extracellulaires issues des cellules de GBM comme étant capables d'interagir avec les monocytes afin d'induire un

phénotype M2⁴⁹. Dans le cas du cancer du sein, Brenot *et al.* ont montré que SNAIL1 influence la polarisation des macrophages en régulant la production de GM-CSF par les cellules tumorales, induisant ainsi un phénotype M2²⁰. Dans le cas du cancer du pancréas, Xiuying *ma et al.* ont montré que les cellules tumorales sécrètent REG4 qui va induire la polarisation des TAMs vers un phénotype M2⁹². Ainsi, de nombreuses études montrent que les cellules tumorales sont capables de moduler l'activation des macrophages dans un environnement non irradié. Cependant, nos résultats tendent à montrer une polarisation vers un phénotype M1 contrairement aux autres études présentées ci-dessus. À la différence des autres études, nous avons utilisé des THP-1 et non des macrophages primaires. La réponse aux stimuli induite par les cellules tumorales n'est très certainement pas la même entre les THP-1 et les macrophages primaires.

4.3.2. Effet de l'état d'irradiation des cellules de GBM sur la polarisation des TAMs

Après avoir montré que les cellules tumorales influencent la polarisation des macrophages, nous nous sommes aussi intéressés à l'influence de l'état d'irradiation des cellules tumorales sur l'activation des TAMs. Nous avons montré que l'état d'irradiation des cellules de GBM influence directement l'expression de CD80. Des études ont montré que l'état d'irradiation des cellules modifie le sécrétome des cellules tumorales⁹³. Cependant, aucune étude n'a été réalisée pour lier l'altération du sécrétome des cellules tumorales avec la programmation des TAMs. Une étude comparant le sécrétome des cellules tumorales irradiées et non irradiées nous permettrait de caractériser les acteurs responsables de l'expression de CD80 par les THP-1.

Des changements sont induits par la radiothérapie au sein de la tumeur. En effet, Vanpouille *et al.*, montrent que la radiothérapie peut induire l'expression de l'exonucléase TREX1, qui est responsable de la dégradation de l'ADN se trouvant dans le cytosol⁹⁴. La tumeur devient donc moins immunogène. Cette production de TREX1 est dépendante de la dose utilisée lors de l'irradiation. Les cellules tumorales induisent l'activation de type M2 chez les TAMs *via* la voie de signalisation AMPK-NFKB⁹⁵. Cependant, les cellules tumorales traitées par de la metformin, activateur de la voie AMPK-NFKB, n'induisent plus l'activation des TAMs en M2 dans un modèle cellulaire du cancer du sein. Le facteur MIF est surexprimé dans plusieurs types de cancer et les rayonnements ionisants induisent une augmentation de la sécrétion de MIF dans plusieurs types de cellules cancéreuses⁹⁶. Par ailleurs, MIF est impliqué dans l'activation alternative des TAMs dans un modèle murin de mélanome⁹⁷. Le

sécrétome des cellules tumorales est donc altéré par l'état d'irradiation et a comme conséquence directe d'altérer la polarisation des macrophages recrutés dans l'environnement tumoral.

4.3.3. Influence de l'environnement par rapport aux cellules tumorales sur la polarisation des TAMs

Les macrophages sont la population de cellules immunitaires dominante dans le microenvironnement du GBM et les TAMs sont impliqués dans le développement et la croissance de la tumeur¹⁶. Ces cellules pourraient donc être des cibles thérapeutiques dans le but d'améliorer le pronostic des patients²⁴. Nous avons donc testé le rôle des facteurs sécrétés par les cellules tumorales dans un environnement riche en cytokines pro-M1 (LPS/IFN γ). Nous avons observé que les THP-1 répondent bien au traitement polarisant LPS/IFN γ , mais continuent aussi à répondre aux facteurs sécrétés par les cellules de GBM. À ce jour, il existe 3 stratégies différentes pour cibler les TAMs :

- Repolarisation des TAMs vers un phénotype M1 ;
- Élimination ;
- Inhibition de leur migration.

Ces résultats nous montrent que l'environnement, mais aussi les cellules tumorales dictent le devenir des TAMs. Afin de limiter les effets de la tumeur sur les TAMs, la stratégie de reprogrammation n'est peut-être pas la plus adéquate dans notre cas.

4.4. Le modèle d'étude de la tumeur

Une des grandes limitations que nous rencontrons aujourd'hui est le modèle d'étude cellulaire que nous utilisons pour étudier les tumeurs. Dans les études *in vitro*, nous utilisons des cellules primaires ou des lignées, mais nous regardons les différents acteurs de la tumeur un à un. Ici, nous regardons l'effet des cellules tumorales sur la programmation des macrophages. Cependant, en réalité, les cellules tumorales ne sont pas les seules pouvant interagir avec les macrophages. Nous avons donc choisi d'utiliser un modèle de co-culture entre les deux types cellulaires. Cependant ce qui se passe au sein de la tumeur *in vivo* est probablement bien plus complexe. Le microenvironnement coopère avec les cellules tumorales, et favorise la croissance de la tumeur^{98,99}. Le futur challenge pour moi est de développer des modèles *in vitro* qui miment au plus près la tumeur, et qui soient faciles d'utilisation. Depuis quelques années, nous commençons à voir apparaître des modèles de culture complexe tels que les organoïdes^{100,101}. Un organoïde est une structure multicellulaire en 3D qui va reproduire *in vitro* l'anatomie d'un organe. Cette méthode de culture permet de reproduire le

microenvironnement tumoral, mais aussi de recréer un gradient en cellules souches et de mimer les niches hypoxiques¹⁰². En 2018, Ogawa *et al.* ont réussi à développer un modèle d'organoïde permettant d'observer l'initiation de la tumeur¹⁰³. Une autre étude récente a permis de montrer que les organoïdes miment l'hétérogénéité cellulaire du GBM¹⁰⁴. Ce modèle peut donc devenir très pertinent pour les études évaluant la capacité du patient à répondre à un type de traitement.

4.5. Les potentiels régulateurs de la polarisation des macrophages sécrétés par les cellules tumorales de GBM

Nous nous sommes intéressés aux protéines sécrétées par les cellules de GBM. Nous avons formulé l'hypothèse que GM-CSF, M-CSF ou l'IL-34¹⁰⁵ sont sécrétés par les cellules tumorales et seraient responsables de la polarisation des THP-1. Les résultats obtenus ont permis de montrer que notre hypothèse de départ n'était pas la bonne puisque nous n'avons détecté aucune de ces 3 cytokines. Nous les avons choisis, car elles étaient les plus décrites dans l'activation des TAMs.

Cependant, ce ne sont pas les seules protéines décrites pour influencer la polarisation des TAMs¹⁰⁶. Différentes études sur des cellules cancéreuses ont pu montrer une augmentation de l'IL-1 α , IL-6, GM-CSF and IL-8 en réponse à des radiations¹⁰⁷. De plus, nous avons aussi émis l'hypothèse que la protéine responsable est sécrétée. Or, plusieurs articles décrivent l'effet des exosomes ou de microvésicules sur le phénotype des macrophages^{49,90,91}. Dans la littérature, des microRNA sont décrits pour aussi être capables d'influencer la polarisation des macrophages. Une étude a montré que l'inhibition de DICER (enzyme impliquée dans la maturation des miRNA) affecte la polarisation des TAMs, et est associée à une régression de la tumeur¹⁰⁸.

4.6. Effet des macrophages sur la résistance aux radiations des cellules tumorales

Nous nous sommes enfin intéressés au rôle des TAMs et de leurs différents phénotypes sur la capacité des cellules tumorales à répondre aux radiations ionisantes. Nous avons observé que les TAMs présentant un phénotype M0, peu différencié, potentialisaient la formation d'adduits dans les cellules tumorales de GBM en réponse à une irradiation. Nous n'avons pas vu de différence sur la formation d'adduits en présence de TAMs M1 ou M2. Cependant, d'autres études ont montré que les macrophages M2 sont plus résistants aux radiations (RX) que les macrophages M1¹⁰⁹. Nous pouvons donc supposer que l'absence d'effet des TAMs M2 sur les cellules tumorales provient de notre modèle. Dans le cancer colorectal, les TAMs ont un rôle protègent les cellules tumorales de la mort cellulaire par apoptose¹¹⁰.

4.7. Perspectives

Avec mes travaux de thèse, nous avons donc pu initier ce projet. Cependant, il reste encore de nombreuses choses à faire. Nous avons, dans un premier temps, décidé de regarder ce qui se passe après une irradiation de 8 Gy. Cependant, pour mieux comprendre la relation entre les macrophages et les cellules de GBM dans la réponse aux rayonnements ionisants, nous devons étudier plusieurs doses d'irradiation. En effet, dans la littérature, il a été montré que différentes doses d'irradiation n'ont pas le même effet sur les cellules tumorales. Cela suggère donc que les facteurs sécrétés par les cellules de GBM sont différents en fonction de la dose délivrée ou du type de rayonnement.

La dose délivrée par les rayonnements ionisants impacte la réponse biologique des différents types cellulaires que ce soit les cellules tumorales ou les macrophages. Dans la littérature, les faibles doses d'irradiation (inférieur à 1 Gy) sont décrites pour induire une activation anti-inflammatoire des macrophages alors que les fortes doses de radiation induiraient plutôt des macrophages pro-inflammatoires¹¹². Nous disposons de nombreuses pistes pour traiter le GBM. Nous pouvons moduler le protocole actuel de radiothérapie se basant sur du 60 Gy au total divisé en radiations de 2 Gy par jour. Des études récentes ont montré que pour le cancer du sein, 3 X 8 Gy est la dose la plus immunogénique^{94,113}. En étudiant différentes stratégies d'irradiation (dose, fractionnement et type de rayonnement), nous pourrions donc enfin mettre en évidence quel type de radiothérapie est la plus efficace pour le GBM. De plus, nous pourrions déterminer si cibler les macrophages est bénéfique pour le patient. Pour la suite, il serait donc important de compléter le projet avec des milieux conditionnés irradiés à plus faibles doses et en fractionnant la dose de 8 Gy que nous avons utilisé. Nous pourrions aussi reprendre les conditions utilisées lors des traitements en irradiant plusieurs fois les cellules à 2 Gy lors de la production du milieu conditionné.

Au cours de cette thèse, j'ai réalisé des mises en cultures de cellules de GBM afin d'obtenir une collection de cellules tumorales de GBM humains présentant un profil génomique différent (Cf Chapitre 1). Il serait aussi intéressant de déterminer si le profil génomique de la tumeur influence la polarisation des macrophages. Pour cela, nous disposons de 8 primo-cultures avec des profils génomiques différents.

Les TAMs semblent être une cible thérapeutique intéressante dans le GBM. En effet, ils interagissent avec les autres types cellulaires présents dans la tumeur et favorisent le développement de la tumeur

(angiogénèse, immunosuppression). Cependant, le GBM étant une tumeur cérébrale, lorsque nous parlons des TAMs, nous faisons référence à la fois aux macrophages périphériques et à la microglie. Dans ce projet, nous avons émis l'hypothèse que les TAMs sont majoritairement des macrophages périphériques. Malheureusement, à l'heure actuelle nous sommes incapables de distinguer la microglie des macrophages périphériques. De plus, nous ne savons pas, au final, si ces deux types cellulaires remplissent ou non le même rôle dans la tumeur.

Conclusion générale

Le GBM est la forme de tumeur du cerveau la plus agressive et la plus fréquente. L'espérance de vie des patients atteints d'un GBM est d'environ 15 mois après traitement de radio-chimiothérapie¹¹⁴. Le GBM est une tumeur d'une grande hétérogénéité cellulaire. Grâce aux avancées dans le domaine de l'oncologie, l'existence de cellules souches cancéreuses a été démontrée. Les CSCs sont impliquées dans le développement tumoral, dans la récurrence et dans la résistance thérapeutique¹¹⁵. Les GBM sont notamment décrits pour avoir une forte infiltration de macrophage dans leur microenvironnement³⁴. Les TAMs sont présents sous plusieurs phénotypes qui forment un continuum et qui peuvent aller d'un phénotype extrême à l'autre. Ces deux phénotypes extrêmes sont appelés M1 et M2, qui sont connus pour être antitumoraux et protumoraux respectivement¹¹⁶.

Le GBM est une tumeur solide complexe dans laquelle les cellules tumorales et les macrophages infiltrant vont interagir ensemble au cours de la progression tumorale et lors de la réponse aux traitements. Nous avons donc cherché à mieux comprendre l'impact des interactions entre les cellules de GBM et les TAMs dans la réponse aux radiations.

Nous avons analysé la relation entre les TAMs et les cellules de GBM en réponse à un traitement d'irradiation (8 Gy). Nous avons montré que les cellules de GBM et leur état d'irradiation influencent la polarisation des TAMs. En effet, les cellules tumorales dans un environnement non irradié favorisent l'expression de marqueurs associés à un phénotype M1. Nous avons également pu observer que l'état d'irradiation des cellules tumorales impacte l'expression de CD80, un marqueur M1. Nous avons montré que le microenvironnement tumoral et les facteurs sécrétés par les cellules tumorales influencent la polarisation des TAMs vers un phénotype mixte M1/M2. Finalement, nous avons évalué le rôle des TAMs dans la réponse aux radiations des cellules tumorales. Nous avons montré que les TAMs ayant un phénotype M0 améliorent la sensibilité des cellules tumorales à répondre à une irradiation de 8 Gy.

Pour conclure, au cours de cette thèse j'ai montré que les cellules tumorales et leur état d'irradiation influencent la polarisation des TAMs. Les facteurs sécrétés par les cellules tumorales non irradiées induisent la polarisation des macrophages vers un phénotype M1. Cependant, les facteurs sécrétés par les cellules tumorales irradiées induisent une polarisation vers un phénotype M2. De plus, nous avons montré que le phénotype des TAMs présents dans la tumeur a son importance sur la sensibilité des cellules tumorales à une irradiation de type RX.

Références bibliographiques

1. Ginhoux, F. & Jung, S. Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 392–404 (2014).
2. Kratochvil, R. M., Kuberski, P. & Deniset, J. F. Monocyte conversion during inflammation and injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, 35–42 (2017).
3. Auffray, C. *et al.* Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science* (80-.). **317**, 666 LP – 670 (2007).
4. Carlin, L. M. *et al.* Nr4a1-dependent Ly6Clow monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* **153**, 362–375 (2013).
5. Ingersoll, M. A. *et al.* Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets (Blood (2010) 115, 3 (e10-e19)). *Blood* **116**, 857 (2010).
6. Arbab, A. S. *et al.* Major challenges and potential microenvironment-targeted therapies in glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
7. Roos, A., Ding, Z., Loftus, J. C. & Tran, N. L. Molecular and Microenvironmental Determinants of Glioma Stem-Like Cell Survival and Invasion. *Front. Oncol.* **7**, 1–8 (2017).
8. 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.* **74**, 269–277 (1987).
9. Graeber, M. B., Scheithauer, B. W. & Kreutzberg, G. W. Microglia in brain tumors. *Glia* **40**, 252–259 (2002).
10. Zhao, L. *et al.* Critical roles of chemokine receptor CCR5 in regulating glioblastoma proliferation and invasion. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **47**, 890–898 (2015).
11. Olah, M. *et al.* An optimized protocol for the acute isolation of human microglia from autopsy brain samples. *Glia* **60**, 96–111 (2012).
12. da Fonseca, A. C. C. *et al.* Increased expression of stress inducible protein 1 in glioma-associated microglia/macrophages. *J. Neuroimmunol.* **274**, 71–77 (2014).
13. Garcia, C. *et al.* The orthotopic xenotransplant of human glioblastoma successfully recapitulates glioblastoma-microenvironment interactions in a non-immunosuppressed mouse model. *BMC Cancer* **14**, 1–11 (2014).
14. Zhou, J. *et al.* MR Imaging Characteristics Associate with Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma and Provide an Improved Signature for Survival Prognostication. *Am. J. Neuroradiol.* **39**, 252 LP – 259 (2018).
15. Qiang, L. *et al.* Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett.* **279**, 13–21 (2009).
16. Poon, C. C., Sarkar, S., Yong, V. W. & Kelly, J. J. P. Glioblastoma-associated microglia and macrophages: Targets for therapies to improve prognosis. *Brain* **140**, 1548–1560 (2017).
17. Pyonteck, S. M. *et al.* CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* **19**, 1264 (2013).
18. Quail, D. F. *et al.* CSF1R inhibition in gliomas. **352**, 1–38 (2017).
19. Prionisti, I., Bühler, L. H., Walker, P. R. & Jolivet, R. B. Harnessing Microglia and Macrophages

- for the Treatment of Glioblastoma. *Front. Pharmacol.* **10**, 1-9 (2019).
20. Brenot, A., Knolhoff, B. L., Denardo, D. G. & Longmore, G. D. SNAIL1 action in tumor cells influences macrophage polarization and metastasis in breast cancer through altered GM-CSF secretion. *Oncogenesis* **7**, (2018).
 21. Takeda, N. *et al.* Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev.* **24**, 491-501 (2010).
 22. Quinn, S. R. & O'Neill, L. A. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. *Int. Immunol.* **23**, 421-425 (2011).
 23. de Groot, A. E. & Pienta, K. J. Epigenetic control of macrophage polarization: Implications for targeting tumor-associated macrophages. *Oncotarget* **9**, 20908-20927 (2018).
 24. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation : time for reassessment. **13**, 1-13 (2014).
 25. Li, L. *et al.* MiR-98 modulates macrophage polarization and suppresses the effects of tumor-associated macrophages on promoting invasion and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int.* **18**, 1-10 (2018).
 26. Lisi, L. *et al.* Expression of iNOS, CD163 and ARG-1 taken as M1 and M2 markers of microglial polarization in human glioblastoma and the surrounding normal parenchyma. *Neurosci. Lett.* **645**, 106-112 (2017).
 27. Saijo, K. & Glass, C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 775-787 (2011).
 28. Lang, T. J., Nguyen, P., Peach, R., Gause, W. C. & Via, C. S. In Vivo CD86 Blockade Inhibits CD4 + T Cell Activation, Whereas CD80 Blockade Potentiates CD8 + T Cell Activation and CTL Effector Function . *J. Immunol.* **168**, 3786-3792 (2002).
 29. Wang, Z. *et al.* Molecular and clinical characterization of PD-L1 expression at transcriptional level via 976 samples of brain glioma. *Oncoimmunology* **5**, 1-9 (2016).
 30. Brandenburg, S. *et al.* Myeloid cells expressing high level of CD45 are associated with a distinct activated phenotype in glioma. *Immunol. Res.* **65**, 757-768 (2017).
 31. Pasparakis, B. M., Alexopoulou, L., Episkopou, V. & Kollias, G. the H u m o r a l I m m u n e Response. **184**, (1996).
 32. Sedger, L. M. & McDermott, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 453-472 (2014).
 33. Albuлесcu, R. *et al.* Cytokine patterns in brain tumour progression. *Mediators Inflamm.* **2013**, (2013).
 34. Zeiner, P. S. *et al.* Distribution and prognostic impact of microglia/macrophage subpopulations in gliomas. *Brain Pathol.* **0**, (2018).
 35. Onofre, G., Koláčková, M., Jankovičová, K. & Krejsek, J. SCAVENGER RECEPTOR CD163 AND ITS BIOLOGICAL FUNCTIONS Molecular characterization. *Acta Medica Cordoba.* **52**, 57-61 (2009).
 36. Fabrick, B. O. *et al.* The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune

- sensor for bacteria. *Blood* **113**, 887–892 (2009).
37. Tamura, R. *et al.* Difference in Immunosuppressive Cells Between Peritumoral Area and Tumor Core in Glioblastoma. *World Neurosurg.* **120**, e601–e610 (2018).
 38. Cui, X. *et al.* Hacking macrophage-associated immunosuppression for regulating glioblastoma angiogenesis. *Biomaterials* **161**, 164–178 (2018).
 39. Liu, S. *et al.* Molecular and clinical characterization of CD163 expression via large-scale analysis in glioma. *Oncoimmunology* **8**, 1–10 (2019).
 40. De Vleeschouwer, S., Spencer Lopes, I., Ceuppens, J. L. & Van Gool, S. W. Persistent IL-10 production is required for glioma growth suppressive activity by Th1-directed effector cells after stimulation with tumor lysate-loaded dendritic cells. *J. Neurooncol.* **84**, 131–140 (2007).
 41. Qiu, B. *et al.* IL-10 and TGF- β 2 are overexpressed in tumor spheres cultured from human gliomas. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 3585–3591 (2011).
 42. Matias, D. *et al.* Microglia/Astrocytes–Glioblastoma Crosstalk: Crucial Molecular Mechanisms and Microenvironmental Factors . *Frontiers in Cellular Neuroscience* **12**, 235 (2018).
 43. Huettner, C., Czub, S., Kerkau, S., Roggendorf, W. & Tonn, J. C. Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro. *Anticancer Res.* **17**, 3217–3224 (1997).
 44. Xuan, W., Qu, Q., Zheng, B., Xiong, S. & Fan, G.-H. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 61–69 (2015).
 45. Jin, L. *et al.* CCL24 contributes to HCC malignancy via RhoB- VEGFA-VEGFR2 angiogenesis pathway and indicates poor prognosis. *Oncotarget* **8**, 5135–5148 (2017).
 46. Singhal, G. & Baune, B. T. Microglia: An interface between the loss of neuroplasticity and depression. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 1–16 (2017).
 47. Zhang, M. *et al.* Anti-CD47 Treatment Stimulates Phagocytosis of Glioblastoma by M1 and M2 Polarized Macrophages and Promotes M1 Polarized Macrophages In Vivo. *PLoS One* **11**, e0153550–e0153550 (2016).
 48. Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J. & Takeya, M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J. Pathol.* **216**, 15–24 (2008).
 49. De Vrij, J. *et al.* Glioblastoma-derived extracellular vesicles modify the phenotype of monocytic cells. *Int. J. Cancer* **137**, 1630–1642 (2015).
 50. McLendon, R. *et al.* Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061–1068 (2008).
 51. Beutner, C. *et al.* Unique transcriptome signature of mouse microglia. *Glia* **61**, 1429–1442 (2013).
 52. Goldmann, T. *et al.* Origin, fate and dynamics of macrophages at CNS interfaces. *Nat Immunol* **17**, 797–805 (2016).
 53. Hickman, S. E. *et al.* The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat. Neurosci.* **16**, 1896–1905 (2013).
 54. Aguzzi, A., Brandner, S., Isenmann, S., Steinbach, J. P. & Sure, U. Transgenic and gene disruption techniques in the study of neurocarcinogenesis. *Glia* **15**, 348–364 (1995).
 55. Kwon, C. *et al.* NIH Public Access. **68**, 3286–3294 (2009).

56. Oh, T. *et al.* Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. *J. Transl. Med.* **12**, 1–10 (2014).
57. Sughrue, M. E. *et al.* Immunological considerations of modern animal models of malignant primary brain tumors. *J. Transl. Med.* **7**, 84 (2009).
58. Horvath, R. J., Natile-McMenemy, N., Alkaitis, M. S. & DeLeo, J. A. Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *J. Neurochem.* **107**, 557–569 (2008).
59. Stansley, B., Post, J. & Hensley, K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* **9**, 115 (2012).
60. Tedesco, S. *et al.* Convenience versus biological significance: Are PMA-differentiated THP-1 cells a reliable substitute for blood-derived macrophages when studying in vitro polarization? *Front. Pharmacol.* **9**, 1–13 (2018).
61. Anoopkumar-Dukie, S. *et al.* Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *Br. J. Radiol.* **78**, 945–947 (2005).
62. Olive, P. L. & Banáth, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* **1**, 23–9 (2006).
63. Vanpouille-Box, C. *et al.* Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with ¹⁸⁸Re-lipid nanocapsules. *Biomaterials* **32**, 6781–6790 (2011).
64. Cikankowitz, A. *et al.* Characterization of the distribution, retention, and efficacy of internal radiation of ¹⁸⁸Re-lipid nanocapsules in an immunocompromised human glioblastoma model. *J. Neurooncol.* 1–10 (2016). doi:10.1007/s11060-016-2289-4
65. Hagemann, T. *et al.* Macrophages Induce Invasiveness of Epithelial Cancer Cells Via NF-κB and JNK. *J. Immunol.* **175**, 1197–1205 (2005).
66. Hagemann, T. *et al.* Ovarian Cancer Cells Polarize Macrophages Toward A Tumor-Associated Phenotype. *J. Immunol.* **176**, 5023–5032 (2006).
67. Shen, Z. *et al.* IL10, IL11, IL18 are differently expressed in CD14 + TAMs and play different role in regulating the invasion of gastric cancer cells under hypoxia. *Cytokine* **59**, 352–357 (2012).
68. Zhang, Y., Sime, W., Juhas, M. & Sjölander, A. Crosstalk between colon cancer cells and macrophages via inflammatory mediators and CD47 promotes tumour cell migration. *Eur. J. Cancer* **49**, 3320–3334 (2013).
69. Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M. & Michiels, C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer* **15**, 577 (2015).
70. Wang, H. *et al.* Interactions between colon cancer cells and tumor-infiltrated macrophages depending on cancer cell-derived colony stimulating factor 1. *Oncoimmunology* **5**, 1–12 (2016).
71. Glumac, P. M. & LeBeau, A. M. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin. Transl. Med.* **7**, 1–14 (2018).
72. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756–760 (2006).

73. Tsuchiya, S. *et al.* Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* **26**, 171-176 (1980).
74. Park, E. K. *et al.* Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm. Res.* **56**, 45-50 (2007).
75. Forrester, M. A. *et al.* Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cell. Immunol.* **332**, 58-76 (2018).
76. Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A. & Donnelly, S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J. Immunol. Methods* **430**, 64-70 (2016).
77. Chanput, W., Mes, J. J. & Wichers, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* **23**, 37-45 (2014).
78. Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B. & Dockrell, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* **5**, (2010).
79. Tedesco, S. *et al.* Phenotypic activation and pharmacological outcomes of spontaneously differentiated human monocyte-derived macrophages. *Immunobiology* **220**, 545-554 (2015).
80. Chang, J. *et al.* Transferrin Adsorption onto PLGA Nanoparticles Governs Their Interaction with Biological Systems from Blood Circulation to Brain Cancer Cells. *Pharm. Res.* **29**, 1495-1505 (2012).
81. Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A. & Donnelly, S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J. Immunol. Methods* **430**, 64-70 (2016).
82. Maeß, M. B., Wittig, B., Cignarella, A. & Lorkowski, S. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *J. Immunol. Methods* **402**, 76-81 (2014).
83. Shiratori, H. *et al.* THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Mol. Immunol.* **88**, 58-68 (2017).
84. Bosshart, H. & Heinzelmann, M. Lipopolysaccharide-mediated cell activation without rapid mobilization of cytosolic free calcium. *Mol. Immunol.* **41**, 1023-1028 (2004).
85. Vijayan, V. *et al.* Human and murine macrophages exhibit differential metabolic responses to lipopolysaccharide - A divergent role for glycolysis. *Redox Biol.* **22**, 101147 (2019).
86. Rathinam, C. *et al.* Efficient differentiation and function of human macrophages in humanized CSF-1 mice. *Blood* **118**, 3119-3128 (2011).
87. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731-2738 (2004).
88. Ka, M. B., Dumas, A., Textoris, J. & Mege, J. L. Phenotypic diversity and emerging new tools to study macrophage activation in bacterial infectious diseases. *Front. Immunol.* **5**, 1-7 (2014).
89. Xue, J. *et al.* Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity* **40**, 274-288 (2014).

90. Gabrusiewicz, K. *et al.* Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype. *JCI insight* **1**, 1-32 (2016).
91. Van Der Vos, K. E. *et al.* Directly visualized glioblastoma-derived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain. *Neuro. Oncol.* **18**, 58-69 (2016).
92. Ma, X. *et al.* The pancreatic cancer secreted REG4 promotes macrophage polarization to M2 through EGFR/AKT/CREB pathway. *Oncol. Rep.* **35**, 189-196 (2016).
93. Doan, N. B. *et al.* Identification of radiation responsive genes and transcriptome profiling via complete RNA sequencing in a stable radioresistant U87 glioblastoma model. *Oncotarget* **9**, 23532-23542 (2018).
94. Vanpouille-Box, C. *et al.* DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat. Commun.* **8**, 15618 (2017).
95. Chiang, C.-F. *et al.* Metformin-treated cancer cells modulate macrophage polarization through AMPK-NF- κ B signaling. *Oncotarget* **8**, 20706-20718 (2017).
96. Gupta, Y., Pasupuleti, V., Du, W. & Welford, S. M. Macrophage Migration Inhibitory Factor Secretion Is Induced by Ionizing Radiation and Oxidative Stress in Cancer Cells. *PLoS One* **11**, e0146482 (2016).
97. Yaddanapudi, K. *et al.* Control of tumor-associated macrophage alternative activation by macrophage migration inhibitory factor. *J. Immunol.* **190**, 2984-2993 (2013).
98. Hambardzumyan, D., Gutmann, D. H. & Kettenmann, H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat. Neurosci.* **19**, 20 (2015).
99. Chen, Z. & Hambardzumyan, D. Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Front. Immunol.* **9**, 1004 (2018).
100. Bian, S., Repic, M., Guo, Z., Kavirayani, A. & Burkard, T. Europe PMC Funders Group Genetically engineered cerebral organoids model brain tumour formation. **15**, 631-639 (2019).
101. Lancaster, M. A. *et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501**, 373-379 (2013).
102. Hubert, C. G. *et al.* A three-dimensional organoid culture system derived from human glioblastomas recapitulates the hypoxic gradients and cancer stem cell heterogeneity of tumors found in vivo. *Cancer Res.* **76**, 2465-2477 (2016).
103. Ogawa, J., Pao, G. M., Shokhirev, M. N. & Verma, I. M. Glioblastoma Model Using Human Cerebral Organoids. *Cell Rep.* **23**, 1220-1229 (2018).
104. Krieger, T. G. *et al.* Modeling glioblastoma invasion using human brain organoids and single-cell transcriptomics. *bioRxiv* 1-13 (2019). doi:10.1101/630202
105. Jeannin, P., Paolini, L., Adam, C. & Delneste, Y. The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages. *FEBS J.* **285**, 680-699 (2018).
106. Self-Fordham, J. B., Naqvi, A. R., Uttamani, J. R., Kulkarni, V. & Nares, S. MicroRNA: Dynamic regulators of macrophage polarization and plasticity. *Front. Immunol.* **8**, 1-18 (2017).
107. Yamanaka, R., Tanaka, R. & Yoshida, S. Effects of Irradiation on Cytokine Production in Glioma Cell Lines. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. **33**, 744-748 (1993).
108. Baer, C. *et al.* Suppression of microRNA activity amplifies IFN- γ -induced macrophage

- activation and promotes anti-tumour immunity. *Nat. Cell Biol.* **18**, 790–802 (2016).
109. Leblond, M. M. *et al.* M2 macrophages are more resistant than M1 macrophages following radiation therapy in the context of glioblastoma. *Oncotarget* **8**, 72597–72612 (2017).
 110. Teresa Pinto, A. *et al.* Ionizing radiation modulates human macrophages towards a pro-inflammatory phenotype preserving their pro-invasive and pro-angiogenic capacities. *Sci. Rep.* **6**, 18765 (2016).
 111. Huang, W., Chan, M., Chen, M. & Tsai, T. Modulation of macrophage polarization and lung cancer cell stemness by MUC1 and development of a related small-molecule inhibitor pterostilbene. *Oncotarget* **7**, 1;13 (2016).
 112. Garnier, D., Renoult, O., Alves-Guerra, M.-C., Paris, F. & Pecqueur, C. Glioblastoma Stem-Like Cells, Metabolic Strategy to Kill a Challenging Target. *Front. Oncol.* **9**, 1–18 (2019).
 113. Dewan, M. Z. *et al.* Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5379–5388 (2009).
 114. Stupp, R., Mason, W. P. & van den Bent, M. J. “Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma”. *Oncol. Times* **27**, 15–16 (2005).
 115. Baumann, M., Krause, M. & Hill, R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 545–554 (2008).
 116. Quail, D. F. & Joyce, J. A. The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell* **31**, 326–341 (2017).

Titre : Études des interactions moléculaires et cellulaires entre cellules de glioblastome et macrophages dans le cadre d'un traitement par irradiation

Mots clés : Glioblastome, Cellules tumorales, Macrophages, Irradiation

Résumé : Le glioblastome (GBM) est la tumeur primitive la plus fréquente et la plus agressive du système nerveux central. Malgré la chirurgie et la radio-chimiothérapie, les récurrences sont presque inévitables. La nature récurrente et invasive du GBM est en partie due à la présence de cellules tumorales de type souches ainsi qu'au signaux du microenvironnement. Le microenvironnement tumoral est composé de plusieurs types cellulaires dont les cellules immunitaires et notamment les macrophages associés à la tumeur (TAMs). Au sein des tumeurs, l'interaction et la communication entre les cellules tumorales et les TAMs modulent ces derniers. De plus, l'effet des TAMs sur les cellules tumorales est dépendant de leur type d'activation ; les TAMs M1 ont une activité anti-tumorale alors que les TAMs M2 favorisent la croissance tumorale et la résistance au traitement.

Dans cette thèse, nous avons étudié la manière dont ces deux types de TAMs interagissent avec les cellules tumorales de GBM en réponse à une irradiation. Pour cette étude, un milieu conditionné a été produit à partir de cellules primaires de GBM humains non irradiées ou irradiées avec des rayons X (8 Gy). Ce milieu conditionné a été utilisé pour étudier l'effet des facteurs sécrétés par les cellules de GBM sur l'activation des TAMs après 24 ou 72 heures.

Nos résultats indiquent que les TAMs réagissent aux facteurs sécrétés par les cellules tumorales non irradiées et donnent lieu à un phénotype de type M1. Cependant, les facteurs sécrétés par les cellules GBM irradiées conduisent à un statut inférieur à celui de M1. Fait intéressant, dans un microenvironnement tumoral pro-M1, les TAMs peuvent être polarisés vers les phénotypes M1 et M2 en réponse aux facteurs sécrétés par le GBM. Enfin, nos résultats suggèrent également que les cellules de GBM sont plus sensibles à l'irradiation en présence de macrophages faiblement polarisés.

Title : Studies of molecular and cellular interactions between glioblastoma cells and macrophages in response to an irradiation treatment

Keywords : Glioblastoma, Cancer cells, Macrophages, Irradiation

Abstract : Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive tumor of the central nervous system. Despite surgery and radio-chemotherapy, recurrence is almost inevitable and occurs in the vicinity of the radiation field. The recurrent nature and invasiveness of GBM is in part due to its stem cell-like nature as well as microenvironmental cues. This microenvironment consists of several types of immune cells including Tumor Associated Macrophages (TAMs). Within tumors, TAMs are modulated depending on their interplay and communication with neoplastic cells as well as several other factors. Notably, the effect of TAMs on tumor cells is dependent on their type of activation; M1 TAMs have an anti-tumoral activity whereas M2 TAMs favor tumor growth and resistance to therapy.

THP-1 macrophages polarization was induced with irradiated and non-irradiated conditioned media for 24h and 72h. This media was obtained from human primary GBM cells after growing for 24h with or without radiation (8Gy). We showed that both tumor cells and their irradiation status are involved in TAMs programming. In addition, our results suggest that in a pro-M1 tumor environment, tumor cells induce CD163 expression on THP-1. Next, we have shown that M0 macrophages sensitize tumor cells to irradiation. Our results suggest that irradiated and non-irradiated GBM tumor cells secrete factors that control macrophage polarization.