



HAL
open science

Modulation du compartiment vasculaire par les cellules tumorales de cancers pulmonaires et son impact sur le micro-environnement immunitaire.

Morgane Krejbich

► **To cite this version:**

Morgane Krejbich. Modulation du compartiment vasculaire par les cellules tumorales de cancers pulmonaires et son impact sur le micro-environnement immunitaire.. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2024. Français. NNT : 2024NANU1013 . tel-04823807

HAL Id: tel-04823807

<https://theses.hal.science/tel-04823807v1>

Submitted on 6 Dec 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : Immunologie et Cancérologie

Par

Morgane KREJBICH

Modulation du compartiment vasculaire par les cellules tumorales de cancers pulmonaires et son impact sur le micro-environnement immunitaire

Potentiel immunomodulateur des cellules endothéliales tumorales

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 18 Octobre 2024

Unité de recherche : Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Intégrée Nantes-Angers (CRCI2NA), INSERM UMR1307, CNRS UMR6075, Nantes Université, Université d'Angers

Rapporteurs avant soutenance :

Gilles PAGES Directeur de recherche, HDR, Université Côte d'Azur
Fabrice SONCIN Directeur de recherche, HDR, Université de Lille

Composition du Jury :

Examineurs : Elisabeth GENOT Directrice de recherche, HDR, Université de Bordeaux
 Isabelle BRUNET Chargé de recherche, HDR, Collège de France

Directeur de thèse : Lucas TREPS Chargé de recherche, HDR, Nantes Université
Co-directeur de thèse : Isabelle CORRE Chargé de recherche, HDR, Nantes Université

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES ABREVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES.....	7
LISTE DES FIGURES RESULTATS	8
LISTE DES TABLEAUX	8
REMERCIEMENTS	9
INTRODUCTION	19
L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE	23
CELLULE ENDOTHELIALE ET RESEAU VASCULAIRE	23
ORGANISATION DU SYSTEME VASCULAIRE	23
FORMATION ET STRUCTURE DES VAISSEAUX.....	27
<i>Angiogenèse</i>	27
<i>Cellules de soutien</i>	30
<i>Plasticité endothéliale</i>	30
HETEROGENEITE ORGANOTYPIQUE ET VARIABILITES FONCTIONNELLES.....	32
LE SYSTEME VASCULAIRE PULMONAIRE	34
FONCTIONS GENERALES ET ORGANISATION	34
HETEROGENEITE ENDOTHELIALE PULMONAIRE	35
IMMUNITE PULMONAIRE ET CELLULES ENDOTHELIALES	39
LE SYSTEME IMMUNITAIRE PULMONAIRE.....	39
<i>Les cellules de l'immunité innée</i>	40
Monocytes :	41
Macrophages :	41
Cellules dendritiques :	44
Les granulocytes :	45
Cellules Natural killer & Cellules lymphoïdes innées :.....	46
<i>Les cellules de l'immunité adaptative</i>	46
Les lymphocytes T:.....	47
Les lymphocytes B:	52
Les structures de cohabitation B et T :	53
LE RECRUTEMENT DES CELLULES IMMUNITAIRES	55
<i>En condition physiologique globale</i>	56

TABLE DES MATIERES

<i>Recrutement immunitaire dans l'environnement pulmonaire</i>	59
LE ROLE DES CELLULES ENDOTHELIALES DANS L'ACTIVATION/INHIBITION DU SI.....	60
SYSTEME IMMUNITAIRE PULMONAIRE ET DEVELOPPEMENT DE PATHOLOGIES.....	63
CANCERS PULMONAIRES	65
ORIGINE DU DEVELOPPEMENT DES CANCERS PULMONAIRES	66
LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX.....	68
LES FACTEURS GENETIQUES ET SUSCEPTIBILITES HEREDITAIRES.....	69
LES FACTEURS DE COMORBIDITES.....	71
LES TRAITEMENTS ACTUELS	72
CHIMIOETHERAPIE ET RADIOETHERAPIE.....	72
THERAPIES CIBLEES.....	74
IMMUNOTHERAPIES.....	74
THERAPIES ANTI-ANGIOGENIQUES.....	77
RESISTANCES AUX TRAITEMENTS	78
ENDOTHELIUM ET MICROENVIRONNEMENT TUMORAL	81
MICROENVIRONNEMENT TUMORAL ET ECHAPPEMENT IMMUNITAIRE	81
COMPOSITION ET HETEROGENEITE DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.....	83
<i>Cellules stromales et matrices extracellulaires</i>	84
Les fibroblastes :	84
Les péricytes :	85
La matrice extracellulaire :	86
<i>Sécrétome, vésicules extracellulaires et communication intercellulaire</i>	86
<i>Les cellules de l'immunité innée</i>	88
Les Macrophages associés au cancer :	89
Les TAM dans le CBNPC :	92
<i>Les cellules de l'immunité adaptative</i>	93
ÉCHAPPEMENT IMMUNITAIRE ET PROGRESSION TUMORALE	95
CELLULE ENDOTHELIALE ET CANCER.....	98
NEOVASCULARISATION ET PROGRESSION TUMORALE	100
CELLULES ENDOTHELIALES TUMORALES	104
THERAPIES CIBLANT LES ECS DANS LE CANCER.....	109
OBJECTIFS DE LA THÈSE	113
RESULTATS	115
CELLULES ENDOTHELIALES TUMORALES : PARTENAIRES DE L'IMMUNOSUPPRESSION...	117
INTRODUCTION/CONTEXTE.....	119

TABLE DES MATIERES

MATERIELS & METHODES	121
RESULTATS	129
DISCUSSION INTERMEDIAIRE	139
MODULATION DU COMPARTIMENT VASCULAIRE PAR LES CELLULES TUMORALES DE CANCERS PULMONAIRES ET SON IMPACT SUR LE MICRO-ENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE	141
INTRODUCTION/CONTEXTE.....	143
ARTICLE	145
DISCUSSION INTERMEDIAIRE.....	189
DISCUSSION	191
REMISE EN CONTEXTE DES PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS	193
ÉTUDE DES CELLULES ENDOTHELIALES : TISSUS SAINS VS TUMORAUX	195
MODELISATION DU CONTACT TUMEUR/ENDOTHELIUM : IMPACT SUR LA REPOSE IMMUNITAIRE.....	203
SPHEROÏDES 3D : UN MODELE PLUS COMPLET POUR LA DIVERSIFICATION CELLULAIRE	213
MODELES ALTERNATIFS : LIMITES ET PERSPECTIVES POUR EXPLORER LES COMPLEXITES BIOLOGIQUES	217
CONCLUSION	221
BIBLIOGRAPHIE.....	223
ANNEXES.....	261
LISTE DES COMMUNICATIONS REALISEES PENDANT LA THESE	263
LISTE DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES	265

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

aCap : Aérocyte (ou Capillaire de type 2)	EVs : Extracellular Vesicles (Vésicules Extracellulaires)
AKT : Protein Kinase B	FAP : Fibroblast Activation Protein
ALK : Anaplastic Lymphoma Kinase	FASL : Fas Ligand
AT1 : Alvéolaire de Type 1	FOLR2 : Folate Receptor 2
ATP : Adénosine Triphosphate	FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2
BATF : Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor	FSP1 : Fibroblast-Specific Protein 1
Bcl6 : B-cell Lymphoma 6	GLUT1 : Glucose Transporter 1
CAF : Cancer-Associated Fibroblast (Fibroblastes Associés aux Cancers)	gCap : Capillaire Général (Capillaire de type 1)
CAM : Chorioallantoic Membrane (Membrane Chorioallantoïque)	GITR : Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein
CBNPC : Carcinome Bronchique Non à Petites Cellules	GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
CCL : Chemokine (C-C motif) Ligand	GTPase : Guanosine Triphosphatase
CCR2 : Chemokine Receptor Type 2	HEC : High Endothelial Cells (Cellules Endothéliales Hautes)
CD : Cluster of Differentiation	HEV : High Endothelial Venules (Veinules Endothéliales Hautes)
CD63 : Cluster of Differentiation 63	HIF1α : Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
CDH5 : Cadherin 5	HLA-DR : Human Leukocyte Antigen – DR isotype
CTL : Cytotoxic T Lymphocytes (Lymphocytes T Cytotoxiques)	HSP70 : Heat Shock Protein 70
cDC1 : Dendritic Cell type 1 (Cellules Dendritiques de type 1)	HUVECs : Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Cellules Endothéliales de la Veine Ombilicale Humaine)
cDC2 : Dendritic Cell type 2 (Cellules Dendritiques de type 2)	iBALT : induced Bronchus-Associated Lymphoid Tissue
CCL2 : Chemokine (C-C motif) Ligand 2	ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1
CXCL : Chemokine (C-X-C motif) Ligand	ICI : Immune Checkpoint Inhibitors (Inhibiteurs de Point de Contrôle Immunitaire)
CXCR4 : Chemokine Receptor Type 4	IL : Interleukin (Interleukine)
DC : Dendritic Cells (Cellules Dendritiques)	ITGA6 : Integrin Alpha-6
Del-1 : Developmental Endothelial Locus-1	JAM : Junctional Adhesion Molecule
DLL4 : Delta-Like Ligand 4	KIRs : Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors
EC : Endothelial Cell (Cellule Endothéliale)	KRAS : Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
EGF : Epidermal Growth Factor (Facteur de Croissance Épidermique)	LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen 1
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor (Récepteur du Facteur de Croissance Épidermique)	LT : Lymphocytes T
EML4/ALK : Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4 / Anaplastic Lymphoma Kinase	
EndoMT - Endothelial to Mesenchymal Transition (Transition Endothélio-Mésenchymateuse)	

LISTE DES ABREVIATIONS

LYVE1 : Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1
M1/M2 : Macrophage Phénotype 1/2
M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MCTS : Multicellular Tumor Spheroids (Sphéroïdes Tumoraux Multicellulaires)
MEC : Matrice Extracellulaire
MMPs : Matrix Metalloproteinases
moDCs : Monocyte-Derived Dendritic Cells (Cellules Dendritiques Dérivées de Monocytes)
mTOR : Mechanistic Target of Rapamycin
NEC : Normal Endothelial Cell (Cellule Endothéliale Normale)
NF- κ B : Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells
NK : Natural Killer (Cellules Tueuses Naturelles)
NSCLC : Non-Small Cell Lung Cancer (Cancer du Poumon Non à Petites Cellules)
OX40 : Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 4 (CD134)
OX40L : OX40 Ligand
PaO₂ : Pression Partielle en Oxygène
PBL : Peripheral Blood Lymphocytes
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell (Cellule Mononucléaire du Sang Périphérique)
PCGF3 : Polycomb Group RING Finger Protein 3
PD1 : Programmed Death 1
PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PGES : Prostaglandin E Synthase
PGE2 : Prostaglandin E2

PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
AKT : Protein Kinase B
mTOR : Mammalian Target of Rapamycin
PIGF : Placental Growth Factor
PLVAP : Plasmalemma Vesicle Associated Protein
PMVEC : Pulmonary Microvascular Endothelial Cells (Cellules Endothéliales Microvasculaires Pulmonaires)
qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction (Réaction en Chaîne par Polymérase Quantitative)
ROS : Reactive Oxygen Species
ROS1 : ROS Proto-Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase
scRNAseq : Single-Cell RNA Sequencing
sEVs : Small Extracellular Vesicles (Petites Vésicules Extracellulaires)
TAM : Tumor-Associated Macrophage (Macrophages Associés aux Tumeurs)
TCR : T Cell Receptor (Récepteur des Cellules T)
TEC : Tumor Endothelial Cell (Cellule Endothéliale Tumorale)
TGF- β : Transforming Growth Factor Beta
TME : Tumor Microenvironment (Microenvironnement Tumoral)
TNF α : Tumor Necrosis Factor Alpha
VE-cadhérine : Vascular Endothelial Cadherin (Cadhérine Vasculaire Endothéliale)
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor (Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire)
VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
ZO-1 : Zonula Occludens-1

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : CARACTERISTIQUES GENERALES DU SYSTEME VASCULAIRE.	25
FIGURE 2: ANGIOGENESE PHYSIOLOGIQUE.	29
FIGURE 3 : PHYSIOLOGIE PULMONAIRE.	35
FIGURE 4 : ORGANISATION DES CAPILLAIRES ALVEOLAIRES.	37
FIGURE 5 : LOCALISATION DES SOUS-POPULATIONS DE MACROPHAGES PULMONAIRES	43
FIGURE 6 : SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE.	49
FIGURE 7 : POLARISATION DES LYMPHOCYTES AUXILIAIRES.	50
FIGURE 8 : FORMATION DES CELLULES IMMUNITAIRES RESIDENTES DANS LES POUMONS ET DES COMPARTIMENTS IMMUNITAIRES ASSOCIES.	54
FIGURE 9 : RECRUTEMENT DES LEUCOCYTES.	58
FIGURE 10 : CLASSIFICATION, MORTALITE ET INCIDENCE DU CANCER DES POUMONS.	65
FIGURE 11 : HALLMARKS OF CANCER.	67
FIGURE 12: CLASSIFICATION GENOMIQUE DES CBNPC	69
FIGURE 13 : MODE D’ACTION DES IMMUNOTHERAPIES UTILISANT LES IMMUNE CHECKPOINT INHIBITORS.	76
FIGURE 14 : LA THEORIE DE L’IMMUNOEDITION.	82
FIGURE 15 : COMPOSITION DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL.	84
FIGURE 16 : GRADIENT DE POLARISATION DES MACROPHAGES ASSOCIES AUX TUMEURS (TAM) : DE L’ACTIVITE CYTOTOXIQUE A LA PROMOTION TUMORALE.	91
FIGURE 17 : REPOSE IMMUNITAIRE ANTI-TUMORALE.	94
FIGURE 18 : MECANISMES INDUISANT UN MICROENVIRONNEMENT TUMORAL IMMUNOSUPPRESSEUR.	97
FIGURE 19 : DIVERGENCE ENTRE LES VAISSEAUX SANGUINS SAINS ET TUMORAUX.	99
FIGURE 20 : ANGIOGENESE PATHOLOGIQUE ET NEOVASCULARISATION TUMORALE.	103
FIGURE 21 : CAPACITES IMMUNOMODULATRICES DES CELLULES ENDOTHELIALES TUMORALES.	107
FIGURE 22 : EXTRACTION DES CELLULES ENDOTHELIALES DE TISSUS PULMONAIRES HUMAINS.	121
FIGURE 23 : COMPARAISON DE LA METHYLATION DES ILOTS CpG ENTRE TISSU SAIN ET TUMORAL DANS LE CBNPC DES LOCUS ENCADRANT TNFSF4.	208
FIGURE 24 : RESUME GRAPHIQUE DU TRAVAIL DE THESE.	221

LISTE DES FIGURES RESULTATS

FIGURE R1 : CARACTERISATION DES NECs ET TECs ISSUES DE CBNPC.	130
FIGURE R2 : DIFFERENTIEL TRANSCRIPTOMIQUE DES NECs ET TECs ISSUES DE CBNPC.	132
FIGURE R3 : CAPACITES IMMUNOMODULATRICES DES NECs ET TECs ISSUES DE CBNPC	134
FIGURE R4 : IMPACT DES EVs DE NEC/TECs SUR L'ACTIVITE DES LYMPHOCYTES T EFFECTEURS.	136

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 COMPARAISON DES SIGNAUX IMMUNITAIRES PARTAGES PAR LES DC ET LES ECs	61
TABLEAU 2 ANTICORPS UTILISE EN CYTOMETRIE.	124
TABLEAU 3 SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES EN qPCR	125
TABLEAU 4 ANTICORPS UTILISE EN WESTERN BLOT	127

REMERCIEMENTS

Avant d'entamer le voyage à travers ces pages résumant les 3 ans de mon travail acharné, où vous y trouverez sciences, hypothèses, et beaucoup de violin plots, permettez-moi de soulever un petit paradoxe : les remerciements sont souvent la seule partie des manuscrits que beaucoup lisent avec attention. Je tacherai donc de l'écrire au mieux pour satisfaire tout un chacun, les scientifiques et les amateurs de potins. Alors, puisque vous êtes là, permettez-moi de commencer par adresser mes premiers mots à une compagne fidèle et parfois capricieuse : ma thèse, que j'ai autant aimée que détestée. C'est à elle que ces quelques premières lignes sont dédiées, car, soyons honnêtes, sans elle, rien de tout cela n'aurait été possible... ni nécessaire.

À toi, ma thèse, je voudrais adresser mes plus sincères remerciements. Tu as été bien plus qu'un simple travail de recherche. Tu as été un voyage captivant et imprévisible, mêlant suspense et émotion, qui a su m'entraîner dans une danse de sentiments contradictoires à la fois exaltants et douloureux. Tu es devenue cette présence obsessionnelle à laquelle il est impossible d'échapper. Pour toi, j'ai passé d'innombrables heures à m'interroger, à douter de moi, de la validité de chaque mot et de chaque idée. Je me suis souvent demandée si tout cela en valait vraiment la peine ou si le chemin sur lequel tu m'entraînais ne présentait pas trop de dénivelé. Et pourtant, je suis habituée aux randonnées compliquées sur les plus beaux sentiers du monde, il en fallait beaucoup pour me décourager.

En y repensant, je me souviens encore de mes premiers pas maladroits, pleins d'enthousiasme et d'illusion, moi, jeune étudiante, persuadée d'être prête à révolutionner le monde scientifique. Et puis il y a eu ce fameux facteur de dilution... Combien de calculs erronés, de résultats incompréhensibles, de réveils en sursaut au milieu de la nuit persuadée d'avoir oublié les cellules dans la trypsine ? Toi, tu t'amusais bien de me voir m'empêtrer dans ces erreurs, comme pour me rappeler que la science, ce n'est pas juste un schéma BioRender, mais un art délicat qui demande patience, rigueur et une bonne dose d'humilité. En même temps, la Biologie, c'est une indécise. Toujours à changer d'humeur et incapable de se décider sur quelque chose, un incubateur qui monte 43°C pour faire effet sauna pendant une journée, une méthylation induite seulement les soirs de pleine lune et une population immunitaire qui n'existe pas vraiment mais qu'il est important d'étudier, on ne sait jamais.

REMERCIEMENTS

Et pourtant, tu m'as donné la sensation enivrante de toucher du doigt l'inconnu, l'excitation de chaque nouvelle découverte aussi infime soit-elle, la soif d'apprendre et de comprendre. Mais dans cette quête du savoir, tu as aussi su me briser, me reconstruire, puis me briser à nouveau, chaque fois un peu plus profondément, au détour d'une hypothèse trop ambitieuse, trop audacieuse que tu n'as pas su accepter. Ceux qui étaient là s'en souviennent. Avec toi, une chose est sûre, j'ai appris à embrasser l'échec comme je n'avais jamais embrassé personne (pardon mon amoureux). Me relever chaque fois que tu me faisais tomber, affronter mes propres limites pour me dépasser, même si parfois, je dois avouer que je t'ai trouvé un peu trop exigeante.

Aujourd'hui, en écrivant ces dernières pages, en te quittant, je sais que tu laisses en moi une empreinte indélébile. Celle d'une lutte intense qui m'a forgée, qui m'a appris à mieux me connaître et à mieux comprendre de quoi je suis capable. Je suis fière de toi, fière de moi et de ce que nous avons fait ensemble, même si ce n'est qu'un grain de poussière à ajouter à ce mur de connaissance bien trop grand. Merci pour ce que tu m'as apporté, de m'avoir accompagnée et portée pendant ces 3 années, et de m'avoir rappelé que, parfois... il vaut mieux vérifier ses calculs deux, voire trois fois.

A présent je voudrais remercier les Dr Gilles Pagès et Dr Fabrice Soncin pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse, ainsi que le Dr Isabelle Brunet avoir accepté d'être examinatrice. Je dois aux membres de mon comité de thèse, le Dr Elizabeth Génot et le Pr Yannick Guilloux, de chaleureux remerciements. Vos conseils m'ont permis de prendre du recul et d'aborder sous de nouveaux angles les difficultés rencontrées lors de ma thèse. Je suis ressortie de nos échanges, inspirée par de nouvelles directives. Je pense ne pas exagérer quand je dis que vous avez grandement participé à mon sauvetage. Puisque l'occasion s'y prête et que je parle de toi Yannick, je voudrais t'adresser un mot de plus. Il est vrai que je t'en veux toujours un peu de m'avoir affiché devant un amphitheâtre de 200 personnes durant un cours de biologie cellulaire en Licence 2. Mais j'ai eu l'occasion de me rendre compte, lors de mes années de Master agrémentées d'une pandémie mondiale, de toute l'implication dont vous faites preuve avec Benjamin et de l'énergie que vous donnez pour vos étudiants. Alors je sais qu'on ne vous le dit pas souvent, mais merci à tous les deux. Merci pour votre soutien et de toutes ces discussions autour d'une pinte de bière que nous avons eues.

REMERCIEMENTS

Trois ans de galère ça peut sembler long, surtout quand on est seul devant ses échecs, mais avec les personnes formidables que ces années m'ont permis de rencontrer, je n'ai pas eu peur de retourner au laboratoire. Merci à toutes l'équipe 4/équipe 1 pour ces moments passés ensemble, ces nombreux petits-déjeuners, ces discussions les fesses par terre et le dos contre les vitres dans cet open space qui a été notre terrain de jeu. Merci de m'avoir accueillie les bras grands ouverts quand je suis arrivée il y a 5 ans, c'est avec tristesse que je vous dis au revoir. Merci à mes co-thésards (Hortense, Thomas) et anciens (Thomas, Margaux, Tina) pour les discussions scientifiques et un peu moins scientifiques dans les bars.

Manon, un petit mot juste pour te dire que j'arrive enfin à accepter le fait qu'on a le même âge toi et moi, il était temps. Merci pour ta positivité et ton sourire, tu es le petit soleil du laboratoire et tu as souvent éclairé sans le savoir, les journées bien sombres qui m'ont accompagnée cette année. Tu es l'aînée maintenant, je compte sur toi pour gronder quand les pipettes sont à l'envers et quand les poubelles débordent.

Nikita, I love the way you sing in the cell culture room. I guess it's your way of enchanting the HUVECs to make the perfect vessels. Thank you for teaching us how to cook naan and for always making us laugh. I know you're doing a great job and the rest will fall into place, so have faith. If you ever want to visit Sparrow in Lyon, the door is wide open.

Emilie, tu n'es pas arrivée au moment le plus facile, mais ta motivation a été motrice sur la fin de ce projet. Merci pour ton soutien et ton implication pour avancer avec moi, même quand je n'en avais plus le courage. Je te passe le flambeau maintenant, c'est à toi de faire de ce projet ton histoire. Si un jour tu en ressens le besoin, n'hésite pas à m'appeler pour te plaindre des cellules endothéliales qui nous mènent la vie dure, je serai ravie de t'écouter. Ah et, pense à aller embêter Lucas de temps en temps pour moi s'il te plaît.

Maureen, ça fait 1 an que tu es partie déjà pour atteindre l'objectif professionnel que tu t'es fixé avec le courage que nous n'avons pas eu. Si une personne doit y arriver, c'est bien toi. Tu es brillante, même si tes méthodes de calculs sont un peu foireuses, et tu as tout pour être une chercheuse de renommée mondiale (j'exagère à peine). Tu as été ma référence pendant mes deux premières années de thèse. Merci pour le temps et la patience infinie que tu m'as accordée quand je venais avec mes questions débiles. Merci pour ces regards de fouines que tu me lançais derrière ton écran et pour cette complicité que nous avons partagée.

REMERCIEMENTS

Camille, j'ai trop de chose à t'écrire. Déjà merci pour ces dessins qui apportent un petit truc en plus à cette thèse. J'étais si heureuse de pouvoir la décorer comme tu l'avais fait. Tu as le don avec tes dessins de transformer un petit rien ordinaire en quelque chose extraordinaire. Ensuite merci de tout le soutien que tu m'as apporté au quotidien depuis ces dernières semaines et plus encore depuis ces dernières années. Tu as toujours été là pour discuter d'un plan de manip, pour aider sur une analyse, donner des conseils sur l'esthétique d'un graphe ou d'un jean trop mal taillé. J'aime ta franchise et ta sincérité et j'admire ta rigueur scientifique et ta dévotion. Merci pour tous ses fou rires, j'espère sincèrement que la distance ne nous séparera pas et j'ai bien l'intention de venir visiter la Suède à tes côtés. Mais s'il te plait, arrêtes de me voler mon style vestimentaire, tout te va toujours mieux c'est chiant.

Ugo, je sais que tu n'aimes pas les remerciements mielleux mais je te dois tellement ; tu n'as pas idée. Ce projet qui a sauvé ma thèse n'aurait pas existé si tu ne m'avais pas envoyé cet article ce jour-là. Alors merci... Infiniment. Merci d'avoir pris le temps de m'encadrer pendant mon master alors que tu venais de commencer ta thèse. Merci d'avoir toujours répondu présent quand j'avais un problème au laboratoire ou dans la vie de tous les jours. Merci d'être mon ami tout simplement.

Morgane, je n'ai pas les mots pour te dire combien tu comptes pour moi. D'ailleurs comme je suis super émotive j'en ai les larmes aux yeux rien que d'y penser. Merci d'avoir été mon quotidien pendant ces 4 années. Grâce à toi j'ai pu reprendre l'équitation, je n'avais plus d'excuse pour rater l'entraînement de natation du mercredi matin et j'ai trouvé en toi le binôme de travail rêvé. Ça n'a absolument rien à voir avec le fait qu'on ait le même prénom, le même écartement d'yeux et le même charisme débordant. Merci de toujours m'écouter parler pendant des heures même quand c'est pour pas dire grand-chose. Merci d'avoir été là pour me soutenir dans toutes les épreuves professionnelles et personnelles. J'ai hâte de voir où la vie va nous porter, probablement à Lyon, en colocation, dans la même boîte sur les virus oncolytique, dans le même bureau...

Judith, c'est le moment je crois. On a commencé en même temps notre contrat dans cette équipe et aujourd'hui il faut que je te laisse continuer sans moi. Je te dois énormément. Au moins 5 paquets de nounourses à la guimauve pour commencer et d'autres cochonneries. Merci d'avoir pris soin de moi, de m'avoir écouté râler les jeudi matins ou les HUVECs avaient (encore) décidé de mourir pour rien. Merci de m'avoir accompagné dans les manips en

REMERCIEMENTS

prenant en charge toutes les expériences que je n'avais plus le courage de lancer. Merci d'avoir fait avancer les choses et désolé pour mon cahier de labo fantomatique. Sans toi les choses auraient été bien différentes. Merci de faire ton métier comme tu le fais, dans l'envie d'aider les gens à apprendre et à évoluer quel que soit leur statut ou leurs compétences. Je promets de revenir te voir et de toujours être disponible par message pour parler et te divertir pendant les heures interminables de confocal ou les commissions informatiques. Tu pourras toujours aller voir Seb pour te reconforter (et me mettre le seum).

Après ces années passées ensemble, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux chercheurs de mon équipe pour leur expertise et les conseils donnés lors des réunions d'équipe. Christophe, tu as été mon directeur de thèse pendant deux ans, cette aventure qui est la mienne n'aurait pas eu lieu sans toi. Merci pour le temps que tu m'as consacré. Nico, l'histoire a commencé avec toi et je t'en remercie. En voyant ma grandeur aujourd'hui je suis persuadée que tu es dégoûté de ne pas m'avoir gardé en thèse. Sache que ta bonne humeur apporte une dimension particulière à cette équipe, merci d'avoir été là.

Enfin, je tiens à remercier mes directeur(rice) de thèse. Isabelle, tu as apporté de l'empathie et un regard neuf sur mon histoire avec les cellules endothéliales. Merci pour tout le temps que tu m'as consacré. Lucas, je me souviens encore de ton arrivée dans le laboratoire et de la satisfaction d'avoir été ta candidate pour l'école doctorale. Ces années à apprendre le raisonnement scientifique qu'un chercheur doit avoir en te regardant ont été plus que formatrices. Merci de m'avoir fait confiance et de toujours avoir été présent. Je te menacerais bien une fois de plus d'accrocher des photos de moi partout dans ton bureau pour que tu ne m'oublies pas mais après on va dire que c'est du harcèlement. Le plus important, merci d'avoir gardé ce côté chaleureux et humain qui m'ont permis de ne jamais avoir peur de te dire quand les choses n'allaient pas ou te faire part de mes réflexions foireuses.

Lola, Souadou, Mava, ça fait plus de quinze ans maintenant que chaque moment passé ensemble n'est qu'un éclat de rire et une vague de légèreté, que les marques du temps ne peuvent pas impacter. Vous avez été mon échappatoire au stress et à la réalité et vous m'avez permis de recharger ma batterie de positivité. Nous sommes si différentes et pourtant complémentaires. Merci d'avoir été là le jour des résultats du bac. Merci d'avoir été là le soir où j'ai quitté la Réunion. Merci d'avoir été là pour les apéros covid. Merci d'avoir été là pour fêter nos 25 ans. Merci d'être toujours là dans dix ans. Merci d'être vous. Parce qu'on s'aime.

REMERCIEMENTS

Il y a les amis d'enfance et ceux qui se sont égarés sur ma route au fil des années. Merci aux copains de Licence (Morgane, Katou) qui ont fait que les révisions de la biochimie ou de la biologie moléculaire de Bretbret passaient d'enfer à supportable.

Clarisse, tu es cette amie fidèle qui voit toujours le positif et qui rend toutes les décisions faciles même sans second degré. Ta joie de vivre communicative et ton rire de camionneuse m'ont toujours remonté le moral quand j'en avais besoin. Malgré la distance, avec Bri, vous êtes toujours là ce qui fait de moi une personne très chanceuse. Merci pour votre soutien inconditionnelle et vos paroles d'encouragements.

Amandine, ton si beau sourire est la première chose que j'ai vu quand on s'est rencontrées. Puis tu es devenue mon rayon de soleil, ma partenaire de révisions et de séances sportives même si on peut oublier la danse je crois. Merci pour ces moments précieux, pour ces conversations infinies qui n'ont jamais manqué de souffle, même après des heures de discussion. J'ai le cœur en miettes à l'idée de te quitter. Mais je pars avec des souvenirs incroyables, et surtout, avec une profonde gratitude pour tout ce qu'on a vécu ensemble. Alors encore merci pour ces moments, ces rires, cette connexion si unique qu'on a et que rien ne pourra effacer. Peu importe la distance, tu resteras toujours cette amie précieuse qui a illuminé mon chemin de son si beau sourire, et qui continuera d'y briller, où que je sois.

Caro, je ne te remercierai jamais assez de t'être assise à côté de moi ce jour de rentrée et de m'avoir abordé même si la manière dont tu l'as fait était plus que douteuse. Depuis que nous avons partagé ces années merveilleuses en colocation, tu as été bien plus qu'une amie pour moi. Tu as été ma co-chef de maison, celle qui m'a enseigné que le vinaigre est la solution à presque tous les problèmes ménagers et avec qui j'ai passé tant de soirées à refaire le monde, un verre de vin à la main assises sur le canapé. Merci de toujours être là pour moi, même quand 10 000 kilomètres nous séparent, même quand tu es épuisée et que tu prends quand même le temps de décrocher le téléphone pour me changer les idées. Merci de me donner du courage et de croire en moi. Merci d'être la sœur que je n'ai jamais eu.

Merci à mon binôme du master qui a traversé le globe pour venir à ma soutenance de thèse. Lucie tu es exceptionnelle, merci pour cette immense preuve d'amitié. Je sais qu'on ne s'appelle pas souvent, la connexion avec le Canada, ce n'est pas toujours évident. Mais sache que je pense à toi souvent et que je parle de toi des étoiles pleins les yeux. Merci d'être là.

REMERCIEMENTS

Je me dois de remercier les derniers arrivés qui n'en sont pas moins ceux qui prennent le plus de place et je ne dis pas ça parce que AK m'a volé l'amour parental. On ne se connaît pas tant que ça mais quand le courant passe entre deux personnes c'est instantané. Ali, Amélie, j'ai l'impression de vous connaître depuis toujours et j'ai de la chance de vous avoir dans ma vie. Merci d'être là pour Tacien, pour moi, pour cette chose qu'on appelle le nous. Merci d'être toujours prêts à répondre présent aux appels à l'aide.

Yoann & Clem, merci de m'avoir adopté si vite et de croire en la personne que je suis sans aucun compromis. Merci de tout le soutien et le courage que vous m'avez apporté. Merci de l'immense honneur que vous m'avez fait en me demandant d'être la parraine de votre petite Iris. J'ai hâte de commencer cette nouvelle vie avec vous.

Tout ça commence à être un peu long (à l'image de ma thèse) mais tant pis aujourd'hui c'est carte sur table. Je voudrais évidemment remercier ma famille, mes tantes, oncles, cousins, cousines, les reines et Gunter pour les vacances d'été pas si reposantes mais où on mange toujours bien et où on passe de bons moments. Merci pour les Noël qui permettent de souffler en fin d'année, de retrouver ceux qu'on aime même si pour certains ce n'est que par la pensée.

Merci à mon grand frère. Même si on ne se comprend pas toujours et que ce n'est pas toujours simple entre nous, tu as été un vrai grand frère. Tu as affronté les épreuves et les responsabilités en premiers et j'ai toujours su que tu veillais sur moi à ta façon. On a nos différences, c'est sûr, mais ça ne change pas le fait que je t'aime et que finalement c'est ça qui compte le plus.

Merci à mon petit frère. Mon P'tit Tou ou le « Petit Gros » de son surnom le plus affectueux. Merci de toujours me laisser jouer le rôle de la grande sœur, de me laisser te maltraiter et faire la dictatrice. Merci de t'être occupé de moi ces dernières semaines, d'être aussi serviable et attentionné. Tu es un jeune homme incroyable et je voudrais que tu sois aussi fier de toi que tu dis l'être de moi (pardon, c'est mon côté dictateur qui revient). Par contre arrête de grandir ou je vais me fâcher. Je t'aime gros comme un hippopotame.

Papa, Maman, merci d'être les parents extraordinaires que vous êtes. Vous êtes non seulement des individus incroyables, mais ensemble, vous formez une équipe que j'admire profondément. Quand je parle de vous, je dis souvent que mon papa, c'est mon héros dans la

REMERCIEMENTS

vie. Il a plein de supers pouvoirs : il est super gentil, super fort, et surtout, il est super drôle. Je sais que, quoi qu'il arrive, je peux toujours compter sur lui, notamment quand il s'agit de comprendre les papiers compliqués, comme les déclarations d'impôts. Papa, tu as toujours été celui qui se sacrifie pour que nous ayons le meilleur, celui qui nous pousse à viser plus haut, à rêver plus grand. Merci de me faire rire, de m'avoir montré qu'il faut prendre soin de ceux qu'on aime et de m'avoir appris à voir le verre à moitié plein plutôt qu'à moitié vide. Et Maman, toi aussi tu as tes supers pouvoirs. Tu es super gentille, super passionnée et surtout super courageuse. Tu as cette capacité unique de toujours savoir quand quelque chose ne va pas, et tu es là, présente, pour apaiser toutes les douleurs, grandes ou petites. Merci de m'avoir transmis ta curiosité infinie pour la science, ta fascination pour les animaux étranges et ta gourmandise pour les goûts de glace improbables. Merci d'avoir corrigé tous mes devoirs de science, préparé mes exposés de virologie et d'avoir relu cette thèse avec enthousiasme. Merci mes parents, de m'avoir donné les outils pour devenir la personne que je suis aujourd'hui, et vous continuez, avec un amour inconditionnel, à m'accompagner dans chaque étape. J'espère de tout cœur que, dans mes réussites, vous trouvez une part de fierté, car tout cela, c'est grâce à vous.

Tacien, je te garde pour la fin, car c'est avec toi que tout a commencé dans cette étape de ma vie au sein de cette équipe du CRCINA. Merci d'être cette âme folle et passionnée, parfois épuisante à suivre, mais toujours fascinante à observer. J'ai toujours admiré ton esprit scientifique, ta curiosité insatiable, et surtout ton humilité, même si elle échappe parfois aux jaloux. Tu doutes souvent, mais moi, je ne doute plus quand je suis à tes côtés. Merci de m'apporter cette stabilité, de toujours être là avec des conseils avisés et des solutions à mes problèmes, que ce soit pour ouvrir une boîte de conserve récalcitrante ou pour reformater 600 références de bibliographie en une matinée. Merci d'avoir été mon moteur, de m'avoir motivée et remotivée, de m'avoir transmis la passion de la biologie même quand je rêvais de jeter mes cellules par la fenêtre. Merci de m'offrir un avenir à construire, de croire en moi comme tu le fais, avec cette étincelle dans tes yeux qui me fait sentir capable de tout. Et surtout, merci de m'aimer encore plus que tu n'aimes la science.

Pardon à tous ceux que j'ai pu oublier, je n'ai plus qu'un dernier mot à adresser. Aux cellules endothéliales, ces dernières lignes sonnent TEChniquement comme un « au revoir », mais personne ne peut dire de quoi l'histoire est faite. Nartrouv !

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

INTRODUCTION



INTRODUCTION

PREAMBULE

Il apparaît de plus en plus clairement que le développement d'une tumeur est intimement associé à sa vascularisation, le sang apportant l'oxygène et les nutriments nécessaires à la prolifération des cellules tumorales tout en permettant l'accès aux cellules du système immunitaire susceptibles de contrer leur développement. Au cours de la tumorigenèse, le processus d'angiogenèse est étroitement lié à des modifications importantes du microenvironnement tumoral, ce qui conditionne l'infiltration et l'activité des cellules immunes. Son contrôle est une stratégie pour limiter la croissance tumorale. Ce qui reste mal connu, c'est le rôle que les cellules tumorales vont exercer sur les cellules endothéliales qui se retrouvent dans l'écosystème et quelles seront les contributions de leurs dialogues dans des modifications phénotypiques possibles. Cela inclut l'émergence de sous-populations de cellules endothéliales tumorales (TECs) potentiellement impliquées dans les dysfonctions immunitaires associées aux modifications du microenvironnement tumoral (TME). L'objectif de ma thèse était donc de mieux comprendre les relations entre cellules tumorales pulmonaires, cellules endothéliales et cellules immunitaires dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) étudié au laboratoire.

L'introduction de mon manuscrit rappellera brièvement, dans une première partie, la structuration et les fonctions de l'endothélium vasculaire en condition physiologique, en faisant un focus sur les spécificités pulmonaires et les singularités de son système immunitaire. Je ferai ensuite une revue de la littérature sur les cancers pulmonaires qui intéressent plus particulièrement le laboratoire et sur lesquels nous nous sommes focalisés au cours de ma thèse. J'aborderai les principaux traitements actuellement proposés. Dans cette deuxième partie, j'évoquerai également les facteurs principaux qui concourent aux processus de tumorigenèse pour mettre en lumière l'intérêt croissant qui est porté sur l'impact que l'inflammation et l'infiltration immunitaire ont dans la pathogenèse tumorale. Enfin, mon chapitre 3 d'introduction sera consacré au microenvironnement tumoral (TME) en portant une attention particulière aux cellules endothéliales tumorales (TECs). J'y ferai un état des lieux des connaissances sur les mécanismes de l'angiogenèse induite dans les tumeurs, sur les spécificités des TECs et sur ce qui est actuellement connu de leurs interrelations avec le TME.

INTRODUCTION

Sur cette base, j'exposerai ma problématique de recherche et les objectifs de mes travaux de thèse. La partie Résultats présentera les deux parties des travaux réalisés 1) sur les cellules endothéliales tumorales, partenaires de l'immunosuppression 2) sur l'étude des modulations du compartiment vasculaire par les cellules tumorales de cancers pulmonaires et son impact sur le microenvironnement immunitaire. Je terminerai par une discussion générale sur les apports de cette étude dans la compréhension des interrelations entre TEC et TME et sur les effets des reprogrammations phénotypiques sur l'immunorégulation qui s'établit dans le TME, pouvant ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques.

L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE

CELLULE ENDOTHELIALE ET RESEAU VASCULAIRE

Les cellules endothéliales (ECs) pourraient être considérées comme les gardiennes essentielles de notre système circulatoire. Nichées le long des parois internes des vaisseaux sanguins et lymphatiques, ces cellules jouent un rôle clé dans le maintien de l'intégrité et de la fonctionnalité du réseau vasculaire. Leur capacité à réguler la perméabilité des vaisseaux, à réagir face aux signaux inflammatoires et à moduler la dilatation des vaisseaux est cruciale pour assurer une circulation sanguine optimale. L'intérêt porté aux ECs est relativement récent car ce n'est qu'en 1980 que Robert Furchgott, Louis Ignarro et John V Zawadzki ont découvert que l'endothélium n'était pas une surface inerte mais qu'il jouait un rôle essentiel dans la régulation du tonus vasculaire¹. Cette découverte sera d'ailleurs récompensée par un prix Nobel décerné à Furchgott, Ignarro et Murad en 1998. Leurs travaux ont ouvert la voie à de nouvelles approches thérapeutiques, notamment dans le traitement de l'hypertension artérielle et des maladies cardiovasculaires. Aujourd'hui considérées comme une réelle interface pour de multiples processus physiologiques, les ECs sont au cœur d'innombrables études. En comprenant mieux leurs mécanismes d'action, d'activation, de communication et leurs interactions avec de nombreux autres acteurs cellulaires, nous pouvons envisager de nouvelles perspectives pour prévenir et traiter des pathologies liées ou impactées par leur dysfonctionnement comme ça peut être le cas dans le cancer.

ORGANISATION DU SYSTEME VASCULAIRE

L'arbre vasculaire est un réseau complexe assurant la propulsion du sang dans l'organisme et permettant l'approvisionnement des organes et des tissus en nutriments et oxygène nécessaires à leur bon fonctionnement. Il joue un rôle important dans de nombreuses autres fonctions physiologiques en contribuant, entre autres, à l'homéostasie, à la régulation de la température, au trafic cellulaire et à l'élimination des déchets métaboliques. Ce système vasculaire est un réseau fermé s'organisant en deux systèmes circulatoires principaux : le réseau systémique et le réseau pulmonaire. La circulation systémique a pour rôle d'acheminer le sang oxygéné du cœur vers les autres organes par le réseau artériel, puis de ramener le sang veineux pauvre en oxygène (PaO₂ de 70 à 75 mmHg) et riche en dioxyde de carbone, vers le cœur via le réseau veineux. La circulation pulmonaire prend alors le relais, avec pour fonction d'amener le sang veineux au contact de la zone alvéolaire afin de le réoxygéner complètement

INTRODUCTION

(PaO₂ de 80 à 100 mmHg), puis de le renvoyer vers le cœur par les veines pulmonaires. D'après le dogme scientifique introduit par Schack August Steenberg Krogh (1874 à 1949) dans son livre², le corps d'un adulte renfermerait une longueur cumulée du réseau vasculaire estimée d'environ 90.000 km ce qui correspond à un peu plus de deux fois la circonférence de la terre³.

Cependant, bien que cette affirmation se perpétue dans de nombreux ouvrages, elle semble remise en cause par des données plus contemporaines qui estiment une longueur totale du réseau vasculaire autour de 9 000 à 19 000 km d'après David C Poole et Timothy I Mush⁴, soit une distance qui représenterait seulement un trajet Nantes-La Réunion à vol d'oiseau. Le réseau vasculaire ne se résume pas uniquement au système sanguin et englobe également le système lymphatique dont je ne parlerai que très peu dans cette introduction. En excluant les vaisseaux lymphatiques, le système vasculaire sanguin se subdivise donc en trois types de vaisseaux, chacun ayant une taille et une structure différente leur permettant d'assurer des fonctions spécifiques.

Le long de l'arbre vasculaire, l'ensemble des plus gros vaisseaux (caractérisés par un diamètre > 0.5mm), tels que les artères et les veines, est généralement appelé macrovasculature et participe au mouvement du sang vers ou loin des organes. Les artères, devant supporter des pressions élevées et un débit sanguin conséquent induit par les contractions du cœur, sont des vaisseaux épais et élastiques dont la paroi est composée de trois tuniques : l'**intima**, la **média** et l'**adventice** (Figure 1). Les veines quant à elles, subissent une pression plus faible du sang dû au flux modéré qui les traverse. Leurs parois sont considérablement plus fines et leur diamètre plus grand (1 cm en moyenne) permet à une plus grande quantité de sang de circuler. De nombreuses veines sont dotées de valvules qui empêchent le reflux sanguin et facilitent la circulation unidirectionnelle du sang vers le cœur.

Les artères se ramifient progressivement pour former les artérioles qui possèdent les mêmes trois tuniques que les gros vaisseaux mais avec un diamètre et une épaisseur réduits (environ 0,1 mm). La jonction entre les artérioles et les veinules se fait au niveau des capillaires, siège de la microcirculation et des échanges métaboliques et gazeux entre le sang et les tissus. La paroi des capillaires est constituée d'un endothélium entouré d'une membrane basale perméable aux substances de faible poids moléculaire. Cet endothélium est formé d'ECs tapissant la face interne des vaisseaux sanguins. Les ECs assurent ainsi l'intégrité des vaisseaux et sont les premières actrices des échanges dans les capillaires.

INTRODUCTION

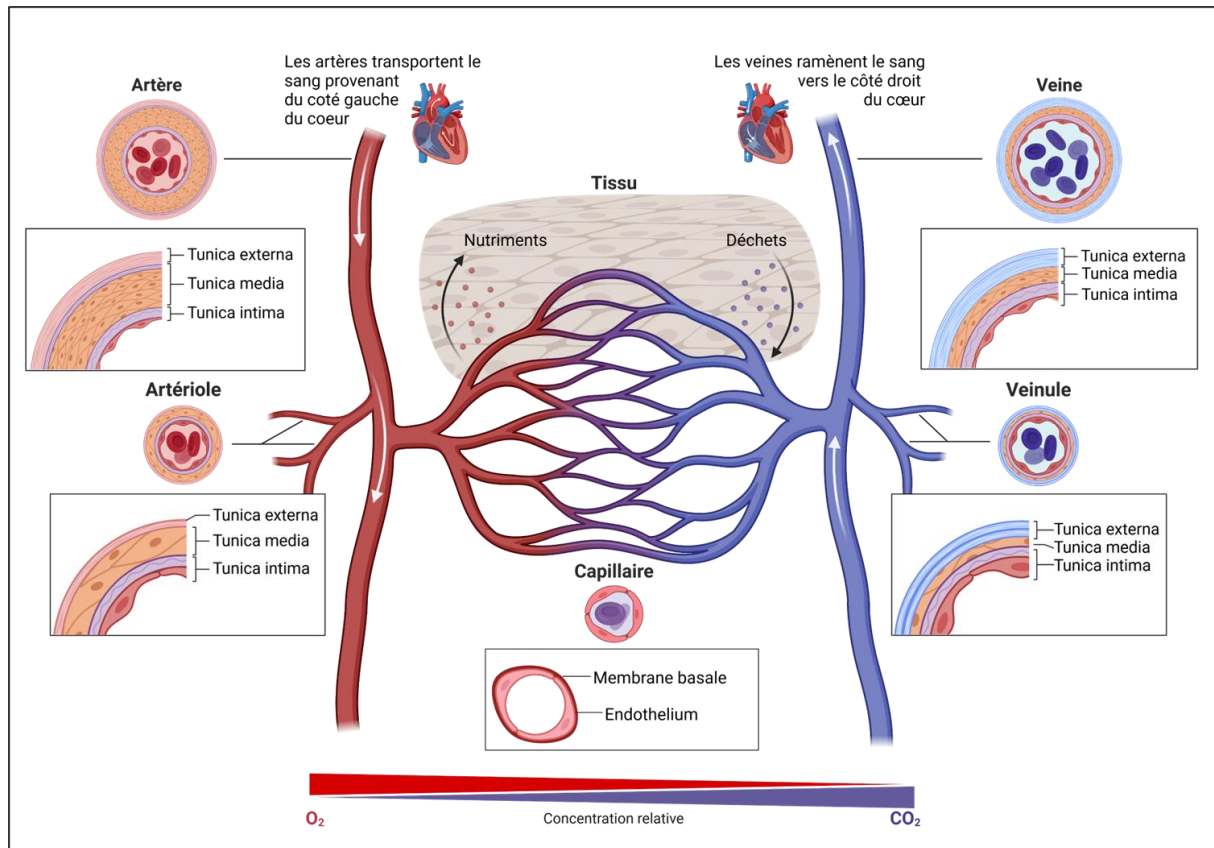


Figure 1 : Caractéristiques générales du système vasculaire. Dans les veines et les artères, la tunica intima est constituée de l'endothélium et de la membrane basale qui l'entoure. La tunica media est composée de cellules musculaires lisses dont la densité est plus importante dans les artères et les artérioles que chez les veines où la pression du flux sanguin est moindre. Cette couche de cellules musculaires est entourée d'une membrane élastique joignant la tunica externe aussi appelée adventice composée quant à elle de fibroblastes et de fibres élastiques. Les échanges de gaz, nutriments et « déchets » entre le sang et les tissus ont lieu au niveau des capillaires plus perméables.

Il existe deux catégories de capillaires, les continus et les discontinus, dont la nature plus ou moins étanche et les jonctions entre ECs sont adaptées aux besoins et caractéristiques des organes ou des tissus environnants⁵. Les capillaires continus présentent une barrière endothéliale plutôt imperméable. Les ECs y sont jointives et structurées grâce à un ensemble de jonctions. Les jonctions serrées entre ECs assurent la barrière physique et sont principalement constituées de protéines telles que les claudines, les occludines et les protéines de zonula occludens (ZO-1, ZO-2). Les jonctions adhérentes jouent un rôle fondamental dans la cohésion cellulaire, reliant les cellules entre elles via des protéines comme la VE-cadhérine et le PECAM-1. Enfin, les jonctions communicantes, également connues sous le nom de gap-jonctions, facilitent le passage de petites molécules et d'ions entre les cellules adjacentes, favorisant ainsi la coordination des fonctions vasculaires. Les propriétés de l'endothélium dépendent en partie des niveaux régulés d'expression des protéines de jonction dans les ECs qui le composent.

INTRODUCTION

Les capillaires continus imperméables sont retrouvés dans les tissus et organes ayant un besoin métabolique élevé, tels que les tissus musculaires, le cerveau ou les poumons. Les capillaires discontinus regroupent les capillaires fenestrés et sinusoidaux. Les fenestrés sont fréquents dans les organes impliqués dans l'absorption comme l'intestin ou les reins. Les ECs y présentent la particularité d'être espacées par des pores de 80 à 100 nm recouverts d'une membrane plus fine ce qui accroît la perméabilité de l'endothélium par rapport aux capillaires continus. Les capillaires sinusoidaux présents dans le foie, la rate et la moelle osseuse sont très perméables, permettant le passage de grosses protéines et même de cellules entières⁶. Ces échanges sont possibles grâce aux espaces entre les ECs et en raison d'une membrane basale irrégulière et parfois même absente de ces capillaires.

Les échanges cellulaires, comme la diapédèse des leucocytes circulants, se produisent principalement en aval des capillaires, au niveau des veinules post-capillaires. Les vaisseaux connus sous le nom de veinules endothéliales hautes (HEV) sont notamment décrits comme étant spécialisés dans l'extravasation des lymphocytes du sang vers un organe lymphoïde secondaire. Une étude menée par Girard et al. a confirmé que ces HEV constituent des sites de migration pour les lymphocytes depuis la circulation sanguine vers les ganglions lymphatiques⁷. Les études qui ont précédé ont localisé ces HEV dans l'ensemble des organes lymphoïdes secondaires, hormis la rate, mais également dans les structures lymphoïdes tertiaires ou à proximité d'un site d'inflammation chronique comme le tissu tumoral. Les HEV se distinguent des autres types de vaisseaux en raison des ECs qui les composent (HEC). Ces HECs, ont la particularité d'exprimer à leur surface l'épitope 6-sulfo-sialyl Lewis X et d'avoir un phénotype cuboïdal unique, en opposition à l'épithélium pavimenteux conventionnel⁸. Elles sont dotées d'une grande plasticité cellulaire. Leur développement, maturation et maintien au sein des ganglions lymphatiques sont régulés par l'activation du récepteur de la lymphotoxine β (LT β R) ainsi que par la voie non canonique de l'activation de NF- κ B^{9,10}. Ces HECs caractérisent le réseau lymphatique, un système complexe constitué de vaisseaux, de ganglions et d'organes qui a pour fonction de drainer la lymphe provenant de l'espace interstitiel des tissus vers le système sanguin. Le réseau lymphatique joue un rôle fondamental dans le nettoyage et la filtration du sang. Il exerce de plus une fonction immunitaire essentielle, agissant comme centre de production et de maturation des cellules immunitaires, tout en facilitant leur transport à travers tout l'organisme.

INTRODUCTION

FORMATION ET STRUCTURE DES VAISSEAUX

L'un des aspects les plus intéressants de la biologie vasculaire réside dans la compréhension des processus impliqués dans la formation des vaisseaux sanguins et leur contribution à la construction et la maintenance du réseau vasculaire. Alors que la vasculogénèse qualifie l'émergence des vaisseaux sanguins à partir des cellules souches endothéliales primitives, l'angiogénèse quant à elle, caractérise la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. La vasculogénèse définit ainsi le processus de formation *de novo* des vaisseaux qui se déroule principalement lors de la phase initiale de la mise en place du système vasculaire chez les vertébrés¹¹. Au cours du processus, les cellules souches endothéliales se différencient en ECs puis se regroupent pour former le tronc vasculaire primitif qui, en se ramifiant, donne un réseau vasculaire fonctionnel. Contrairement aux deux exemples précédents, le processus d'artériogénèse ne crée pas de nouveaux vaisseaux mais permet la croissance, le remodelage et la maturation des artères. De ce fait, il joue un rôle essentiel dans l'optimisation de la circulation sanguine et permet de protéger et sécuriser l'approvisionnement en sang des tissus si une artère principale est obstruée¹².

Angiogénèse

L'angiogénèse est un processus biologique défini comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants¹³. Elle est mise en place afin d'irriguer des zones non vascularisées et/ou subissant une pression hypoxique. Ce processus principalement retrouvé lors de la croissance des organes et du développement embryonnaire n'est présent chez l'adulte sain que lors de la réparation tissulaire, dans l'endomètre lors des cycles menstruels¹⁴, ou lors de la grossesse¹⁵. L'angiogénèse est étroitement régulée par un équilibre subtil entre des facteurs pro-angiogéniques, qui favorisent la croissance des vaisseaux, et des facteurs anti-angiogéniques qui inhibent ce processus. Ainsi différents mécanismes d'angiogénèse ont été décrits : l'angiogénèse germinative ou par bourgeonnement (*sprouting*), l'angiogénèse par intussusception ou angiogénèse fractionnée et enfin l'angiogénèse coalescente¹⁶.

En cas de déséquilibre, une angiogénèse excessive peut survenir, souvent en corrélation avec des pathologies graves telles que les maladies cardiovasculaires¹⁷, les maladies inflammatoires¹⁸ et divers type de cancer¹⁹. Dans le domaine de la cancérologie, plusieurs mécanismes de l'angiogénèse pathologique ont été identifiés, notamment

INTRODUCTION

l'angiogenèse germinative tumorale, la cooptation (aussi désignée sous les termes d'angiotropisme ou d'invasion périvasculaire) ainsi que le mimétisme vasculaire. Ces processus, qui illustrent les stratégies adoptées par la tumeur pour survivre et se développer dans son milieu, seront analysés en profondeur dans le chapitre 3 de cette introduction où les ECs en contexte tumoral sont mises à l'honneur.

Dans un cadre physiologique, l'angiogenèse germinative, la plus largement étudiée, constitue un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes (Figure 2A) . En réponse à un signal local, il se produit tout d'abord une vasodilatation des vaisseaux sanguins existants. Cela s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité vasculaire en raison d'un affaiblissement des jonctions adhérentes. En parallèle, différents facteurs comme le *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) vont stimuler la différenciation de EC en cellule de front (tip cell)²⁰. Les membres de la famille VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et PlGF) et la biologie de leurs voies de signalisation a été largement étudiés par la communauté scientifique^{21,22}. La transduction du signal VEGF-A lié à son récepteur VEGFR-2 entraîne une augmentation transcriptionnelle du gène Delta-Like-4 (DLL4). DLL4 active à son tour le récepteur Notch des ECs avoisinantes qui n'ont pas été directement stimulées par le VEGF-A. Cette activation de la voie Notch réprime l'expression de *VEGFR2* et favorise celle de *VEGFR1* dans les cellules de soutien (appelées stalk cells), les rendant moins sensibles aux signaux pro-angiogéniques suscités par les membres de la famille VEGF²³.

La seconde étape du processus implique la dégradation de la membrane basale des vaisseaux sanguins existants par l'intermédiaire de métalloprotéinases matricielles (MMPs) produites par les ECs. À la suite de sa stimulation, la cellule de front initie un bourgeonnement latéral à partir du vaisseau existant et subit par la suite des modifications morphologiques et fonctionnelles. Cette expansion dirigée par les cellules de front est alimentée par la prolifération des cellules de soutien, régulée par le signal Notch. Lorsque deux cellules de front se rencontrent via des prolongements cytoplasmiques appelés filopodes, elles réduisent leur activité invasive et établissent des connexions stables entre elles, c'est l'anastomose. Cette fusion marque la phase finale du processus d'angiogenèse. Elle est caractérisée par la mise en place de la perfusion du nouveau vaisseau et par sa maturation, grâce au recrutement de cellules de soutien telles que les péricytes, de cellules musculaires lisses et la formation d'une nouvelle matrice extracellulaire.

INTRODUCTION

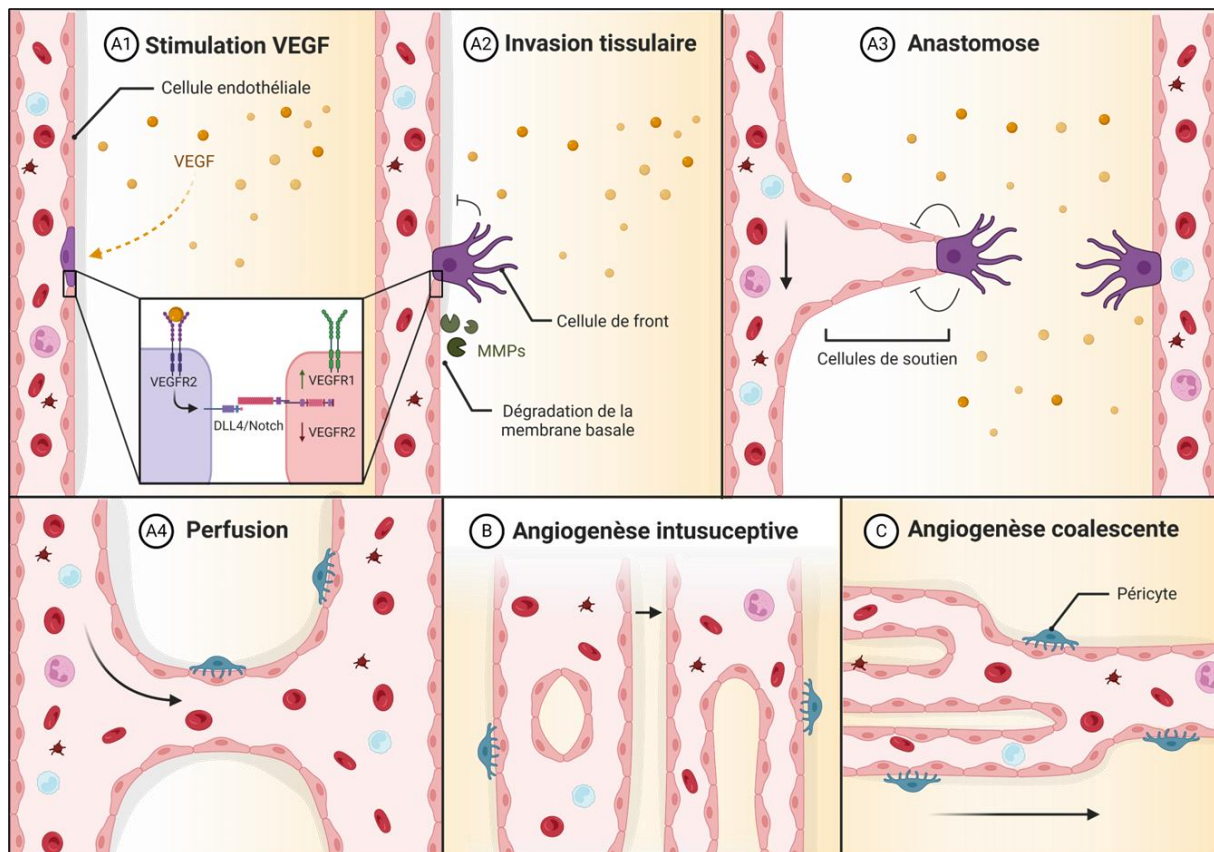


Figure 2: Angiogenèse physiologique. L'angiogenèse par bourgeonnement commence avec la stimulation par le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) entraîne l'activation des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 sur les cellules endothéliales (A1). La cellule endothéliale ayant reçu le signal se différencie en cellule de front et par l'intermédiaire de la voie DLL4/Notch va induire l'inhibition des cellules voisines pour bloquer leur différenciation. L'invasion tissulaire est facilitée par la dégradation de la membrane basale par les métalloprotéinases matricielles (MMPs) produites, permettant aux cellules endothéliales de migrer (A2). L'anastomose se produit lorsque les cellules de front se rejoignent pour former de nouveaux vaisseaux, poussées par les cellules de soutien (A3). La perfusion est établie dans le nouveau vaisseau formé et la couverture matriciel et péricytaire se forme, marquant la fin de l'angiogenèse par bourgeonnement (A4). L'angiogenèse intussusceptive décrit le phénomène où un vaisseau se divise en deux sans créer de nouveaux vaisseaux (B). L'angiogenèse coalescente décrit le phénomène de fusion des capillaires permettant d'accroître l'apport sanguin sans créer de nouveaux vaisseaux (C).

Une fois la vascularisation restaurée, les facteurs pro-angiogéniques diminuent et les ECs retournent à un état phénotypique quiescent. A noter que ce dogme dans le domaine de l'angiogenèse a été revisité à la suite de plusieurs découvertes récentes. Par exemple, contrairement à ce qui avait été initialement envisagé, l'angiogenèse par bourgeonnement n'est pas induite par une seule cellule de front, mais se produit à l'issue de nombreux réarrangements et compétitions²⁴. De même, il serait réducteur de n'impliquer que la voie VEGF/DLL4 dans un processus qui s'avère complexe. Récemment il a été montré dans le modèle Zebrafish que des processus de mécano-sensing (via Piezo1) étaient à l'œuvre pour permettre aux cellules de front de "sentir" leur environnement et s'y mouvoir.

Contrairement à l'angiogenèse germinative, l'angiogenèse par intussusception est un mécanisme non germinal qui décrit l'élargissement et la division d'un vaisseau déjà formé

INTRODUCTION

pour créer deux néo-vaisseaux²⁵. Ce mécanisme permet une expansion rapide du réseau capillaire tout en conservant une perfusion essentielle au fonctionnement tissulaire (Figure 2B). Un des avantages de ce processus de croissance, par rapport à l'angiogenèse germinative, réside dans le fait que le volume et la surface du système vasculaire peuvent augmenter de manière significative en peu de temps, sans nécessiter une prolifération importante des ECs ni une dégradation étendue de la matrice extracellulaire environnante. Le processus d'angiogenèse par coalescence est un phénomène nouvellement décrit puisqu'il a été rapporté en 2022, et représente un mécanisme au cours duquel les capillaires fusionnent pour augmenter l'apport sanguin dans les tissus concernés (Figure 2C).

Cellules de soutien

L'angiogenèse permet la mise en place d'un endothélium qui, bien que jouant un rôle majeur dans le futur fonctionnement du système vasculaire, n'agit pas en solitaire. Des cellules spécialisées appelées péricytes y seront des collaborateurs discrets mais indispensables des ECs. Les péricytes sont des cellules contractiles qui viennent entourer les vaisseaux sanguins, en établissant un contact étroit avec les ECs. Leur présence contribue à renforcer la paroi vasculaire, à réguler la perméabilité des vaisseaux et à maintenir la stabilité et l'intégrité du réseau. On leur a également attribué des fonctions dans la formation de nouveaux vaisseaux et dans la cicatrisation des tissus. Des altérations dans les interactions entre les ECs et les péricytes sont observées dans diverses pathologies, comme les maladies vasculaires, les troubles du système nerveux central, ainsi que certains types de cancer. Je n'approfondirais pas ici le rôle des péricytes et leur interaction avec les ECs dans cette introduction, toutefois, il convient de souligner que Li et al. traitent de ce sujet dans leur revue, qui se focalise sur l'implication des ECs et des péricytes dans l'angiogenèse, en insistant sur l'importance de la communication intercellulaire²⁶.

Plasticité endothéliale

Chez l'adulte sain, les ECs sont en majorité quiescentes et polarisées. Leur membrane luminale est directement exposée aux composants sanguins et aux cellules circulantes, tandis que leur surface basolatérale est séparée des tissus environnants par une membrane basale glycoprotéique, sécrétée et ancrée à la membrane cellulaire. Bien que les ECs adoptent des formes variées le long du réseau vasculaire, elles se caractérisent en général par leur aspect fin et légèrement étiré, avec des dimensions comprises entre 30 et 50 µm de long, 10 à 30 µm

INTRODUCTION

de large et une épaisseur oscillant de 0,1 à 10 μm . Ces cellules sont alignées le long de l'axe du vaisseau, dans la paroi vasculaire afin de minimiser les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin²⁷. La plasticité remarquable des ECs engendre, en fonction des contextes, l'apparition de multiples états et des phénotypes distincts.

C'est à la fin des années 1980, que Pober a introduit le concept d'activation endothéliale, défini comme « des modifications quantitatives dans l'expression de gènes spécifiques, se traduisant par des protéines qui confèrent aux cellules endothéliales de nouvelles capacités leurs permettant de remplir de nouvelles fonctions »²⁸. Le terme cellules endothéliales « activées » s'applique donc aux cellules réagissant aux stimuli, d'une part dû aux VEGFs durant l'angiogenèse, d'autre part dû aux signaux pro-inflammatoires en période d'inflammation. Sous l'effet d'une stimulation inflammatoire, les ECs activées sur-expriment des molécules HLA, ainsi que des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) et sécrètent des cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-8. Elles peuvent développer des fonctions pro-thrombotiques, ce qui conduit à l'émergence d'un phénotype pro-immunogène^{29,30}. Il est essentiel de souligner que les ECs activées retrouvent un état de repos une fois que le facteur de stress ayant provoqué leur activation est éliminé.

Les ECs peuvent également être soumises à un processus de transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT), au cours duquel, elles acquièrent un phénotype fibroblastique et mésenchymateux. Ce remaniement phénotypique se manifeste par la disparition des marqueurs caractéristiques des ECs, tels que PECAM-1 (CD31), la VE-cadhérine et le facteur de von Willebrand (vWF), et par l'acquisition de marqueurs mésenchymateux, notamment α -SMA, la vimentine, la N-cadhérine et FSP1. Il existe différents états dans l'engagement de l'EndoMT, conduisant à des transitions EndoMT dites partielles^{31,32}. Les variations phénotypiques des ECs conduisent à une remarquable hétérogénéité au sein de la population endothéliale dans l'organisme humain. Aird fut le pionnier dans la caractérisation de cette diversité cellulaire phénotypique³³. L'hétérogénéité structurale des ECs se manifeste par des variations dans plusieurs aspects, incluant la morphologie cellulaire (taille, épaisseur et position du noyau), le profil d'expression génique, la synthèse de constituants de la matrice extracellulaire, notamment les composants de la membrane basale, ainsi que les caractéristiques de la surface cellulaire. De plus, ces variations s'étendent à l'expression des

INTRODUCTION

jonctions serrées, des jonctions adhérentes et aux différents types prédominants de jonctions intercellulaires.

HETEROGENEITE ORGANOTYPIQUE ET VARIABILITES FONCTIONNELLES

En fonction du microenvironnement et/ou de leur emplacement dans un vaisseau ou un organe, les ECs ont des propriétés fonctionnelles et des caractéristiques moléculaires différentes. Chaque organe dispose de son propre réseau capillaire afin de répondre de manière adaptée à des besoins spécifiques, qu'ils soient systémiques ou locaux. Par exemple, comme évoqué précédemment, l'endothélium rénal fenestré est important pour la filtration moléculaire nécessaire à la fonction rénale, tandis que l'endothélium formant la barrière hématoencéphalique est caractérisé par son étanchéité et la présence de nombreuses jonctions serrées, limitant ainsi la transmigration cellulaire²⁹.

Outre les variations structurelles dues aux jonctions cellulaires, les ECs peuvent présenter des particularités métaboliques induites par leur fonction. Ainsi les ECs du cœur, un organe réputé pour sa forte demande énergétique, se caractérisent par une expression élevée de transporteurs d'acides gras CD36 et FABP4. Les acides gras sont métabolisés pour produire de l'ATP permettant la contraction du myocarde³⁴. Dans le cerveau, c'est le transporteur du glucose GLUT1 qui est plus abondant à la membrane des ECs afin de répondre aux besoins métaboliques importants des neurones³⁵. Les ECs des capillaires ne se limitent d'ailleurs pas à un simple rôle de transport passif de l'oxygène ou des nutriments. Certaines études ont montré qu'en produisant des facteurs de croissance spécifiques aux tissus, appelés facteurs angiocrines, elles favorisent le développement et la régénération des organes chez les adultes. C'est le cas des cellules endothéliales sinusoidales hépatiques qui stimulent la prolifération des hépatocytes³⁶ ou des ECs de capillaires pulmonaires qui libèrent MMP14 (métalloprotéinase matricielle 14), laquelle favorise la régénération des alvéoles après une pneumonectomie³⁷.

Cette variabilité n'est pas limitée aux organes mais peut également s'appliquer à la nature du vaisseau sanguin dont l'endothélium tapisse la paroi. Par exemple, les processus de transcytose permettant le transfert de molécules à travers l'endothélium sont variables en fonction du type de vaisseau. Dans l'endothélium capillaire, la densité des cavéoles est nettement plus élevée que dans les artères ou les veines³⁸. La densité des cavéoles peut également varier selon les organes, comme c'est le cas avec la barrière hémato-encéphalique

INTRODUCTION

où elle est considérablement réduite³⁹. Il existe également des différences morphologiques dans la taille et l'épaisseur des ECs. Celles des artères présentent une épaisseur de 1 μ m par rapport à celle des capillaires et des veines qui font entre 0,1 et 0,2 μ m⁴⁰. Pour compléter ces études fonctionnelles, des analyses transcriptomiques et épigénétiques ont été menées sur des ECs de souris issues de divers tissus, ainsi que sur des ECs humaines dérivées du cœur, des poumons du foie et des reins^{41,42}. Ces études ont mis en évidence les profils d'expression spécifique des ECs pour chaque organe, sans toutefois approfondir l'hétérogénéité intravasculaire.

En parallèle, un atlas dédié aux EC a souligné la diversité des sous-types des ECs présentes au sein d'un même lit vasculaire dans les tissus sains de souris⁴³. Alors que des marqueurs communs aux ECs des vaisseaux artériels, veineux et lymphatiques ont été identifiés, suggérant une certaine stabilité du phénotype, les ECs capillaires ont montré une variabilité dépendante de la nature du tissu. Ces constatations concordent avec le caractère plastique des ECs, leur permettant de s'adapter aux besoins physiologiques spécifiques de leur environnement. Les gènes exprimés dans les ECs peuvent être catégorisés en fonction de leur mode d'expression constitutive ou inductible et s'ils sont exprimés dans tout l'endothélium ou dans des sous-populations d'ECs. Il est notable que très peu de gènes spécifiques aux ECs, parmi lesquels figurent *CDH5* (VE-cadhérine) et *ROBO4*, sont exprimés de manière constitutive dans l'arbre vasculaire. En revanche, un exemple de gène qui est induit de manière spécifique dans les ECs est la E-selectine, dont l'expression est observée uniquement dans l'endothélium activé et non dans un état « de repos »⁴⁴.

Cette micro-hétérogénéité subsiste au sein du même endothélium et influence de manière significative les interactions au sein d'un organe donné. Dans la partie ci-après je détaillerai cette hétérogénéité au sein de l'appareil respiratoire, participant activement à la régulation de la perfusion et de l'oxygénation tissulaire^{45,46}.

INTRODUCTION

LE SYSTEME VASCULAIRE PULMONAIRE

FONCTIONS GENERALES ET ORGANISATION

Au centre du système respiratoire se trouve l'organe-chef d'orchestre : le poumon. Bien que sa fonction principale reste la même chez tous les mammifères, sa morphologie varie selon les espèces. L'être humain possède deux poumons, séparés par le médiastin. Le poumon gauche, plus petit que le droit, est divisé en deux lobes (supérieur et inférieur) pour laisser la place au cœur dans la cage thoracique. Le poumon droit quant à lui, est divisé en 3 lobes : supérieur, médial et inférieur. Les poumons sont entourés par la plèvre, une membrane élastique qui permet aux poumons de changer de volume lors de la respiration. L'air inhalé, riche en dioxygène, subit un processus de conditionnement tout au long de son trajet dans les voies aériennes supérieures (comme les fosses nasales, la bouche et le larynx). Ce conditionnement vise à optimiser les échanges gazeux mais aussi purifier l'air de particules polluantes ou potentiellement pathogènes.

Les voies aériennes inférieures débutent avec la trachée suivie des bronches qui se divisent en deux, une pour chaque poumon. Les bronches se ramifient en bronchioles qui aboutissent aux alvéoles, où se déroulent les échanges gazeux. Les poumons d'un humain renferment environ 600 millions d'alvéoles, dont les parois internes sont parcourues par un réseau dense de capillaires. En effet, 85 à 95 % de la surface alvéolaire est recouverte par ces capillaires pulmonaires, ce qui fait du poumon l'un des organes les plus vascularisés du corps humain. La surface totale d'échange entre l'air et ces capillaires équivaut à environ 150m², soit la superficie d'un petit court de tennis.

Il est important de faire la différence entre la circulation pulmonaire et la circulation bronchique qui appartient à la circulation systémique. La circulation bronchique a pour fonction d'oxygéner le tissu pulmonaire (plèvre et bronches) en apportant du sang artériel entièrement oxygéné par les artères bronchiques. En distinction et comme décrit précédemment, le sang permettant les échanges gazeux au niveau des capillaires pulmonaires est pauvre en oxygène. Il est acheminé grâce à la circulation pulmonaire depuis le cœur via les artères pulmonaires. Ces artères se ramifient en artérioles pulmonaires qui aboutissent aux capillaires pulmonaires recouvrant les alvéoles.

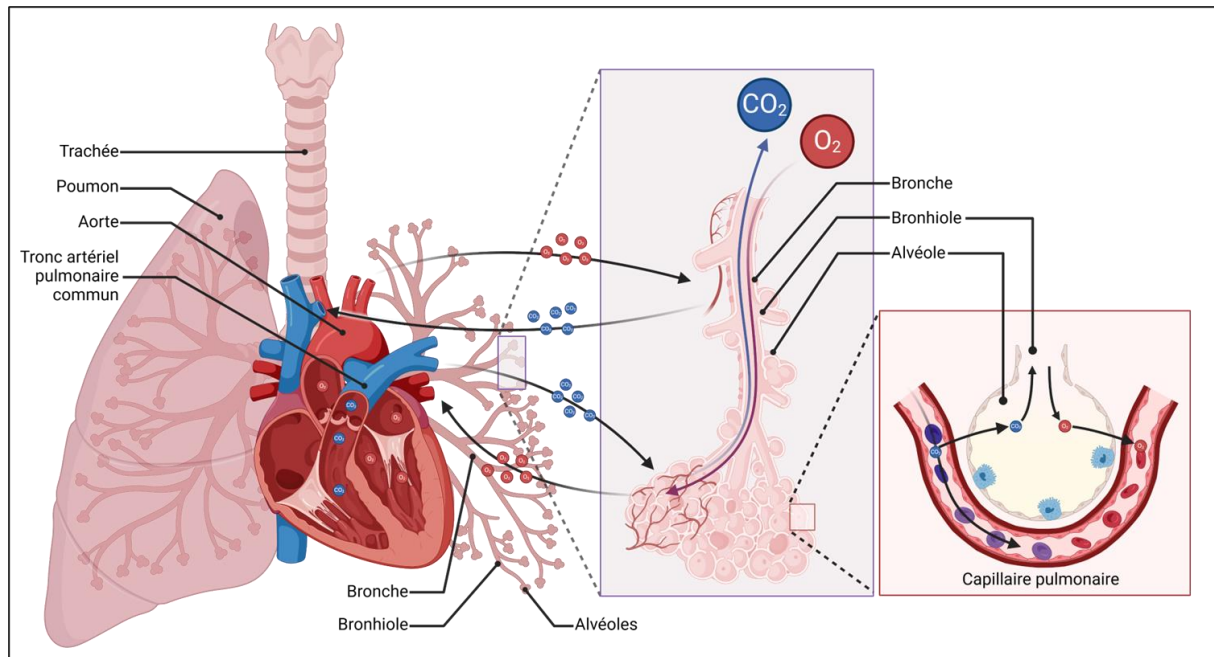


Figure 3 : Physiologie pulmonaire. Le sang désoxygéné, riche en dioxyde de carbone (CO_2), est transporté via l'artère pulmonaire vers les alvéoles situés aux extrémités des bronchioles, où se déroulent les échanges gazeux. L'oxygène (O_2) de l'air inhalé diffuse à travers la barrière alvéolo-capillaire pour oxygéner le sang, qui retourne ensuite au cœur par les veines pulmonaires. En parallèle, la vascularisation bronchique assure la nutrition des structures pulmonaires, avec des échanges au niveau des capillaires bronchiques pour maintenir l'équilibre métabolique local.

En raison de la différence de fonction de ces deux réseaux vasculaires, les ECs qui les composent présentent des caractéristiques distinctes. Les ECs de la vascularisation bronchique sont plus perméables, plus sensibles à l'inflammation et possèdent une capacité d'angiogenèse beaucoup plus prononcée que les ECs de la vascularisation pulmonaire⁴⁷. Cette diversité de types cellulaires au sein de l'endothélium pulmonaire reflète l'adaptation complexe de ce tissu aux fonctions respiratoires et circulatoires spécifiques des poumons.

HETEROGENEITE ENDOTHELIALE PULMONAIRE

La diversité phénotypique des ECs est particulièrement illustrée par l'hétérogénéité endothéliale pulmonaire. Les ECs situées le long de l'axe artériel-capillaire-veineux présentent notamment des distinctions anatomiques⁴⁸. Par exemple, les ECs endothéliales de l'artère pulmonaire sont alignées dans le sens du flux sanguin contrairement aux ECs capillaires qui ne présentent pas un tel alignement car ne subissant pas la même pression du débit sanguin. Ainsi, une première distinction est faite entre les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires (PMVEC) et les cellules endothéliales artérielles pulmonaires (PAEC). Initialement, les ECs utilisées pour caractériser ces sous-populations provenaient de diverses sources animales telles que les bovins, les souris et autres rongeurs. Par exemple, dans une de leurs études, King et son équipe ont prélevé deux types de cellules vasculaires pulmonaires

INTRODUCTION

chez des rats et ils ont observé des différences notables en termes de capacité de prolifération, d'angiogenèse et de fonctionnalité lorsque les cellules étaient cultivées dans des conditions identiques⁴⁸. Il a été observé que les cellules endothéliales des microvaisseaux créent une barrière plus étanche aux protéines que leur homologues des macrovaisseaux⁴⁹.

En 2012, Comhair et al. ont décrit en détail des populations pures de PAECs et de PMVECs humaines, en utilisant des techniques d'imagerie par microscopie électronique ou par contraste de phase pour confirmer la morphologie de ces ECs et en détectant la présence de marqueurs spécifiques. Cette étude a permis d'assurer la validité de ce modèle pour l'étude de la biologie des ECs pulmonaires dans des contextes physiologiques ou de pathologies pulmonaires⁵⁰. Les études qui ont suivi ont permis de confirmer une grande diversité phénotypique. Par exemple, les PAECs et les PMVECs se lient à différentes lectines, à la fois *in vivo* et *in vitro*. La lectine *G. simplicifolia* semble spécifique aux microvaisseaux, tandis que la lectine *H. pomatia* est associée aux macrovaisseaux⁴⁸. De plus, en fonction de leurs rôles, il a été observé que l'enzyme eNOS, qui produit l'oxyde nitrique crucial pour la régulation du tonus vasculaire, est plus abondante dans les PAECs que dans les PMVEC. D'un point de vue métabolique, les PMVECs en état quiescent produisent principalement de l'ATP par le biais de la glycolyse aérobie, un processus bioénergétique connu pour la conversion du glucose en lactate en présence d'oxygène⁵¹. Ce phénotype diffère de celui des PAECs, qui s'appuient davantage sur la phosphorylation oxydative pour la production d'énergie⁵². Des différences ont également été observées aux niveaux transcriptionnel et épigénétique avec des profils de méthylation de l'ADN des PAECs et des PMVECs différents⁵³, ce qui pourrait contribuer à expliquer certaines variations dans les fonctions et propriétés des différents types de ECs.

Récemment, des analyses par séquençage de l'ARN à l'échelle de la cellule unique (scRNAseq) ont confirmé la variabilité des ECs présents dans les poumons⁵⁴ et les capillaires alvéolaires. Les recherches menées par Niethamer *et al.*⁴⁶ ont notamment révélé la présence de différents sous-types d'ECs dans les alvéoles de souris infectées par le virus de la grippe. Leur étude a démontré que ces sous-types cellulaires présentent des fonctionnalités distinctes qui influencent le processus de récupération pulmonaire lors de l'infection. Les avancées scientifiques ne s'arrêtent pas là et l'étude menée par Gillich et al.⁵⁵ a permis de dresser une cartographie précise du poumon de souris adulte, mettant en évidence l'existence de deux populations moléculairement distinctes de cellules capillaires alvéolaires. Ces deux groupes

INTRODUCTION

cellulaires sont répartis de manière homogène dans la zone d'échange gazeux, générant une diversité structurelle en apparence aléatoire dans le réseau capillaire alvéolaire (Figure 4) . Le premier type de cellule identifié, nommé « aérocyte » ou aCap (précédemment nommé capillaire de type 2), se caractérise par ses fonctions spécialisées dans les échanges gazeux et le trafic de leucocytes et semble être spécifique du poumon. Le second type de cellule, nommé capillaire "général" ou gCap (précédemment appelé capillaire de type 1), est spécialisé quant à lui dans la régulation du tonus vasculaire et agit comme une cellule souche ou progénitrice dans les processus d'homéostasie et de réparation capillaire.

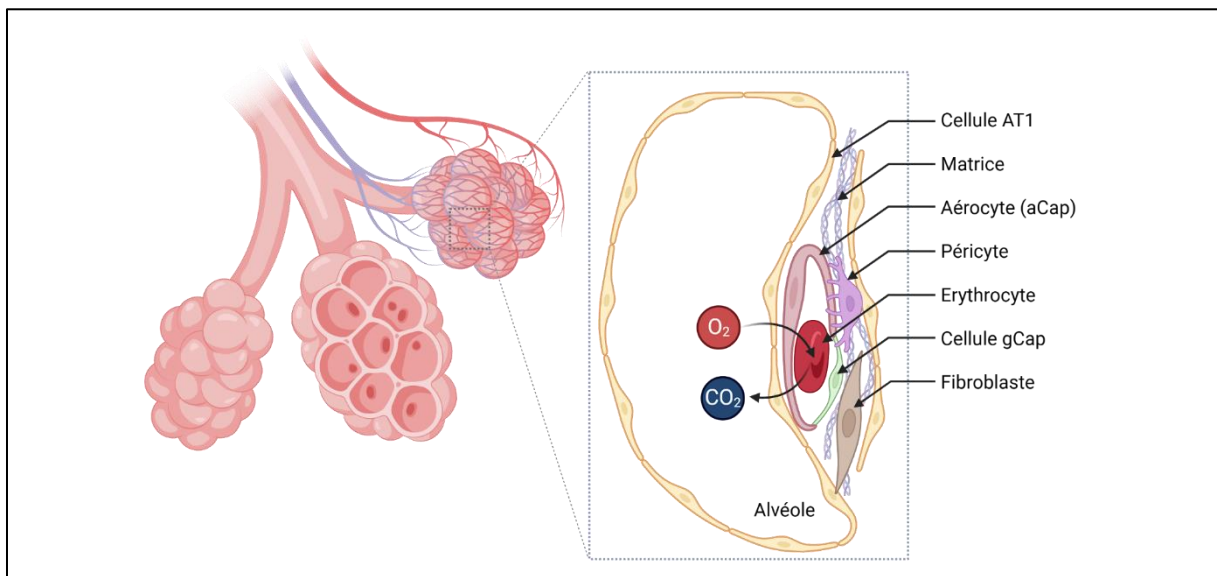


Figure 4 : Organisation des capillaires alvéolaires. Les capillaires alvéolaires sont composés de deux populations de cellules endothéliales. Les cellules aCap sont spécialisées dans les échanges gazeux et retrouvées dans les poumons. Les cellules gCap sont plus communes et permettent la régulation du tonus vasculaire et le renouvellement en cas de dommages tissulaires.

Afin d'explorer les variations de localisation entre les différents types cellulaires, une analyse d'immuno-microscopie électronique a été réalisée sur des poumons où les cellules aCap et gCap étaient marquées de manière distincte. Bien que les deux types de cellules s'assemblent pour former des tubes multicellulaires, les observations ont révélé que les régions minces (partie où l'endothélium est étroitement apposée aux cellules alvéolaires de type 1 (AT1) squameuses) étaient exclusivement composées de cellules aCap, tandis que les cellules gCap étaient positionnées en proximité des cellules stromales dans les régions plus épaisses. D'un point de vue transcriptomique, les capillaires aCap se distinguent par l'expression du gène *Car4* (*CA4* chez l'Homme) qui code pour l'anhydrase carbonique 4, une enzyme catalysant l'hydratation réversible du dioxyde de carbone en bicarbonate et en protons. Une étude de 2020 a révélé que les ECs exprimant *Car4* dépendent de la synthèse de

INTRODUCTION

VEGF-A par les AT1 dans les poumons murins⁵⁶. Le développement et le maintien des aCap requièrent donc spécifiquement le facteur de croissance VEGF-A provenant de l'épithélium des voies respiratoires, qui est en contact direct avec les aCap, ce qui justifie leur localisation. En effet, l'ablation de VEGF-A entraîne une réduction des aCap sans affecter le nombre de gCap. De plus, les aCap semblent jouer un rôle crucial dans la maturation pulmonaire, puisqu'un déficit en aCap chez les souris entraîne une hypertrophie des alvéoles. En parallèle, cette étude sur les capillaires pulmonaires humains a identifié des profils transcriptomiques mixtes regroupant les gCap et les aCap sous la dénomination de capillaires intermédiaires (Cap-i1, Cap-i2). Dans certaines conditions pathologiques, la distribution des populations capillaires est modifiée. A noter que l'analyse d'échantillon d'adénocarcinome pulmonaire humain a montré une diminution des aCap, accompagnée d'une augmentation d'une population capillaire intermédiaire. Cette observation a également été confirmée dans des modèles murins^{55,57}.

Morphologiquement, les cellules gCap se caractérisent par une petite taille (moins de 40 μm et 4x10³ μm^3 de volume moyen), peu de pores (en moyenne 3 pores par cellule) et un faible niveau de ramification, s'étendant rarement sur plusieurs alvéoles. En comparaison, les cellules aCap présentent une surface quatre à cinq fois plus étendue que les cellules gCap, bien qu'elles soient quatre fois moins abondantes, chacune contribuant à près de la moitié de la surface capillaire totale. Les morphologies des deux types de cellules, notamment celles des cellules aCap, se distinguent nettement des configurations des cellules capillaires observées ailleurs dans les poumons et dans d'autres organes, ce qui témoigne de la fonction singulière du réseau vasculaire pulmonaire. Gillich et ses collègues⁵⁵ ont également mis en évidence la conservation de cette spécialisation cellulaire entre les poumons de souris et de l'homme, mais pas chez les reptiles tels que l'alligator ou la tortue, suggérant une acquisition fonctionnelle au cours de l'évolution. Parmi les attributs préservés chez la souris et l'homme, on peut noter les gènes impliqués dans la migration des leucocytes limités aux aCap et les capacités de régulation du tonus vasomoteur aux gCap. Parmi les différences interspécifiques, on remarquera que les gènes du CMH de classe II sont exprimés préférentiellement chez les gCap dans les capillaires murins alors que chez l'homme, ils sont retrouvés majoritairement chez les aérocytes. Ces caractéristiques réservées aux aCap soulignent leur implication dans l'immunomodulation pulmonaire.

IMMUNITE PULMONAIRE ET CELLULES ENDOTHELIALES

Un individu de condition physique modérée inhale approximativement 20 000 litres d'air par périodes de 24 heures. Ce flux aérien renferme inévitablement des agents potentiellement nocifs. On y trouve des poussières, des résidus de combustion (particules fines), des microorganismes, spores de moisissures, bactéries, virus qui se déposent sur les surfaces des voies respiratoires et des alvéoles pulmonaires. Le système respiratoire est doté de mécanismes de défense vis à vis de ces intrusions, à commencer par la présence de cils et de mucus dans les voies respiratoires supérieures. Seules les particules d'une taille inférieure à 3-5 μm (appelée couramment PM 2.5) parviennent à pénétrer en profondeur dans les poumons.

Afin de préserver l'intégrité des poumons face aux agents pathogènes externes provenant de l'air ou bien du sang, une surveillance ainsi qu'une défense rapide et efficace sont indispensables. Cependant, il est tout aussi crucial de limiter une inflammation continue qui pourrait être dommageable pour les membranes alvéocapillaires. La préservation de l'intégrité pulmonaire constitue un enjeu complexe et délicat qui exige un équilibre entre la réponse immunitaire et inflammatoire et la fonction respiratoire. Les activités immunorégulatrices des ECs, allant du recrutement des cellules immunitaires à la transmission de signaux, jouent un rôle majeur dans cet équilibre subtil.

LE SYSTEME IMMUNITAIRE PULMONAIRE

Le système immunitaire pulmonaire est un ensemble hétérogène de cellules, de molécules et de mécanismes spécialisés dans la défense contre les agents pathogènes et les agressions des voies respiratoires. Les premières lignes de défense sont assurées par les cellules épithéliales des voies aériennes qui jouent un rôle de barrière physique contre les agents pathogènes. En réponse aux infections, elles sécrètent des cytokines et chimiokines pour recruter de nouvelles cellules immunitaires. Certaines cellules immunitaires sont présentes constitutivement dans les poumons. Ces cellules résidentes comprennent des cellules dendritiques, les macrophages alvéolaires, les lymphocytes T et B ainsi que les cellules NK. Au cours d'une infection ou d'une blessure, d'autres cellules peuvent être recrutées comme les monocytes et les granulocytes.

INTRODUCTION

Le développement et la maturation du système immunitaire pulmonaire est un processus complexe et dynamique débutant dès les phases précoces de la vie intra-utérine pour se poursuivre bien après la naissance. En plus du recrutement progressif et de la maturation des cellules immunitaires dans les tissus pulmonaires, le tissu lymphoïde associé aux muqueuses pulmonaires se développe pour assurer une surveillance immunitaire continue dans les voies respiratoires. Au cours de l'enfance et de l'adolescence, le système immunitaire pulmonaire continue de se former et de se spécialiser, en réponse aux expositions environnementales et aux infections. Le développement complet du système immunitaire pulmonaire ne se produit généralement qu'à l'âge adulte et il est influencé par des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux. Dans cette partie, je fais un petit rappel des caractéristiques des principaux acteurs des réponses immunes, utile pour comprendre leurs rôles plus spécifiques dans le contexte d'un poumon agressé.

Les cellules de l'immunité innée

Considéré comme la première ligne de défense de l'organisme, le système immunitaire inné est un réseau complexe et dynamique de cellules et de molécules réagissant rapidement en cas d'agression. Ce système, présent dès la naissance, n'a pas de mémoire immunologique et répond de manière aspécifique à une large gamme de pathogènes, tels que les bactéries, les virus ou encore les parasites et les champignons. Il repose sur une capacité de détection par les cellules, de signaux de détresse cellulaire et de dangers ainsi que de motifs moléculaires associés aux pathogènes (DAMPs et PAMPs) grâce à des récepteurs (PRR), tels que les récepteurs "Toll like". Les mécanismes de détection permettent au système de déclencher rapidement une réaction inflammatoire, attirant davantage de cellules immunitaires et établissant ainsi un environnement propice à la réparation des dommages tissulaires. Les cellules spécialisées de cette première ligne de défense appartiennent aux familles des monocytes/macrophages, cellules dendritiques, granulocytes et NK. Certaines de leurs spécificités dans le contexte pulmonaire seront évoquées ci-après avec un intérêt particulier pour les macrophages, type cellulaire avec lequel j'ai travaillé durant ma thèse.

INTRODUCTION

Monocytes :

Les monocytes sont des cellules immunitaires de la lignée myéloïde produites dans la moelle osseuse et présentes dans la circulation sanguine où elles représentent 2 à 10% des leucocytes. Les monocytes circulants sont classés en trois sous-ensembles identifiés par leurs cluster de différenciation (CD): le groupe "classique" CD14⁺CD16⁻ représentant 85% des monocytes, le groupe "intermédiaire" CD14⁺CD16⁺ (5 à 10%) ou le "non-classique" CD14⁻CD16⁺ (5 à 10%)⁵⁸. Tous les monocytes humains expriment certains marqueurs comme le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-II HLA-DR et l'intégrine α M (CD11b)⁵⁹. Ils possèdent également des récepteurs spécifiques, qui leur permettent d'être recrutés vers les tissus en réaction à une lésion ou une infection ayant induit des signaux inflammatoires. Ces monocytes sont qualifiés d'inflammatoires en raison de leur capacité à produire des myéloperoxydases, des cathepsines, des cytokines, chimiokines et leurs récepteurs, parmi lesquels l'IL-1 β , l'IL-6, le TGF- β , le *C-C motif chemokine ligand 4* (CCL4), *C-X-C motif chemokine ligand 2* (CXCL2) et le *C-X-C motif chemokine receptor 4* (CXCR4)⁶⁰. Les monocytes peuvent être caractérisés par leur capacité phagocytaire, qui leur permet d'ingérer et de détruire les agents pathogènes et les cellules mortes. Une fois recrutés, les monocytes vont avoir la capacité de se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques selon le contexte⁵⁸.

Macrophages :

Au sein des poumons, les macrophages sont la population cellulaire prédominante, représentant 90 à 95% des cellules immunitaires résidentes⁶¹. Ils constituent la première barrière de protection des voies respiratoires et interagissent principalement avec les cellules épithéliales des poumons pour réguler leur propriété phagocytaire. La distinction fonctionnelle entre les macrophages tissulaires résidents et les macrophages recrutés était complexe en raison de similitudes dans leurs marqueurs de surface. Des travaux récents ont néanmoins révélé l'existence de deux sous-populations de macrophages résidents, les macrophages alvéolaires et les macrophages interstitiels pulmonaires. Les macrophages alvéolaires semblent constituer les défenseurs de première ligne des alvéoles et des voies respiratoires, tandis que les macrophages interstitiels agissent comme gardiens du système vasculaire et le l'interstitium pulmonaire, au travers de fonctions homéostatiques, métaboliques et de réparation tissulaire.

INTRODUCTION

Les macrophages alvéolaires résident sur la paroi interne de l'alvéole, où ils sont entourés de cellules épithéliales alvéolaires de type I et de type II, d'ECs capillaires et de fibroblastes interstitiels alvéolaires (Figure 5). Ces derniers fournissent un environnement nutritif riche en cytokines, favorable au développement des macrophages alvéolaires⁶². Le lobe supérieur héberge environ 1,4 milliard de ces cellules⁶³. Depuis leur position exposée, les macrophages alvéolaires captent, phagocytent et neutralisent efficacement une grande variété d'agents pathogènes et de particules inhalées sans provoquer de réponse inflammatoire excessive susceptible d'endommager les alvéoles⁶². On parle alors de réaction immunologiquement "silencieuse". Lorsque leur capacité phagocytaire est dépassée, les macrophages alvéolaires induisent une inflammation en sécrétant des chimiokines et des cytokines telles que les interférons de type I, le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et l'IL-1 β , qui recrutent et activent les neutrophiles, les monocytes, et les cellules dendritiques⁶⁴. En plus d'initier l'inflammation, les macrophages alvéolaires contribuent à sa résolution en produisant des cytokines immunorégulatrices telles que le TGF- β , l'IL-1RA et des prostaglandines⁶⁵⁻⁶⁷. Des études récentes ont révélé que les macrophages alvéolaires chez la souris et l'humain se forment avant la naissance à partir de progéniteurs foetaux circulants. Ces progéniteurs occupent la niche alvéolaire durant la phase de croissance périnatale et persiste à l'âge adulte grâce à une faible prolifération locale, même en l'absence de tout processus inflammatoire, sans nécessiter d'apport de monocytes circulants⁶⁸.

Les macrophages interstitiels pulmonaires, comme leur nom l'indique, sont principalement résidants dans l'espace interstitiel autour du faisceau bronchovasculaire (Figure 5). A la différence des macrophages alvéolaires, les macrophages interstitiels sont présents dans tout l'organisme avec une signature transcriptionnelle similaire dans différents organes, suggérant une fonction ubiquitaire⁶⁹. Ces macrophages sont localisés à proximité d'une grande diversité de cellules non hématopoïétiques telles que les vaisseaux sanguins⁷⁰. Leurs dialogues et interactions avec les cellules voisines contribuent au maintien d'un environnement propice à la régénération pulmonaire. Par exemple, il a été démontré dans un modèle de lésion endothéliale systémique provoquée par le lipopolysaccharide bactérien (LPS), que la Rspodin3 d'origine endothéliale pulmonaire induit des changements dans le métabolisme et l'épigénétique des macrophages interstitiels pour conduire à la suppression de l'inflammation pulmonaire⁷¹.

INTRODUCTION

Divers sous-groupes de macrophages interstitiels se distinguent par leur localisation, leur fonction et leur durée de vie dans les poumons. Ces sous-populations ont été caractérisées de façon indépendante par des approches transcriptomiques et par leur expression différentielle du récepteur du mannose CD206⁷². Les macrophages interstitiels exprimant CD206 CMH II+^{lo} CX3CR1^{lo}, positionnés autour des bronches, jouent un rôle dans la régulation immunitaire, la cicatrisation et la réparation tissulaire et sont autosuffisants sur le long terme. Les macrophages interstitiels CD206 CMH II+^{hi} CX3CR1^{lo} sont impliqués quant à eux dans la présentation des antigènes. Ils sont localisés dans l'interstitium alvéolaire, et bien qu'ils persistent également dans les poumons sur une longue période, ils semblent être régulièrement renouvelés par des monocytes sanguins extravasés⁷².

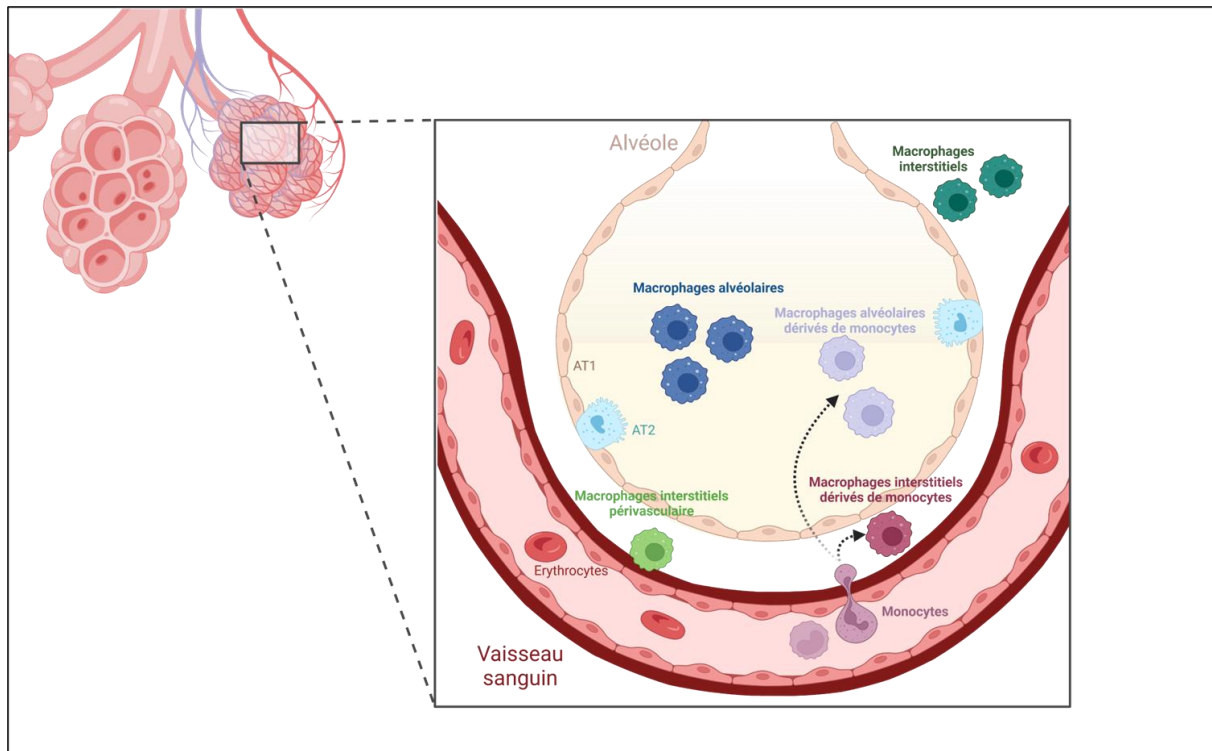


Figure 5 : Localisation des sous-populations de macrophages pulmonaires. Adapté de Osorio-Valencia et al⁷³. Les macrophages sont la population cellulaire immunitaire la plus représentée dans le poumon. Elle présente une diversité de phénotypes induits par leur localisation. Les macrophages résidents regroupent les macrophages interstitiels et les macrophages alvéolaires et leurs homologues recrutés dérivant de monocyte circulant.

Il existe une dernière population de macrophages pulmonaires, différente des macrophages résidents. Elle est recrutée rapidement pendant l'inflammation à partir de monocytes pour éliminer les agents pathogènes⁷⁴. Ces macrophages, appelés "macrophages recrutés", présentent leur propre signature transcriptomique et des fonctions uniques (Figure 5). Alors que les macrophages alvéolaires atténuent l'inflammation pulmonaire, les macrophages recrutés la favorisent^{75,76}. Au cours de la résolution de l'inflammation, la plupart

INTRODUCTION

des macrophages dérivés de monocytes subissent une mort cellulaire programmée, tandis que les macrophages alvéolaires résidents survivent et persistent dans les tissus. Néanmoins, après deux mois d'infection, certains macrophages recrutés acquièrent un phénotype et des fonctions similaires à ceux des macrophages alvéolaires résidents, suggérant qu'une partie de la population de macrophages alvéolaires peut également être régénérée par des macrophages dérivés de monocytes⁷⁷.

Le domaine de la biologie des macrophages pulmonaires a été marqué par la complexité des cellules myéloïdes, caractérisées par une expression multiple de marqueurs se chevauchant et par différents états d'activation. Dans les poumons, de nombreuses fonctions traditionnellement attribuées aux macrophages alvéolaires et interstitiels résidents pourraient en réalité être le fait de monocytes ou de macrophages recrutés, présentant une durée de vie limitée. Avec l'émergence des technologies de transcriptomique spatiale, Madissoon et al ont effectué un profilage tissulaire profond des poumons et des voies respiratoires sains de donneurs d'organes décédés. Ils ont permis la caractérisation des types de cellules le long de l'axe proximal à distal de l'arbre respiratoire⁷⁸. Ils ont ainsi confirmé la présence de plusieurs sous-populations connues, comme les macrophages périvasculaires et intravasculaires (exprimant LYVE1 et MAF⁷⁹) et identifié de nouvelles populations. Parmi elles, une population de macrophages intermédiaires exprimant des marqueurs monocytaires (CD14) mais aussi une population non décrite de macrophages exprimant des chimiokines (CXCL8, CCL4 et CCL20) nommée Macro-CCL45. Ils ont aussi mis en évidence, au sein de la population alvéolaire, deux nouveaux groupes de macrophages : les "macro-alv-dividing" et les "macro-alv-MT". Ces derniers étant caractérisés par l'expression de métallothionéine qui joue un rôle dans les réponses immunitaires et les réponses au stress.

Cellules dendritiques :

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices d'antigènes, dont la principale fonction est d'initier, maintenir et réguler les réponses immunitaires. Elles surveillent constamment leur environnement et capturent des protéines qu'elles transforment en peptides pour les présenter aux lymphocytes T (LT) via les molécules du CMH, initiant ainsi la réponse immunitaire adaptative. Bien que les DC pulmonaires ne résident pas de façon permanente dans les tissus en raison de leur incapacité à s'auto-renouveler, elles peuvent persister dans les poumons jusqu'à huit semaines⁸⁰. Dans les poumons, les DCs se

INTRODUCTION

divisent en trois principaux sous-types : les DC plasmacytoïdes (pDC), les DC myéloïdes de type 1 (cDC1), et de type 2 (cDC2). Ces sous-populations, dont les phénotypes sont régulés par des facteurs de transcription spécifiques, remplissent des fonctions immunologiques distinctes⁸¹. En cas d'inflammation, une nouvelle population dérivée de monocytes circulants (moDCs) peut émerger. Cependant, différencier les moDCs des DC résidentes reste un défi, surtout chez l'humain^{82,83}. Il existe un lien étroit entre les DCs pulmonaires et les macrophages alvéolaires. Ces derniers exercent une fonction suppressive sur les activités des DC et réduisent les dommages tissulaires potentiellement causés par une réponse immunitaire inappropriée déclenchée par les DCs pulmonaires⁸⁴.

Les granulocytes :

Les granulocytes, appartenant à la lignée myéloïde, englobent les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Ces cellules sont caractérisées par la présence de granules contenant des enzymes, des cytokines, des chimiokines et des peptides antimicrobiens, qui sont libérés suite à l'activation des cellules. Il semblerait que le poumon dispose de populations résidentes de neutrophiles et d'éosinophiles, cellules traditionnellement perçues comme étant exclusivement circulantes et mobilisées en réponse à des infections ou à des lésions tissulaires^{85,86}. Les neutrophiles représentent la population cellulaire la plus abondante dans le sang circulant⁸⁷ et sont les premières cellules recrutées lors d'infections ou de dommages aux tissus⁸⁸. Ce recrutement est médié par des cytokines et chimiokines principalement l'IL-8 et les facteurs CXCL1/2/5/15, sécrétés par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires⁸⁹. Contrairement à la majorité des organes, les poumons abritent un réservoir de neutrophiles, souvent désigné sous le terme de « pool marginalisé », qui peut être rapidement mobilisé et maintenu dans un équilibre dynamique avec les neutrophiles circulant du sang⁹⁰. De leur côté, les éosinophiles constituent la population sanguine la moins abondante. Ils sécrètent des cytokines qui peuvent promouvoir une réponse immunitaire adaptative de type Th2, agir comme cellules présentatrices d'antigène⁹¹, stimuler l'activation des cellules dendritiques⁹², ce qui les positionne comme acteurs majeurs de l'inflammation associée aux allergies.

INTRODUCTION

Cellules Natural killer & Cellules lymphoïdes innées :

Les cellules tueuses naturelles (NK) sont des acteurs tissulaires importants et en particulier des médiateurs de l'homéostasie dans les poumons. En tant que cellules cytolytiques, elles sécrètent des granzymes qui facilitent la destruction de cellules infectées par les agents pathogènes^{93,94}. La cartographie initiale des cellules NK à partir de tissus humains sains démontre que le poumon contient plusieurs populations distinctes basées sur les niveaux d'expression de CD56 et NKp46⁹⁵. Les NK possèdent une variété de récepteurs activateurs et inhibiteurs qui régulent leur état fonctionnel, déterminant ainsi leur activation ou leur inactivation. En conditions physiologiques, ces cellules restent inactives grâce à la reconnaissance du CMH I exprimé par toutes les cellules du « soi », à travers leur récepteurs inhibiteurs tels que les killer cell Ig-like receptor (KIRs) et l'ILT2. L'activation des NK dépend d'un équilibre favorable entre les signaux activateurs, générés par des récepteurs comme NKG2C/D et les NCRs, et les signaux inhibiteurs associés à l'expression du CMH I⁹⁶.

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) partagent de nombreuses caractéristiques fonctionnelles de leurs homologues T, mais n'ont pas de réarrangement somatique des récepteurs T cellulaire (TCR) spécifiques à l'antigène et elles peuvent être activées par des cytokines sécrétées localement et/ou des récepteurs activateurs (NKp44)⁹⁷. Sur la base de leurs caractéristiques fonctionnelles, les ILCs sont réparties en trois sous-ensembles (ILC1, ILC2 et ILC3) qui sont à peu près analogues aux cellules Th1, Th2 et Th17/22⁹⁸.

Les cellules de l'immunité adaptative

Le système immunitaire adaptatif est un réseau sophistiqué de défense, conçu pour protéger l'organisme contre des agents pathogènes de façon spécifique. A la différence du système immunitaire innée, il promeut une réponse ciblée, qui s'affûte avec le temps à travers chaque rencontre avec un antigène donné. Il est principalement composé de lymphocytes T et B, qui orchestrent respectivement l'immunité dite à médiation "cellulaire" et "humorale". Leur activité est néanmoins dépendante de l'immunité innée et en particulier de l'activité des DC, qui jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse des lymphocytes détaillée plus bas. Un aspect fascinant du système immunitaire adaptatif est sa capacité à établir une mémoire immunologique. Après une première exposition, certaines cellules B et T deviennent des cellules mémoire, permettant à l'organisme de réagir plus rapidement et efficacement lors d'une réexposition au même antigène. Cette éducation représente la base de l'immunité

INTRODUCTION

à long terme et se développe tout au long de la vie de l'homme, c'est d'ailleurs sur elle que s'appuie l'utilité et l'efficacité de la vaccination. Bien que la plupart des lymphocytes soient en circulation ou localisés dans les organes lymphoïdes secondaires, des populations résidentes de lymphocytes T et B sont également présentes dans les tissus pulmonaires.

Les lymphocytes T:

Les LT sont une sous population de cellules dérivées de précurseurs lymphoïdes produits dans la moelle osseuse. Ils vont subir un processus de maturation et de sélection au sein du thymus, où ils acquièrent la capacité de distinguer le soi du non-soi, avant d'être libérés sous une forme naïve dans la circulation sanguine. Ils rejoignent alors rapidement les tissus lymphoïdes secondaires où ils attendent leur éducation. Les LT se divisent en deux sous-types principaux, les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺, en fonction des glycoprotéines présentes à la surface de leur membrane. Les LT CD4⁺, aussi appelés LT auxiliaires ou helper (Th), exercent une fonction régulatrice centrale dans l'orchestration des réponses immunitaires adaptatives. Les LT CD8⁺, désignés comme LT cytotoxiques, sont importants pour la défense immunitaire contre les agents pathogènes intracellulaires et les cellules infectées. Leur action cytotoxique se déroule par divers mécanismes, incluant la sécrétion de cytokines telles que le TNF- α et l'interféron- γ (IFN- γ), l'exocytose de granules cytotoxiques contenant de la perforine et des granzymes, ainsi que l'initiation de l'interaction entre les molécules FAS et FASL.

La réponse immunitaire des LT est spécifique de la reconnaissance d'un antigène via leur TCR. Les LT qui n'ont jamais été exposés à un antigène sont désignés comme "naïfs", en contraste avec les LT "mémoire", qui ont déjà rencontré un antigène spécifique. Le TCR se forme durant la maturation des lymphocytes par un processus impliquant un réarrangement somatique connu sous le nom de recombinaison VDJ⁹⁹. Environ 90% des LT ont un TCR constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β , représentant les LT dit conventionnels (CD4⁺ et CD8⁺). Une proportion plus faible possède un TCR formé de chaîne γ et δ (LT $\gamma\delta$) et représente 3 à 10 % des LT dans le sang périphérique d'un humain adulte¹⁰⁰. Ces LT $\gamma\delta$ ont la particularité de n'exprimer ni CD4, ni CD8 et sont à cheval entre l'immunité innée et adaptative. Une fois matures, les LT circulent dans le sang et les tissus, prêts à agir à la moindre menace. Ils sont retrouvés majoritairement dans les organes lymphoïdes secondaires¹⁰¹, tels que la rate et les ganglions lymphatiques mais aussi au niveau des muqueuses et en particulier celles des poumons.

INTRODUCTION

Le processus d'activation des LT s'amorce avec la présentation d'un fragment peptidique antigénique associé à un CMH par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), telles que les DC ou les macrophages. Les TCR des LT CD4⁺ reconnaissent des CMH de classe II porteurs de peptides exogènes endocytés, tandis que les LT CD8⁺ s'activent sur présentation d'un CMH de classe I chargés avec des peptides dérivés de protéines intracellulaires. Cette interaction est renforcée par des signaux de costimulation engendrés par des interactions impliquants des récepteurs membranaires tels que CD27 et CD28, ainsi que le récepteur inducible du facteur de nécrose tumorale induit par les glucocorticoïdes (GITR). Un certain nombre de molécules de costimulation essentielles à l'activation, telles que OX40 et 4-1BB ont également été identifiées ¹⁰². La figure 6 répertorie les principales interactions qui se produisent dans la «synapse immunologique» entre CPA et LT et qui aboutissent à une régulation fine de l'activité du LT. Cette dynamique déclenche une expansion clonale des LT, soutenue par la sécrétion autocrine d'IL-2. Les signaux bidirectionnels sont cruciaux pour permettre une activation efficace des LT, conduisant à leur prolifération et à leur différenciation en cellules effectrices, capables de produire des cytokines ou d'exercer une cytotoxicité via la libération de perforines et granzymes.

Parmi les molécules de costimulation, OX40 appartient à la famille des récepteurs au TNF (TNFR) et est également désigné sous les appellations CD134 ou TNFRSF4¹⁰³. Cette molécule a été identifiée pour la première fois sur la membrane des LT CD4⁺ activés chez le rat en 1987. Des investigations ultérieures ont démontré que OX40 est exprimé non seulement sur les LT CD4⁺ et CD8⁺ activés, mais aussi sur les neutrophiles et les NK. OX40 joue un rôle fondamental dans la costimulation lors de l'activation T, en favorisant la survie et l'expansion des clones dans divers modèles animaux d'auto-immunité, de maladies infectieuses ou de cancer¹⁰⁴. De plus, OX40 est impliqué dans la régulation des réponses des LT effecteurs et mémoires¹⁰³.

Notons qu'au sein de la synapse immunologique et de la dynamique d'activation du LT, interviennent également des signaux de contrôle par inhibition. Cette signalisation contribue à une mise en place de checkpoints inhibiteurs et implique les couples Tim3/Gal-9, CTLA-4/CD80/86, PD-1/PDL-1. Je détaillerai par la suite certains de ces signaux qui ont une importance particulière dans mes résultats de thèse.

INTRODUCTION

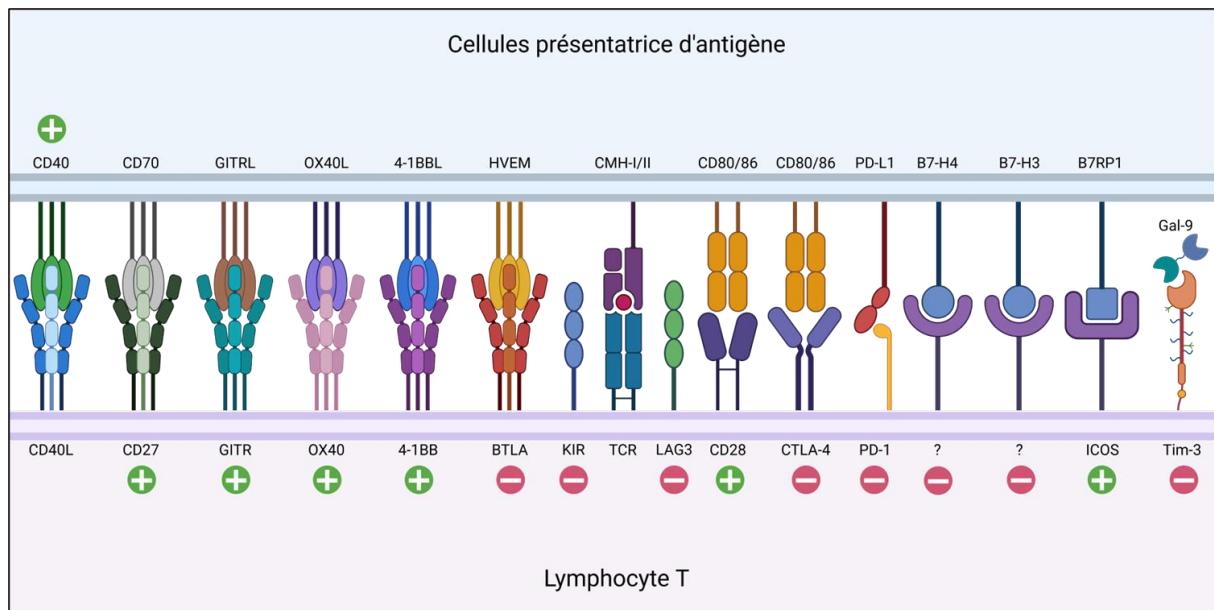


Figure 6 : Synapse immunologique. Une synapse immunologique est la zone d'échange et d'interaction entre une cellule immunitaire et une autre cellule (le plus souvent une cellule présentatrice d'antigènes). C'est au niveau de cette zone que les LT reconnaissent leur antigène porté par les molécules de CMH I ou II et qu'ils seront exposés à des signaux co-stimulateurs ou co-inhibiteurs en fonction de leur environnement et de leur état d'activation.

Pour les LT naïfs, la phase d'activation déclenche l'initiation de leur polarisation. Les LT CD4⁺ naïfs se différencient en diverses sous-populations, incluant les sous-types Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T_{FH} et Treg, chacun présentant une spécificité fonctionnelle distincte¹⁰⁵ (Figure 7). De même, les LT CD8⁺ cytotoxiques subissent une polarisation vers des sous-types Tc1, Tc2 ou Tc17, reflétant également des profils d'activation variés. La différenciation et les fonctions des lymphocytes T sont influencées par le microenvironnement cytokinique, ainsi que par des signaux co-inhibiteurs et co-stimulateurs, sans oublier l'impact des facteurs épigénétiques. Ceux-ci modifient l'expression des facteurs de transcription associés à la production de cytokines caractéristiques des sous populations. Par conséquent, les lymphocytes T manifestent une grande plasticité, ce qui positionne la modulation de leur réponse comme une stratégie thérapeutique prometteuse dans de nombreuses pathologies comme les maladies auto-immunes ou le cancer.

Lorsqu'un antigène est éliminé, la majorité des lymphocytes T effecteurs entre en apoptose, tandis qu'une fraction résiduelle persiste pour établir un réservoir de lymphocytes mémoires. Ces cellules mémoires peuvent demeurer dans l'organisme pendant de nombreuses années¹⁰⁶, tout en étant capables d'éliminer efficacement les cellules présentant le même antigène lors d'une réexposition et sans nécessiter de réactivation par les CPA. Les LT mémoires se divisent en plusieurs sous-types, chacun étant défini par sa localisation et sa

INTRODUCTION

fonctionnalité¹⁰⁷. Les LT centraux mémoires, principalement localisés dans les structures lymphoïdes secondaires possèdent une forte capacité de prolifération. Les LT effecteurs mémoires sont caractérisés par leurs propriétés cytotoxiques élevées, ainsi que par leur aptitude à migrer vers les organes non lymphoïdes, y compris les tissus tumoraux. Les LT résidents mémoires, pour leur part, sont situés dans les tissus muqueux, où ils forment une barrière constamment efficace en raison de leur incapacité à circuler. Les LT souches mémoires sont des cellules en circulation, présentant des caractéristiques similaires à celles des cellules souches, comme une forte capacité d'auto-renouvellement et de prolifération.

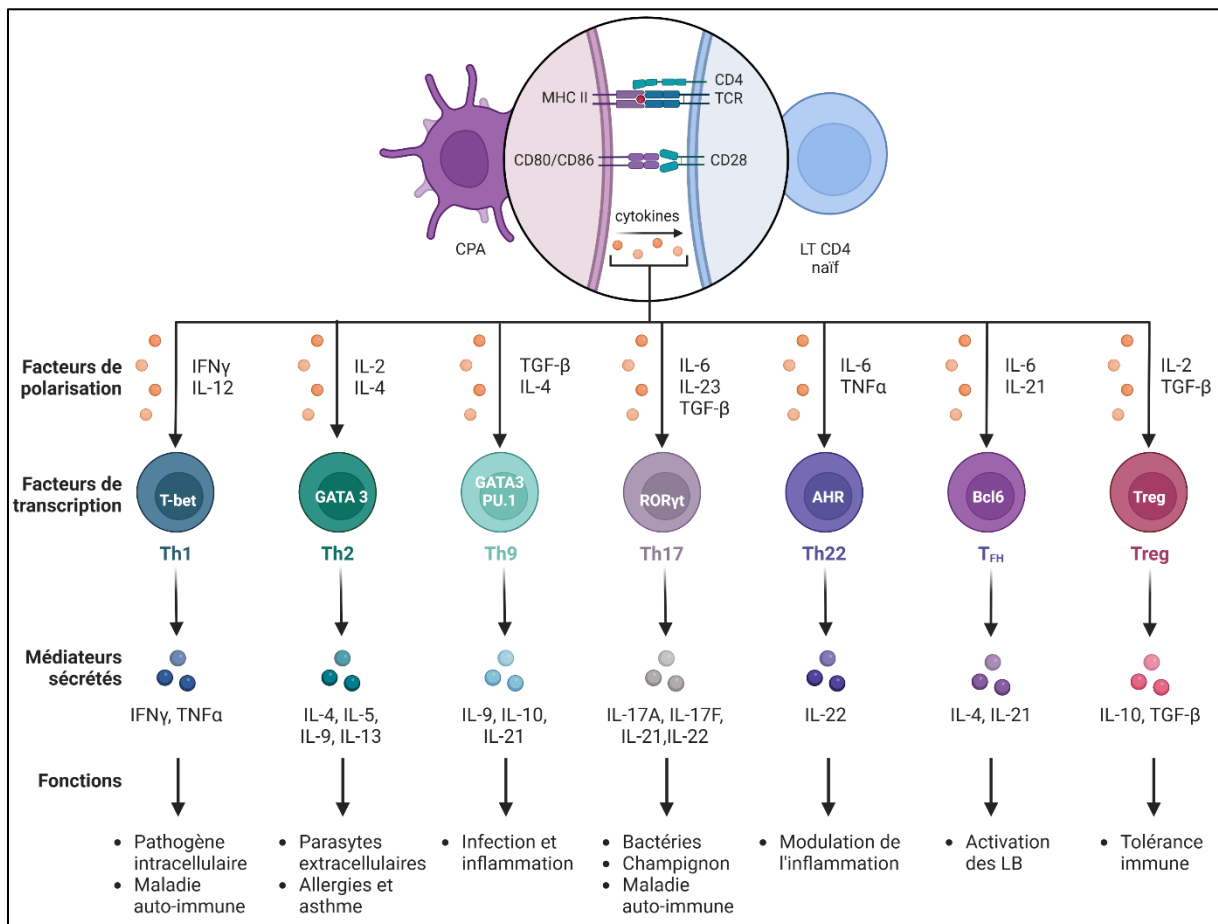


Figure 7 : Polarisation des lymphocytes auxiliaires. Adapté des Chalmin et al,¹⁰⁸ et Rouers et al,¹⁰⁹. Le processus commence par la reconnaissance de l'antigène présenté par une CPA via le complexe MHC II et les interactions co-stimulatrices CD80/CD86 avec CD28 sur le LT CD4+ naïf. Selon les cytokines de l'environnement, le lymphocyte T naïf se différencie en l'une des sous-populations Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T_{FH}, Treg. Chaque sous-population est caractérisée par des facteurs de transcription spécifiques, sécrète des cytokines particulières et remplit des fonctions immunitaires distinctes, telles que la réponse aux pathogènes, l'inflammation, et la tolérance immunitaire. AHR : aryl hydrocarbon receptor ; Bcl6 : B-cell lymphoma 6 ; Foxp3 : forkhead box P3 ; GATA3 : GATA binding protein 3 ; ROR γ t : retinoic acid-related orphan receptor gamma t ; T-bet : T-box-containing protein expressed in T cells.

A titre d'exemple, le mécanisme par lequel la signalisation OX40-OX40L module la fonction des LT illustre la complexité des interactions entre les acteurs du système immunitaire. Contrairement à d'autres récepteurs de costimulation constitutifs, tels que CD28

INTRODUCTION

et CD27, OX40 n'est pas exprimé sur les LT naïfs au repos¹¹⁰. Son expression est induite de manière transitoire en réponse à la signalisation post-engagement du TCR suite à la reconnaissance de l'antigène. Chez les LT naïfs, cette expression peut se manifester entre 12 heures et 5-6 jours après activation, tandis que chez les LT mémoires, l'induction est plus rapide et apparaît entre 1 à 4 heures après l'activation¹¹¹. Bien que les LT déficients en OX40 puissent proliférer et se différencier en LT effecteurs dans les 2 à 3 jours suivant l'engagement du TCR, ils présentent une survie significativement réduite après 12 à 13 jours^{112,113}. Cela suggère que la signalisation OX40 n'influence pas la phase d'activation initiale, mais joue plutôt un rôle fondamental dans le maintien de la prolifération et de la survie durant la phase effectrice. De plus, les ECs exprimant OX40L peuvent interagir avec les LT activés, renforçant ainsi leur fonction durant cette phase effectrice¹¹⁴.

Concernant les sous-ensembles de LT CD4⁺, les signaux OX40-OX40L peuvent, dans certaines conditions, favoriser fortement l'induction des cellules Th1, Th2 et Th9, tandis que, dans d'autres contextes, ils peuvent inhiber la génération de Tregs exprimant Foxp3¹¹⁵. Des études antérieures ont montré que la signalisation OX40-OX40L peut augmenter la réponse immunitaire dans ces sous-ensembles de LT à travers les voies NF-κB, MAPK, NFAT et des voies anti-apoptotiques dépendantes de BCL-2/XL^{111,116}. Ces voies de signalisation contribuent à favoriser l'expression de molécules pro-survie et la production de cytokines, optimisant ainsi la génération de sous-ensembles de LT effecteurs et mémoires¹⁰⁴. Dans des conditions physiologiques, l'interaction OX40-OX40L sollicitera de manière préférentielle la différenciation des LT CD4⁺ en cellules effectrices Th2¹¹⁷. Plusieurs études signalent qu'en l'absence de signaux OX40-OX40L, la prolifération clonale des cellules Th2 est compromise, entraînant une faible population de cellules T mémoire. Ces observations suggèrent que cette interaction est essentielle pour la différenciation et la polarisation des cellules Th2^{118,119}. L'interaction OX40-OX40L semble également indispensable dans la génération de lymphocytes T mémoire Th2 et les réponses de rappel mémoire, en soutenant l'expression des membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2, tels que BCL-2, BCL-XL ou BFL^{118,119}.

En s'appuyant de nouveau sur l'étude réalisée par Madissoon et al., le compartiment CD4⁺ résident pulmonaire est caractérisé par des cellules naïves, des cellules effectrices mémoires, des cellules Treg et des cellules mémoires tissulaires. Plusieurs populations T CD8⁺ dont des cellules mémoires tissulaires sont également spécifiquement localisées au niveau de

INTRODUCTION

l'épithélium des voies respiratoires⁷⁸. Ces observations ont été corroborées par des études de divers modèles d'infection où il a été noté que le poumon abrite une proportion significative de LT mémoires^{120,121} et de LT naïfs^{122,123}. Ces données tranchent avec celles d'autres compartiments non lymphoïdes, qui ne contiennent pas de LT mémoires et où les LT naïfs sont absents, ces derniers nécessitant un signal de chimiokine pour leur entrée.

Les lymphocytes B:

Tout comme les LT, les LB font partie de lignée lymphoïde et se développent à partir de précurseurs hématopoïétiques produits dans la moelle osseuse. Leur principale fonction est d'assurer l'immunité humorale par la production d'anticorps spécifiques d'un antigène, notamment les immunoglobulines IgM, IgA, IgG et IgE. L'anticorps lié à l'antigène aura alors plusieurs fonctions en rapport avec sa nature. Outre cette fonction de production d'anticorps, les LB possèdent la capacité de présenter des antigènes aux LT, ce qui renforce leur réponse. Souvent cette collaboration est réciproque, puisque les LT contribuent également à la survie des LB naïfs activés.

L'activation d'un LB débute par la reconnaissance d'un antigène via le récepteur des cellules B (BCR). S'ensuivent plusieurs phases de maturation, au cours desquelles les LB subissent recombinaison homologue et hypermutation somatique. Ces processus aboutissent à la prolifération et à la différenciation des LB en plasmocytes ou en cellules B mémoire. La maturation des LB se déroule dans les centres germinatifs des ganglions lymphatiques, ou, dans le cas des poumons, au sein des iBALTs que nous aborderons par la suite. Ici encore, à l'image de leur analogue T, il existe une population de LB régulateur (Breg) qui possède des fonctions immunosuppressives via leur production d'IL-10 ou de TGF β . Les Bregs sont ainsi impliqués dans les processus de tolérance dans le cadre d'infections ou de cancer¹²⁴.

L'identification des lymphocytes B résidents dans les tissus constitue une avancée récente, observée initialement chez le modèle murin. Dans une étude pionnière réalisée par Randall et al., il a été démontré que les LB mémoires résidents, spécifiques de virus influenza, requièrent une reconnaissance locale de l'antigène et conservent la capacité de se différencier rapidement en plasmocytes lors d'une nouvelle exposition¹²⁵. Des analyses transcriptomiques ultérieures sur les LB, qu'ils soient tissulaires ou lymphoïdes ont révélé que les LB résidents des poumons acquièrent une signature « résidente » distincte¹²⁶ et peuvent être continuellement générés à partir des réponses induites dans les centres germinatifs des

INTRODUCTION

organes lymphoïdes périphériques^{127,128}. Notons qu'une analyse comparative approfondie des cellules B mémoires dans les tissus murins et humains a mis en évidence l'expression conservée de nombreux marqueurs de résidence entre les espèces^{129,130}.

Les structures de cohabitation B et T :

Il est essentiel de souligner que la plupart des cellules immunitaires résidentes ne sont pas isolées, mais plutôt intégrées dans des structures semi-organisées qui miment les caractéristiques des organes lymphoïdes secondaires. En réponse à des événements inflammatoires ou infectieux au niveau pulmonaire, il peut se produire le développement de structures lymphoïdes tertiaires (TLS), dont l'organisation est semblable à celle des structures lymphoïdes secondaires. Progressivement, lors de la résolution de l'inflammation, les LB et LT se regroupent en proximité des bronches principales, donnant ainsi naissance à une structure que l'on désigne sous le terme de tissu lymphoïde inductible associé aux bronches (iBALT)¹³¹. Les iBALT se composent d'agglomérats de LT et LB, de cellules présentatrices d'antigènes (DC, macrophages), et d'un maillage sous-jacent de cellules stromales. La formation d'iBALT peut être initiée par une diversité de voies moléculaires pour activer et différencier les cellules stromales, lesquelles expriment des chimiokines servant de cadre structurel pour iBALT, et facilitant ainsi le recrutement et l'organisation des leucocytes (Figure 8).

A l'image des organes lymphoïdes classiques, les iBALT ont la capacité de recruter des lymphocytes naïfs circulants, de les exposer à des antigènes locaux, en l'occurrence ceux des voies respiratoires, et de favoriser leur activation et leur différenciation en cellules effectrices. De nombreuses recherches ont exploré les mécanismes de communication et la pérennité de certains sous-types cellulaires au sein des iBALT. Il a été établi que les LT CD4⁺ auxiliaires résidents co-localisent avec des LB dans les iBALT, ce qui faciliterait une induction optimale des cellules B mémoires. Cette interaction semble dépendre de l'expression de Bcl6, puisque sa suppression dans les LT CD4⁺ avant l'infection par le virus influenza, a conduit à une redistribution de ces LT en dehors des zones iBALT, ainsi qu'à une altération de la production d'anticorps localement¹³². Par ailleurs, parmi les populations CD4⁺ auxiliaires, une sous-population sécrétant de l'IL-21 semble déterminante pour le maintien des LT CD8⁺ résidents des poumons¹³³.

Outre les iBALT, il existe deux autres variantes de TLS dans les poumons : les foyers inflammatoires nodulaires (NIF), qui se composent d'amas de cellules myéloïdes et de LT

INTRODUCTION

CD8⁺¹³⁴, et les granulomes, comme ceux observés lors de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*. Ces granulomes se distinguent par la présence d'un noyau central constitué de macrophages infectés, entouré de LB et LT¹³⁵. Ces variants montrent une ressemblance moins prononcée avec les structures lymphoïdes secondaires comparativement aux iBALT.

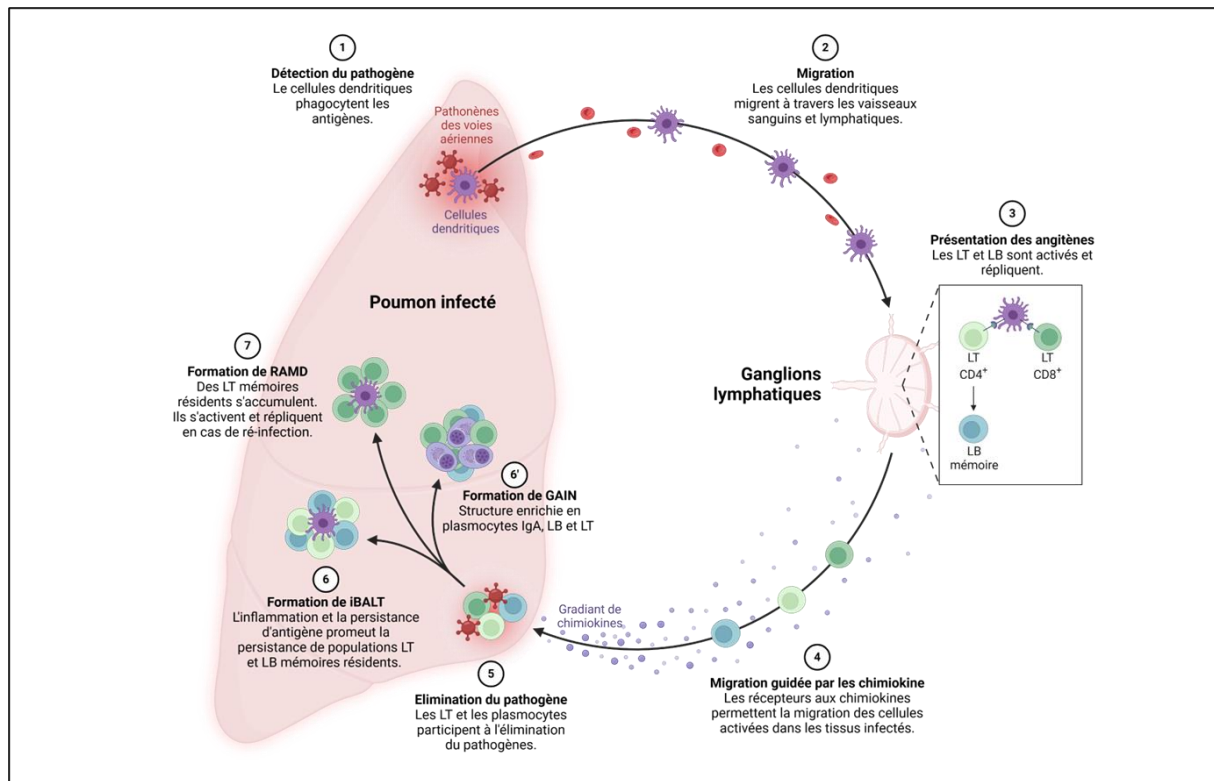


Figure 8 : Formation des cellules immunitaires résidentes dans les poumons et des compartiments immunitaires associés. Lors d'une infection, les pathogènes des voies aériennes sont capturés par les cellules dendritiques (DC) qui digèrent les peptides antigéniques et les charges dans leur CMH (1). Les DC migrent vers les ganglions lymphatiques (2) où elles présentent les antigènes aux lymphocytes T (LT) CD4⁺ et CD8⁺, activant une réponse adaptative spécifique du pathogène (3). Un gradient de chimiokines guide les lymphocytes activés de retour vers les poumons infectés, facilitant leur infiltration dans le tissu pulmonaire (4). Les lymphocytes infiltrés contribuent à l'élimination du pathogène et endiguent l'infection pulmonaire (5). La persistance de l'inflammation et des antigènes dans les poumons favorise la formation d'agrégats lymphoïdes, tels que les iBALT (induced Bronchus-Associated Lymphoid Tissue), qui hébergent des populations de LT et LB mémoires résidentes (6) ou de GAIN (gland-associated immune niche) enrichi en plasmocytes IgA (6'). Lors de réinfections, les lymphocytes mémoires résidents dans les RAMD (repair associated memory depot) se réactivent rapidement, assurant une réponse immunitaire rapide et efficace, tout en maintenant une protection à long terme contre les pathogènes (7).

Une fois encore, l'étude pionnière menée par Madisson et al.⁷⁸, sur les compartiments pulmonaires offre une nouvelle cartographie multi-omique de la structure du poumon humain, identifiant 80 types cellulaires distincts grâce à l'intégration de techniques de scRNAseq, de transcriptomique spatiale et de séquençage VDJ. Cette recherche met en lumière un nouveau compartiment immunitaire associé aux glandes de l'appareil respiratoire, désigné sous le nom de GAIN (*gland-associated immune niche*). La découverte de GAIN, riche en plasmocytes IgA ainsi qu'en LB et LT localisés dans les glandes sous muqueuses des voies respiratoires, suggère une voie inédite pour l'induction et la régulation des réponses

INTRODUCTION

immunitaires locales. Des interactions cellulaires essentielles au sein du GAIN sont médiées par les chimiokines CCL28 et CCL20, ainsi que par les facteurs de survie des LB tels que APRIL et IL-6, ou encore par la présentation d'antigènes aux LT CD4⁺ via les CMH II, initiant des réponses T spécifiques de l'antigène.

En ce qui concerne les cellules non résidentes, lors d'une inflammation consécutive d'une agression telle qu'une infection, un recrutement de cellules circulantes est nécessaire pour la mise en place d'une réponse efficace. La mobilisation, l'activation et le franchissement par diapédèse de l'endothélium par des cellules immunitaires circulantes sont des étapes finement régulées. Les ECs y jouent un rôle déterminant en particulier dans les tissus respiratoires. Dans les contextes inflammatoires, les ECs expriment des molécules d'adhésion et des chimiokines qui attirent les cellules immunitaires vers les sites infectés ou lésés.

LE RECRUTEMENT DES CELLULES IMMUNITAIRES

La diapédèse leucocytaire se produit généralement selon un processus conservé, décrit par Butcher¹³⁶ et Springer¹³⁷ dans les années 1990. La cascade classique du recrutement leucocytaire comprend les étapes de capture, roulement, arrêt, adhésion et migration transendothéliale (diapédèse). Elle dépend d'une activation des ECs en deux temps, à la fois rapide (s'effectuant en quelques minutes) et lent (s'étalant sur plusieurs heures). L'activation rapide est caractérisée par son indépendance vis à vis de la transcription de nouveaux gènes, tandis que l'activation lente implique une expression génique¹³⁸. L'activation des ECs peut être induite par des cytokines telles que l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF, mais aussi par des motifs moléculaires associés à des agents pathogènes, tels que le LPS^{139,140}. Les stimuli principaux, comme l'histamine et les cytokines pro-inflammatoires proviennent des cellules sentinelles immunitaires qui patrouillent dans les tissus. Les ECs au repos demeurent inactives vis-à-vis des leucocytes tout en produisant des protéines, telles que la P-sélectine et des chimiokines qu'elles stockent dans des vésicules spécialisées appelées corps de Weibel-Palade et qui soutiendront la phase d'activation rapide¹⁴¹. Le recrutement des leucocytes démarre par une augmentation de leurs capacités d'interactions bidirectionnelles avec les ECs activées pour conduire à la phase d'adhésion, préalable à leur infiltration. L'activation des ECs implique ainsi une régulation positive de la P- et de la E-sélectine, des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 ainsi que la sécrétion de chimiokines¹⁴².

En condition physiologique globale

La cascade classique de recrutement des leucocytes a été principalement établie dans la microcirculation du muscle crémaster par microscopie intravitale¹⁴³. Dans les veinules post-capillaires affectées par l'inflammation, des modifications hémodynamiques entraînent une perturbation significative du flux sanguin, ce qui favorise l'interaction des leucocytes avec la paroi endothéliale. La diminution du débit sanguin accroît ainsi les probabilités que les leucocytes entrent en contact avec les ECs. L'adhésion des leucocytes à l'endothélium activé s'effectue via des interactions entre la L-selectine, qui est principalement exprimée par les leucocytes, et les ligands sialylés présents à la surface de l'endothélium¹⁴⁴. Ce processus est associé aux interactions de la glycoprotéine P-sélectine (PSGL1) avec les molécules P-sélectine et E-sélectine également exprimées par l'endothélium. Cet ensemble d'interactions favorise un attachement et un roulement des leucocytes le long de la paroi vasculaire, marquant la première étape du recrutement vers le site de l'inflammation¹⁴⁵. Les étapes du recrutement sont illustrées dans la figure 9 ci-dessous.

La deuxième phase du recrutement s'orchestre autour du processus d'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium activé. Cette étape est principalement médiée par les interactions entre la molécule de VCAM-1 présente à la surface des ECs et l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (également connue sous le nom de VLA-4), ainsi que de ICAM-1 et les intégrines $\beta 2$, notamment l'antigène 1 associé à la fonction leucocytaire (LFA-1), exprimés sur la membrane des leucocytes. La dynamique du cytosquelette joue également un rôle clé dans ces interactions bidirectionnelles entre l'endothélium et les leucocytes. Le remodelage des ECs activées facilite l'attachement des leucocytes par la formation d'une structure d'ancrage enrichie en actine, qui concentre les molécules VCAM-1 et ICAM-1¹⁴⁶. Les intégrines et les filaments d'actine interagissent grâce à des protéines adaptatrices variées, telles que la taline, qui pourraient produire des échafaudages moléculaires favorables à la génération de phosphatidylinositide-4,5-bisphosphate (PIP2) au sein de la membrane plasmique et à la polymérisation de l'actine. L'adhésion médiée par les intégrines est accentuée par l'engagement des récepteurs associés aux protéines G, tels que CXCR4 et le facteur dérivé des cellules stromales 1 α (SDF1 α), fixées sur les glycosaminoglycanes (GAG)¹⁴⁷. Toutes ces modifications entraînent un arrêt du roulement du leucocyte sur l'endothélium et permettent

INTRODUCTION

un point d'ancrage solide à l'origine de la dernière étape du recrutement qui consiste en l'extravasation de la cellule immunitaire vers le tissu ou l'organe cible.

Durant le processus de diapédèse, dernière étape du recrutement, les leucocytes peuvent traverser la paroi vasculaire en empruntant soit les espaces intercellulaires entre les ECs (paracellulaire), soit en franchissant directement la membrane d'une EC et en passant au travers de son cytoplasme (transcellulaire)¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Bien que la migration transcellulaire ait été observée dans des contextes spécifiques, tels que l'inflammation au niveau de la barrière hémato-encéphalique et de la barrière hémato-rétinienne¹⁵², la diapédèse paracellulaire semble le mécanisme de transmigration le plus couramment utilisé^{150,151}. La migration paracellulaire implique une modification transitoire des jonctions entre les ECs pour permettre le passage du leucocyte. L'ouverture de la jonction provient de la dissociation de la protéine VE-PTP et de la VE-cadhérine. Ce processus est déclenché par l'interaction entre ICAM-1 et LFA-1¹⁵³ qui entraîne la phosphorylation de la VE-cadhérine, ensuite internalisée et souvent dégradée¹⁵⁴. L'interaction de LFA-1 avec ICAM-1 s'accompagne de l'engagement des intégrines leucocytaires avec des molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM) exprimées par les ECs¹⁵⁵, ce qui facilite la migration transendothéliale. D'autres signaux sont requis, notamment ceux induits par la contrainte de cisaillement, ainsi que l'expression de chimiokines à la surface de l'endothélium¹⁴⁷.

La prédominance du mode de migration paracellulaire a été confirmée *in vivo* par des études d'imagerie intravitale confocale en temps réel sur des veinules musculaires de souris au cours d'inflammation¹⁵⁶, ainsi que par des observations indirectes chez un modèle murin transgénique pour la protéine VE-cadhérine. Dans ce dernier modèle, il a été observé une réduction significative du recrutement de leucocytes chez des souris porteuses d'une protéine de fusion VE-cadhérine- α -caténine non dissociable, entraînant une incapacité à ouvrir les jonctions adhérentes¹⁵⁷. En général, il semble que la balance entre les deux modes de migration, transcellulaire et paracellulaire, soit influencée par divers facteurs, tels que la localisation anatomique, les conditions hémodynamiques locales et le type de leucocytes impliqués¹⁵⁸. De plus, l'imagerie en microscopie confocale de la diapédèse *in vitro* a révélé que seulement 5 à 11 % des neutrophiles, monocytes et lymphocytes migrent à travers les monocouches cellulaires endothéliales de cordon ombilical humain (HUVECs) par la voie

INTRODUCTION

transcellulaire¹⁵⁹. En revanche, l'utilisation de cellules endothéliales microvasculaires dans ces essais a augmenté jusqu'à 30 % le pourcentage de leucocytes migrant en transcellulaire¹⁶⁰.

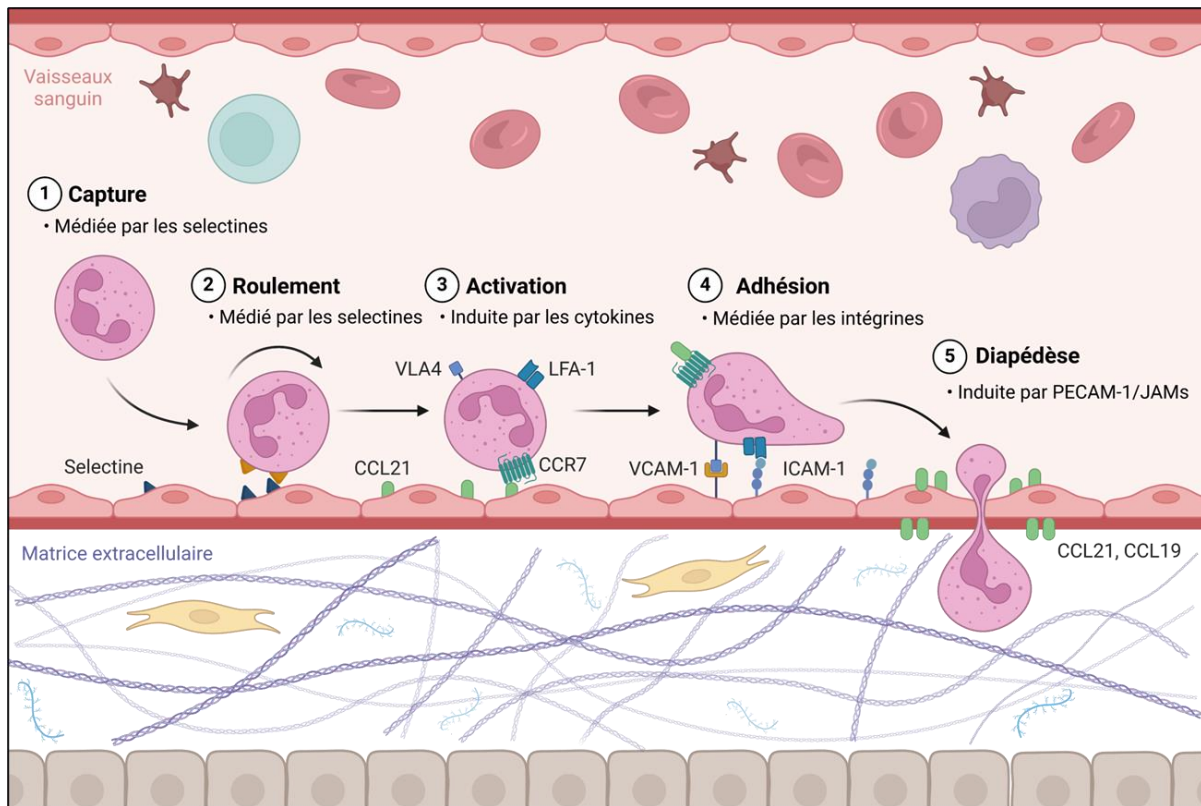


Figure 9 : Recrutement des leucocytes. Le processus comprend cinq étapes. Il commence par la capture des leucocytes circulants au niveau des parois du vaisseau sanguin. Cette capture est induite par les sélectines localisées en surface des EC ce qui permet aux leucocytes de s'attacher à l'endothélium (1). Le leucocyte roule le long de la paroi vasculaire en étant ralenti par les interactions sélectine-ligand (2). Durant le roulement, les leucocytes sont exposés à des cytokines et chimiokines qui activent l'expression des intégrines LFA-1 et VLA4 via une signalisation pouvant impliquer CCR7 (3). Les intégrines activées se lient fermement aux molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 présentes sur l'endothélium et produisent l'arrêt du roulement (4). Dans la dernière étape appelée diapédèse, les leucocytes traversent l'endothélium en déplaçant les jonctions intercellulaires ce qui mobilise des protéines telles que PECAM1/CD31 et des JAMs, et grâce au gradient des chimiokines telles que CCL21 et CCL19 (5). Ce mécanisme séquentiel permet aux leucocytes de quitter la circulation sanguine et de migrer vers les tissus où leur action est requise.

Il semblerait que le processus de transmigration cellulaire puisse varier selon les sites de recrutement. A titre d'exemple, dans la plupart des organes, les ECs doivent être stimulées pour exprimer la E-sélectine¹⁶¹. Pourtant, à la surface des tissus hématopoïétiques veinulaires, tels que la rate, la moelle osseuse et la peau, la E-sélectine est exprimée de manière constitutive¹⁶²⁻¹⁶⁴ ce qui augmente leur capacité de recrutement. Cet exemple de variabilités d'expressions met en évidence des mécanismes de recrutement des cellules immunitaires qui peuvent différer selon l'organe^{165,166}. Le recrutement varie également selon le contexte pathologique comme dans le cas du cancer ou le contexte inflammatoire endothéliale unique influence ce processus. Cette particularité sera abordée dans le chapitre 3 dans la partie dédiée aux ECs tumorales.

Recrutement immunitaire dans l'environnement pulmonaire

Comme mentionné ci-dessus, les ECs sont la principale porte d'entrée des cellules immunitaires du sang vers les tissus. Les cellules immunitaires sont étroitement associées au système vasculaire et sont abondantes dans les poumons. En effet, les PAECs ont une forte expression constitutive de molécules d'adhésion qui permettent l'interaction avec les lymphocytes et les monocytes qui migrent dans la circulation sanguine. La présence basale de ces marqueurs peut contribuer à l'important pool intravasculaire de leucocytes dans les poumons. La concentration de neutrophiles dans le sang capillaire est décrite comme 20 à 60 fois plus élevée que dans les grands vaisseaux systémiques. Cela permet un recrutement rapide et la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace lors d'une attaque bactérienne ou virale.

Il est intéressant de noter que le recrutement des neutrophiles dans le lit capillaire pulmonaire n'est pas uniquement médié par l'adhésion à la sélectine mais par des changements dans la forme des neutrophiles⁹⁰. En effet l'implication des sélectines et des intégrines dépend du stimulus inflammatoire¹⁶⁶. Chez les cellules traitées au LPS d'*Escherichia coli*, les neutrophiles sont recrutés de manière dépendante des sélectines et des intégrines¹⁶⁷. En revanche, le recrutement des neutrophiles chez les souris après l'administration intratrachéale de LPS préparés à partir de *Streptococcus pneumoniae* ou de *Salmonella enteritidis* est décrit comme indépendant de la sélectine¹⁶⁸.

Il existe une variabilité notable dans les modalités de recrutement des leucocytes au sein de l'hétérogénéité des ECs pulmonaires. Les ECs microvasculaires se distinguent par leur capacité à produire des cytokines inflammatoires telles que la CCL4 et la CXCL2. Ces protéines jouent un rôle clé en tant que facteurs chimiotactiques, facilitant le recrutement des neutrophiles dans les espaces alvéolaires en réponse à l'inflammation ou à l'infection¹⁶⁹.

La microarchitecture unique du tissu pulmonaire influence également le processus de recrutement. Il a été constaté que le processus de margination des leucocytes qui correspond à la première phase d'adhésion est moins marquée dans les capillaires bronchiques que dans ceux des poumons, ce qui pourrait être attribué au large diamètre des capillaires bronchiques et/ou à une pression sanguine plus élevée dans cette zone¹⁷⁰. A l'inverse, le flux sanguin dans le réseau capillaire pulmonaire se caractérise par une vitesse relativement faible¹⁷¹. L'influx

INTRODUCTION

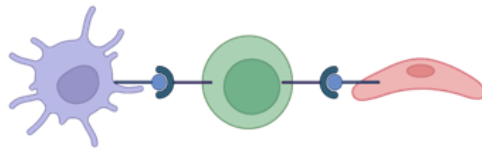
cellulaire induit par le gradient de chimiokines, incluant les monocytes et les lymphocytes, active également des mécanismes de signalisation dépendants du contact avec les ECs, pouvant moduler les réponses immunitaires innées et adaptatives.

LE RÔLE DES CELLULES ENDOTHELIALES DANS L'ACTIVATION/INHIBITION DU SI

Depuis plusieurs années, de nombreuses études confirment que les ECs jouent un rôle immunomodulateur complexe bien au-delà de leur fonction classique dans l'allo-immunité, le recrutement des cellules immunitaires, la tolérance immunitaire et l'inflammation vasculaire^{138,172,173}. Différents sous-types d'ECs ont ainsi été identifiés comme exerçant ces fonctions immunomodulatrices dans des tissus et organes divers. Par exemple, les ECs sinusoidales hépatiques (LSEC) présentent des activités immunomodulatrices constitutives¹⁷⁴, tandis que d'autres types de ECs montrent des phénotypes immunomodulateurs transitoires, induits par des conditions environnementales spécifiques.

Certaines ECs possèdent des caractéristiques typiques des cellules immunitaires, telles que l'expression de récepteurs co-stimulateurs et co-inhibiteurs¹²³. Elles ont aussi la capacité d'induire l'apoptose dans d'autres cellules¹⁷⁵. Les ECs agissent également comme des APC semi professionnelles, jouant un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire^{123,175-177}. Elles disposent en effet de capacités phagocytaires, éliminant les déchets cellulaires circulants par efferocytose et de capacités de traitement et de présentation des antigènes¹⁷⁸. Elles expriment une gamme significative de molécules costimulatrices (par exemple, ICAM-1, VCAM-1, CD40, LFA-3, ICOSL, 4-1BB, OX40L) et co-inhibitrices (PD-L1 et PD-L2) (Tableau 1).

Les EC humaines en culture peuvent activer des LT mémoires à l'aide de certaines molécules de costimulation qu'elles partagent avec les CPA dont les récepteurs sont exprimés plus fortement sur les LT mémoires que sur les LT naïfs¹⁷⁹. Les ECs réagissent activement aux médiateurs inflammatoires, tels que l'IL-35¹⁸⁰ et l'IL-17A¹⁸¹, en augmentant l'expression de molécules d'adhésion à leur surface. Cette réponse inclut la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines attirant les cellules immunitaires¹⁸²⁻¹⁸⁴.



	Cellule dendritique	Lymphocyte T	Cellule endothéliale	
Adhésion cellulaire	ICAM1	LFA1	ICAM1	
	ICAM1		ICAM1	
	ICAM2	VLA4	ICAM2	
	LFA3	CD2	LFA3	
	DC-SIGN	ICAM3		
	CD40L	CD40	CD40L	
	CMH-I	TCR	CMH-I	
	CMH-II		CMH-II	
	Co-activation	CD80	CD28	
		CD86	CTLA-4	
ICOSL		ICOS	ICOSL	
GITRL		GITR	GITRL	
TL-1A		DR3	TL-1A	
4-1BBL		4-1BB	4-1BBL	
OX40L		OX40	OX40L	
PD-L1		PD-1	PD-L1	
B7-H3		?	B7-H3	
B7-H4		?	B7-H4	
Co-inhibition	NP-1	NP-1	NP-1	

Tableau 1 | Comparaison des signaux immunitaires partagés par les DC et les ECs

La molécule de co-inhibition PD-L1, présente à l'état d'équilibre, voit son expression fortement augmentée en présence d'inflammation, jouant un rôle non seulement dans la régulation immunitaire mais aussi dans l'activation de l'endothélium et la perméabilité aux leucocytes¹⁸⁵.

La littérature mentionne néanmoins des différences notables entre espèces en ce qui concerne les fonctions immunomodulatrices des ECs. Chez l'homme, les ECs microvasculaires expriment constitutivement le HLA de classe II, ce qui leur permet de présenter des antigènes aux LT CD8 et CD4^{123,186}. Chez la souris, cette expression est observée uniquement en conditions inflammatoires¹⁸⁷.

L'expression des molécules de co-stimulation, telles que CD80 et CD86, diffère également entre les espèces. Elles sont ainsi exprimées de manière dépendante du contexte chez la souris¹⁸⁸ et rarement observées chez l'homme, même si elles peuvent être induites *in vitro*¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Par contre, chez l'homme, la molécule de costimulation CD58 (LFA-3), qui interagit avec CD2 sur les LT, joue un rôle essentiel dans l'activation des LT mémoires, avec une affinité beaucoup plus élevée que celle observée chez la souris¹²³. Il est important de relever que l'activation des ECs peut favoriser la maturation des LT CD8⁺ mémoires en LT cytotoxiques spécifiques des cibles endothéliales¹⁹², ainsi que la différenciation des Th17 en réponse à la production d'IL-6 par les ECs¹⁹³.

INTRODUCTION

L'amplification du sous-ensemble Th1 par les ECs a été observée à la fois *in vitro* et *in vivo*, dans des modèles d'allogreffe vasculaire^{194,195}, tandis que la cascade du complément, via l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la production d'IL-18, contribue à l'activation des lymphocytes T médiée par les ECs¹⁹⁶. Au cours de la diapédèse, l'engagement de l'intégrine LFA-1 sur les LT va stabiliser les transcrits des gènes pro-inflammatoires, impliquant un double rôle pour ces molécules dans l'activation et l'adhésion des LT¹⁹⁷. Il est également décrit que ICAM-1 participe à la formation d'une synapse immunologique¹⁹⁸ entre EC et LT bien que l'on ne sache pas encore si ce processus peut avoir lieu au cours de la migration .

Concernant maintenant les poumons plus spécifiquement, et comme abordé précédemment, les ECs alvéolaires sont impliquées dans les réponses du système immunitaire. Les aérocytes sont spécialisés dans les échanges gazeux et le recrutement des cellules immunitaires, tandis que les gCap peuvent activer les LT CD4⁺ par le biais du CMH-II. Cela suggère que ces ECs alvéolaires ont des fonctions spécifiques qui pourraient influencer la réponse immunitaire. Une question qui demeure est de savoir si l'interaction entre les ECs et les cellules immunitaires est suffisamment longue lors du recrutement pour permettre une immunomodulation par les ECs. Dans les poumons, l'extravasation se produit principalement au niveau des capillaires et des veinules post-capillaires, où le débit sanguin plus lent prolonge le temps d'interaction avec les ECs, ce qui pourrait favoriser cette modulation.

Il est connu que les ECs, dans leur communication avec les macrophages, exercent une influence sur leur activation et leur polarisation pro-inflammatoire (M1) ou anti-inflammatoire (M2). Cet état de polarisation des macrophages a un impact significatif sur la réponse inflammatoire et les processus de réparation tissulaire et fait des ECs de nouveaux acteurs clés de cette réponse. Dans leur étude déjà mentionnée précédemment, Zhou et al. ont démontré que la réponse angiocrine induite par la Rspodin3, sécrétée par les ECs après stimulation par du LPS, conduisait à une expansion des macrophages interstitiels⁷¹.

Ces macrophages, par leur action anti-inflammatoire, contribuent à la protection des tissus. À l'inverse, certaines cytokines produites par les ECs pulmonaires peuvent induire une transition vers un phénotype pro-inflammatoire des macrophages, comme SPARCL1, qui exacerbe la pneumonie virale en activant ces derniers¹⁹⁹. De plus, la protéine Jagged1 (Jag1) exprimée par les ECs a été identifiée comme un régulateur clé de la polarisation des

INTRODUCTION

macrophages, prévenant les lésions pulmonaires induites par les radiations via la signalisation Notch²⁰⁰.

Les ECs régulent également les macrophages alvéolaires par le biais d'exosomes dérivés de l'endothélium en influençant les réponses immunitaires par la signalisation calcique médiée par RGS1²⁰¹. Ainsi, dans le contexte pulmonaire, il est difficile de statuer sur le rôle précis des ECs dans l'activation ou la tolérance immunitaire, car elles participent à ces deux processus. Les cellules immunitaires pulmonaires interagissent avec les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules vasculaires pour réguler l'inflammation et maintenir l'homéostasie locale.

L'interaction étroite entre les diverses composantes du système immunitaire pulmonaire assure une réponse coordonnée et efficace face aux agressions et aux pathogènes tout en préservant la tolérance immunitaire et en limitant les dommages tissulaires. Cependant il arrive que ce contrôle soit défaillant et entraîne ou accentue le développement de pathologie.

SYSTEME IMMUNITAIRE PULMONAIRE ET DEVELOPPEMENT DE PATHOLOGIES

Les dysfonctionnements du système immunitaire pulmonaire sont en cause dans l'apparition et la progression de diverses pathologies. Par exemple, une réponse immunitaire disproportionnée peut déclencher une inflammation excessive, contribuant ainsi à des affections telles que l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la fibrose pulmonaire²⁰². Dans le contexte de maladies auto-immunes comme la sarcoïdose, le système immunitaire pulmonaire attaque de manière erronée les tissus pulmonaires, ce qui entraîne inflammation et lésions²⁰³.

Par ailleurs, l'immunosuppression ou une déficience immunitaire peuvent accroître le risque d'infections respiratoires sévères, en particulier chez les personnes vivant avec le VIH²⁰⁴. Le système immunitaire pulmonaire est également impliqué dans les réponses exacerbées associées au syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) et à d'autres maladies pulmonaires graves⁷³.

INTRODUCTION

L'inflammation, qu'elle soit aiguë ou chronique, est influencée par divers facteurs tels que la durée et l'intensité des agressions, l'âge, ou la présence de pathologies comme l'obésité. L'inflammation chronique qui se caractérise par une activation persistante des cellules immunitaires et la libération de cytokines inflammatoires et d'autres médiateurs est connue pour favoriser la progression tumorale et la survie des cellules malignes²⁰⁵. En outre, des états inflammatoires chroniques, comme la BPCO, constituent un risque accru de développer un cancer du poumon. Une meilleure compréhension des rôles délétères que l'inflammation exerce sur la pathogénèse dans les cancers pulmonaires est devenue une priorité dans les recherches actuelles de stratégies thérapeutiques.

CANCERS PULMONAIRES

Le cancer des poumons est la première cause de décès par cancer en France et dans le monde avec environ 1,8 million de décès par an et représente le cancer avec la plus haute incidence. En effet, presque 2,5 million de nouveaux cas ont été dépistés en 2023 au niveau mondial (Globocan.fr) et figure 10. La faible survie globale des patients serait due à un diagnostic tardif de la maladie influencé par l'apparition tardive de symptômes. En effet, les stades I-II représentent seulement 25% des cas au diagnostic, les stades III concernent 20% des patients et 55% des cas sont détectés au stade IV ou au stade métastatique.

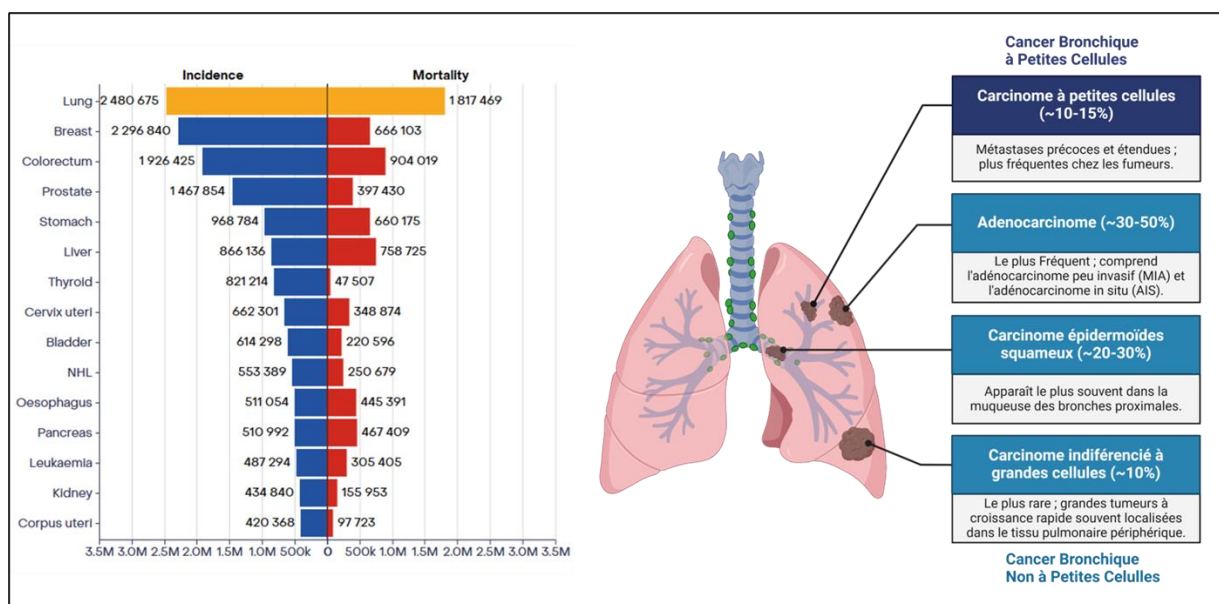


Figure 10 : Classification, mortalité et incidence du cancer des poumons. Histogramme de l'incidence et de la mortalité de plusieurs cancers dans le monde venant de Globocan.fr. Schéma représentant les grandes familles histologiques du cancer bronchopulmonaire et leurs sous classes réalisé avec Biorender.

Le cancer des poumons, aussi nommé cancer bronchopulmonaire, est divisé en deux grandes familles histologiques : le cancer bronchique à petites cellules (CBPC) et le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC). Le CBPC concerne 15% des cancers du poumon et constitue la forme la plus agressive de ce cancer. Cette agressivité lui est attribuée par sa capacité à métastaser rapidement durant le processus d'oncogénèse avec 70% des patients CBPC présentant des métastases au moment du diagnostic²⁰⁶. Le CBNPC est le type histologique le plus représenté, avec 80 à 85 % des cas. En suivant la classification, il est possible de distinguer, au sein des CBNPC, les carcinomes épidermoïdes (20-30%) et les carcinomes non épidermoïdes regroupant les adénocarcinomes (30-50%) et les carcinomes indifférenciés à grandes cellules (10%).

INTRODUCTION

Les carcinomes épidermoïdes se développent dans la région centrale du poumon tandis que les adénocarcinomes par exemple vont se développer en périphérie de l'organe. Quand le diagnostic d'un CBNPC est établi, la recherche des six altérations moléculaires pour lesquelles il existe des thérapies ciblées est réalisée. Elle concerne les mutations oncogéniques « drivers » aussi dites pilotes retrouvées dans les gènes *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor), *KRAS*, *BRAF* (B-Raf proto-oncogene), *HER2* ainsi que les altérations caractérisées des gènes *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) et *ROS1* que nous détaillerons par la suite. Aujourd'hui, avec les traitements à base d'immunothérapie, le statut de PD-L1 doit aussi être évalué pour adapter les traitements aux patients.

Notre équipe de recherche étudie les cancers thoraciques comprenant le MPM et les cancers bronchopulmonaires avec, au vu de son incidence, un regard particulier pour le CBNPC. Au cours de ma thèse, je me suis donc concentrée sur ce modèle du CBNPC et le chapitre 2 de cette introduction lui sera intégralement consacré.

ORIGINE DU DEVELOPPEMENT DES CANCERS PULMONAIRES

Le développement du cancer se caractérise par l'apparition et le maintien de cellules malignes présentant des caractères anormaux. La transformation cellulaire tumorale se traduit par une perte du contrôle du cycle cellulaire et donc une capacité de prolifération incontrôlée et anarchique mais aussi une insensibilité à l'apoptose et des anomalies de réparation à l'ADN. Durant ce processus de carcinogenèse, ces cellules cancéreuses vont acquérir plusieurs propriétés communes qui ont été regroupées pour la première fois en 2000 par Hanahan et Weinberg sous le terme de « Hallmarks of cancer »²⁰⁷. L'échappement à la surveillance immunitaire est une caractéristique récemment intégrée à cette liste. Cet échappement confirme toute l'importance qu'il y a à accorder aux rôles du microenvironnement dans l'initiation et la progression tumorale. Aujourd'hui, la dernière actualisation de la liste des « Hallmarks »²⁰⁷ en dénombre 14 avec l'ajout de certains facteurs comme la reprogrammation épigénétique ou encore la nature du microbiote (Figure 11).

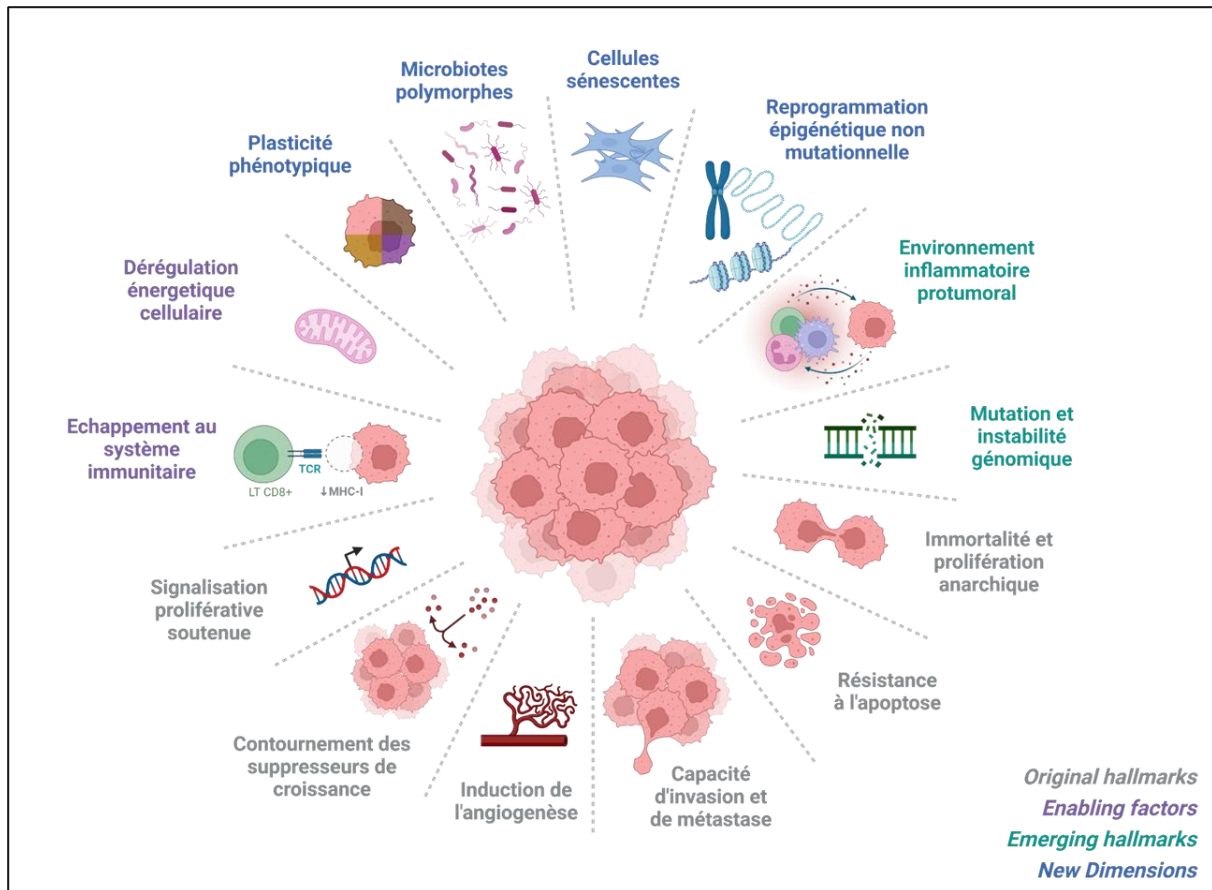


Figure 11 : Hallmarks of Cancer. Adapté de Hanahan et al, ²⁰⁷. Les Hallmarks décrivent les caractéristiques fondamentales et émergentes des cellules tumorales, ainsi que les facteurs facilitant leur progression. Chaque caractéristique présentée a été intégrée au fil des années dans la convention « Hallmarks of Cancer ». Les changements de couleur sur le schéma indiquent l'évolution de ces concepts, illustrant l'historique de leur identification dans le cadre de la recherche sur le cancer.

Le cancer est défini comme une pathologie multigénique et multifactorielle dont les facteurs de risques regroupent la susceptibilité héréditaire, la présence d'un état morbide préexistant, l'apparition de mutations spontanées avec gains de fonction ou pertes de gènes suppresseurs de tumeurs et en dernier les facteurs environnementaux. Des analyses de séquences à haut débit ont mis en évidence que le nombre de mutations somatiques varie selon les cancers. Ainsi, le mélanome et le cancer du poumon sont des cancers avec un nombre élevé de mutations (dépassant les 100 mutations par mégabase)²⁰⁸, tandis que les cancers pédiatriques présentent une fréquence mutationnelle beaucoup plus faible (environ 0,1 mutation/Mb, soit un changement sur l'exome). De plus, une grande majorité des facteurs favorisant l'apparition des cancers pulmonaires est d'origine environnementale en raison de l'exposition quasi directe du poumon avec l'air environnant.

INTRODUCTION

LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Le tabac est le premier facteur de risque du cancer des poumons avec plus de 9500 éléments chimiques et plus de 80 carcinogènes énumérés dans le tabac et sa fumée²⁰⁹. Une étude réalisée entre 2007 et 2020 sur une cohorte de 2052 patients atteints de CBNPC venant de plusieurs centres européens a montré que la quantité de tabac ainsi que la durée du tabagisme étaient associées à des risques accrus de décès et ce de manière dose dépendante (hazard ratio, HR = 1.31 (1.01–1.71) pour plus de 40 paquets/années)²¹⁰. Tous sous-types histologiques confondus, le cancer des poumons a une incidence plus forte dans les pays aux revenus élevés reflétant le niveau relatif de la consommation de tabac. Les expositions professionnelles, le tabagisme passif et la pollution sont les autres facteurs de risques environnementaux les plus cités. Parmi les expositions professionnelles, on trouve l'inhalation de particules toxiques ou irritantes comme la poussière générée lors de la transformation du bois²¹¹ ou la fumée de combustibles non transformés comme le charbon qui contient une quantité élevée de carcinogènes.

Les particules toxiques les plus connues favorisant l'incidence des cancers pulmonaires sont l'amiante²¹², la silice²¹³ ou le radon²¹⁴. De nombreuses études épidémiologiques ont par ailleurs confirmé l'impact de la pollution sur l'incidence des cancers bronchiques, notamment en lien avec la présence de particules fines qui sont associées à un taux de mortalité accru. L'élément commun aux facteurs environnementaux les plus fréquemment incriminés est la capacité des particules inhalées (poussières et particules, amiante,...) à induire une inflammation chronique. D'ailleurs une étude pionnière de 2023 suggère que les particules fines pourraient induire une inflammation pulmonaire par l'intermédiaire du recrutement important de macrophages producteur d'IL1- β , favorisant le développement des cellules mutées EGFR préexistantes²¹⁵. Enfin, il est intéressant de relever que le cancer des poumons touche plus fréquemment les hommes que les femmes. Cependant au cours des 50 dernières années, l'incidence augmente chez les femmes ce qui pourrait être corrélé avec leur accès accru à la consommation de tabac²¹⁶.

INTRODUCTION

LES FACTEURS GENETIQUES ET SUSCEPTIBILITES HEREDITAIRES

Le cancer des poumons fait partie des cancers présentant un nombre important de mutations « drivers » jouant un rôle direct dans le développement et la progression tumorale²¹⁷. Ces altérations qui peuvent être des amplifications ou réarrangements chromosomiques, des mutations somatiques ou encore des instabilités des microsatellites, vont apporter un avantage sélectif aux cellules cancéreuses. Elles favorisent généralement la prolifération comme c'est le cas pour les mutations de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *TP53* (tumor protein p53) ou *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) retrouvés dans de nombreux types de cancers²¹⁸. Dans les cancers pulmonaires, le séquençage du génome entier a permis d'identifier différentes mutations des gènes *EGFR*, *MAPK* (MAP kinase), *ALK*, *EML4/ALK* (Echinoderm microtubule-like 4), *BRAF*, et *ROS1*. Ces altérations génomiques ne sont pas retrouvées systématiquement chez les patients et sont en partie responsables de l'hétérogénéité des réponses aux traitements. Au sein de ces mutations, les plus majoritairement retrouvées sont celles du gène *KRAS* (20-40%) suivi par les altérations du gène *EGFR* (15%) (Figure 12).

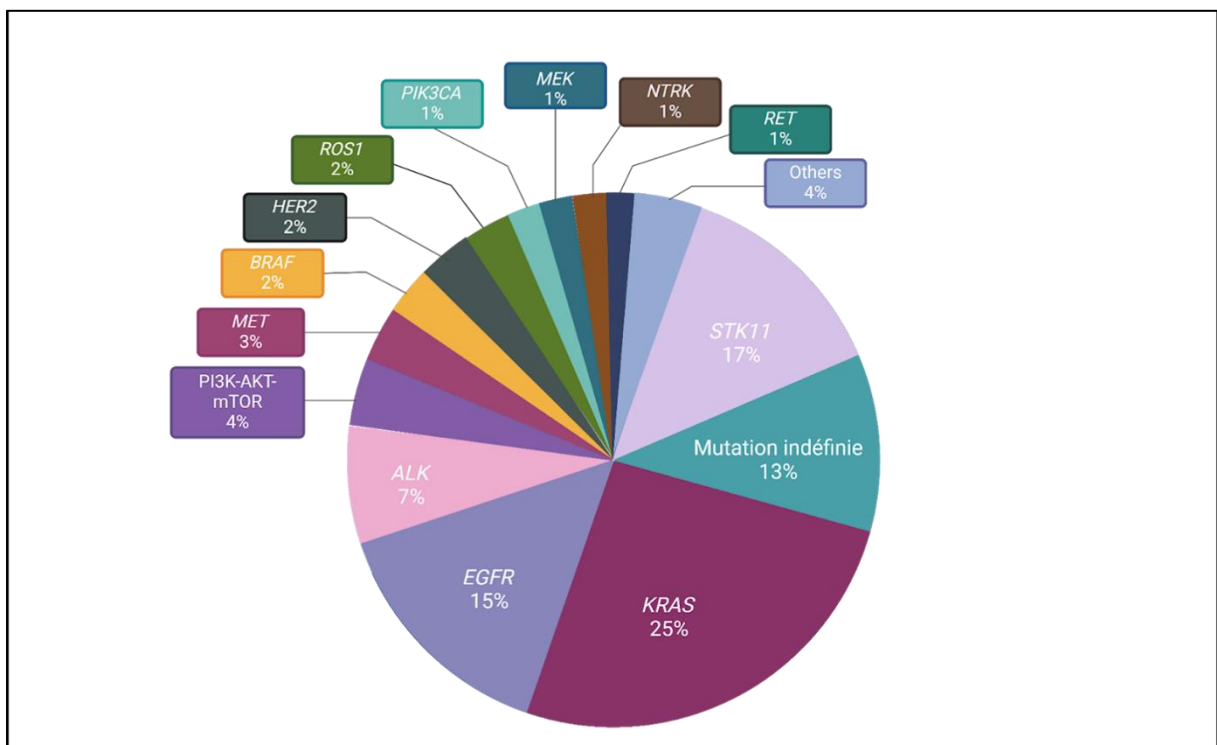


Figure 12: Classification génomique des CBNPC. Adapté de Bourreau et al,²¹⁹. Diagramme rapportant l'incidence des mutations génétiques spécifiques dans le CBNPC. Parmi elles, les mutations *KRAS*, *STK11*, *EGFR* et *ALK* ont une prévalence plus élevée (>5%).

INTRODUCTION

Durant ma thèse, j'ai pu étudier plusieurs lignées de cancer pulmonaire caractérisées par la diversité de leurs mutations. Parmi celles-ci, j'ai particulièrement étudié une lignée présentant une mutation dans *KRAS*, une autre avec une mutation *BRAF* et une dernière avec une mutation *EGFR*. Seules ces mutations seront détaillées dans cette introduction.

Le gène ***KRAS*** fait partie de la famille des gènes *RAS* (sarcome du Rat) qui codent pour de petites protéines G impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire. Ces petites GTPases agissent dans les voies de signalisation en aval des récepteurs EGFR, MET et ALK²²⁰ et en amont de la voie de signalisation des MAPK. Les mutations oncogènes du gène *KRAS* se produisent surtout dans l'exon 2 au codon 12, moins souvent au codon 13 (3-5%) et rarement dans l'exon 3 au codon 61 (<1%)²²¹. Ces mutations aboutissent le plus souvent à une activation constitutive de la petite GTPase²²². La dérégulation des voies dépendantes de *KRAS* est observée dans 25% des cas de CBNPC et concerne des substitutions de la glycine du codon 12 en Cystéine, en Valine ou en Asparagine. La mutation *KRAS* G12C est la plus fréquente (39,4% des adénocarcinomes²²⁰) et est associée au statut de fumeur ou d'ancien fumeur du patient tandis que la mutation *KRAS* G12D est principalement retrouvée chez les non-fumeurs²²³.

Les mutations touchant au gène ***BRAF*** concernent uniquement 1,5 à 5% des patients atteints de CBNPC²²⁴. Ce gène code pour une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille des kinases Raf impliquées dans la signalisation MAPK²²⁵. En conditions normales, la kinase codée par *BRAF* subit une boucle de rétrocontrôle négatif au cours de la cascade d'activation, ce qui limite sa fonction dans le temps. Dans des conditions avec *BRAF* muté, le rétrocontrôle ne se fait pas et la voie MAPK maintenue activée conduit à une prolifération cellulaire incontrôlée²²⁶. Les mutations *BRAF* V600E représentent 50 % de ces cas²²⁵.

L'***EGFR*** est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase de type I. Il est impliqué dans deux voies de signalisation, la voie MAPK et la voie PI3K/AKT/mTOR. Ce récepteur lie différents ligands dont le facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) et il permet des régulations fines de la croissance, survie, migration, différenciation cellulaire et de l'angiogenèse. Dans le CBNPC, les mutations de l'*EGFR* affectent le domaine catalytique tyrosine kinase induisant une activation constitutive qui est indépendante de la liaison au ligand. Cette activation constitutive amplifie les voies de signalisation activées en aval du récepteur^{227,228}. Les mutations du gène *EGFR* les plus couramment retrouvées chez les patients atteints de CBNPC (~85%) sont : la mutation ponctuelle remplaçant une leucine par

INTRODUCTION

une arginine dans l'exon 21 (L858R) et une délétion dans le cadre de l'exon 19 qui élimine les résidus 746-750 de la protéine²²⁹. Ces mutations se produisent dans 15% des CBNPC et principalement dans les populations de non-fumeurs, de sexe féminin et d'Asie de l'Est. La mutation de l'EGFR présente une fréquence élevée au sein de la population réunionnaise (22%), comparable à celle observée en Asie. Ce phénomène peut être attribué à l'histoire des migrations et au métissage ethnique sur l'île²³⁰.

Outre les mutations « drivers », il existe des facteurs de risques génétiques contribuant à une susceptibilité héréditaire. De nombreuses études montrent un risque significativement accru de cancer du poumon dans le cas d'antécédents familiaux, en particulier chez les patients dont les parents ont été diagnostiqués à un jeune âge et chez ceux avec plusieurs membres de la famille atteints. En effet, les personnes ayant un antécédent familial au premier degré (parent, fratrie) de cancer pulmonaire présentent 13,65 (IC à 95 % : 2,57 à 40,41) fois plus de risque de développer un cancer des poumons²³¹.

LES FACTEURS DE COMORBIDITES

Certains facteurs intrinsèques propres à l'individu peuvent contribuer à la promotion des cancers pulmonaires. Par exemple, et comme abordé dans le chapitre précédent, les maladies qui s'accompagnent d'une inflammation chronique favorisent la progression tumorale dans un environnement immunitaire affaibli. Il est estimé que l'inflammation chronique pourrait être responsable ou associée à ¼ des cas de cancers mondiaux²³². C'est le cas des maladies pulmonaires chroniques telles que la BPCO²³³ mais aussi la fibrose pulmonaire²³⁴ ou la tuberculose²³⁵ qui vont créer un environnement propice au développement de cancer que ce soit chez les fumeurs ou les non-fumeurs. Parmi les maladies inflammatoires pulmonaires, les résultats des études épidémiologiques sur l'asthme sont contradictoires bien qu'une étude récente indique qu'une exposition à long terme aux acariens associés à l'asthme pourrait accélérer le développement de cancer pulmonaire chez les hôtes sensibles²³⁶. De nombreux autres facteurs comme le diabète, l'obésité, les troubles cardiovasculaires et d'autres pathologies le plus souvent associées à un état inflammatoire chronique sont fréquemment décrits comme favorisant le développement et la progression du cancer.

INTRODUCTION

LES TRAITEMENTS ACTUELS

Malgré la diversification des options thérapeutiques développées ces dernières années, la prise en charge des patients atteints de cancer pulmonaire reste un défi pour les professionnels de la santé. En effet, au vu de l'hétérogénéité des cas, cette prise en charge nécessite une approche personnalisée en fonction du type et du sous-type de cancer, du profil génétique du patient, de la localisation et de l'étendue de la maladie. Pour les patients diagnostiqués précocement, à un stade allant de I à III, le traitement se fait principalement par exérèse totale (lobectomie) ou partielle (pneumectomie) parfois suivie d'une chimiothérapie adjuvante ou d'une radiothérapie complémentaire. En ce qui concerne les patients présentant un stade avancé de la maladie (stade IV ou métastatique), les traitements seront administrés en systémique en fonction des mutations du patient et d'éventuels effets secondaires observés.

CHIMIOThERAPIE ET RADIOThERAPIE

La chimiothérapie est un traitement systémique qui agit en interférant avec la division cellulaire des cellules à croissance rapide, ce qui est une caractéristique des cellules tumorales. La drogue administrée va induire des dommages à l'ADN des cellules en cours de réplication, bloquer leur multiplication et induire leur mort. La chimiothérapie néoadjuvante également appelée "chimiothérapie de réduction tumorale préopératoire" est un traitement réalisé avant une chirurgie, dans le but de réduire la taille de la tumeur et faciliter l'intervention chirurgicale. En revanche, la chimiothérapie adjuvante souvent qualifiée de "chimiothérapie postopératoire" est administrée après la chirurgie ou la radiothérapie pour éliminer les cellules cancéreuses résiduelles et consolider l'action thérapeutique en réduisant le risque de récurrence.

Le premier essai clinique ayant démontré de manière prospective les avantages d'une chimiothérapie adjuvante est l'étude IALT (International Adjuvant Lung Cancer Trial), menée en 2004. Cette étude a randomisé 1867 patients atteints de CBNPC n'ayant pas atteint le stade IV métastatique. Les participants ont reçu soit une chimiothérapie adjuvante à base de cisplatine et un autre agent, soit un traitement contrôle. Le suivi médian des patients a duré 56 mois et sept décès attribués à une toxicité ont été rapportés, représentant 0,8 % des cas. Les résultats ont montré une survie globale significativement améliorée dans le groupe ayant reçu la chimiothérapie adjuvante, avec un taux de survie de 44,5 % à cinq ans,

INTRODUCTION

comparativement à 40,4 % dans le groupe contrôle (HR 0,86 ; IC à 95 % [0,76-0,98] ; $p < 0,03$)²³⁷. Aujourd'hui, dans 80% des cas de CBNPC, il n'y a pas de mutation « drivers » et le traitement de première ligne s'appuie sur une chimiothérapie à base de sel de platine (Cisplatine, Pemetrexed, Paclitaxel...). Les recommandations d'administration actuelles sont de 4 à 6 cycles avant de passer sur un traitement d'entretien par pemetrexed et/ou bevacizumab jusqu'à progression de la maladie ou intolérance du traitement.

La radiothérapie (RT) s'appuie sur des rayonnements ionisants, tels que les rayons X ou les protons pour induire la mort ou contrôler la prolifération des cellules tumorales en produisant également des dommages à l'ADN. Les modalités de RT dans le cancer du poumon sont principalement des approches de radiothérapie stéréotaxique SBRT, permettant une irradiation de haute précision de la tumeur pour épargner au maximum les tissus sains voisins. Le mode d'administration de la radiothérapie peut être proposé en une ou quelques doses élevées par hypo-fractionnement (même dose totale mais moins de fractions et plus fortes) ou en doses fractionnées sur une période prolongée pour laisser le temps aux tissus sains de récupérer entre les séances²³⁸.

La radiothérapie est souvent combinée à de la chirurgie ou de la chimiothérapie et de l'immunothérapie à base d'ICI pour maximiser la réussite du traitement²³⁹. En effet, la radiothérapie peut induire une réponse immunitaire ciblée contre la tumeur, via l'infiltration tumorale des lymphocytes T CD8⁺, entraînant une réduction de la taille de la tumeur primaire ainsi que des métastases distales même en dehors de la zone irradiée. Ce phénomène est connu sous le terme d'effet abscopal²⁴⁰.

Malgré leurs effets thérapeutiques, la chimiothérapie et la radiothérapie sont sources d'effets secondaires préjudiciables à la qualité de vie des patients. En complément de ces traitements principaux, des thérapies ciblées qui offrent une approche plus précise en ciblant directement les altérations génétiques spécifiques des cellules cancéreuses sont aujourd'hui proposées.

INTRODUCTION

THERAPIES CIBLEES

L'introduction des thérapies ciblées dans les années 2000 a amélioré la survie des patients éligibles c'est-à-dire avec mutation « driver » caractérisée. Contrairement à la chimiothérapie conventionnelle, les thérapies ciblées sont adaptées au type d'anomalie responsable de la croissance et la survie des cellules cancéreuses. Actuellement, il existe des thérapies ciblant l'EGFR, BRAF, KRAS^{G12C}, ALK, RET, NTRK, MET et ROS-1. À titre d'exemple, en cas de présence de mutation dans *EGFR*, quatre molécules ont l'autorisation de mise sur le marché (AMM), avec en première ligne : géfitinib, erlotinib (première génération), afatinib (deuxième génération) et osimertinib (troisième génération). Le taux de survie sans progression tumorale à 12 mois des patients traités avec du géfitinib était de 24,9% par rapport à 6,7% dans le groupe traité au carboplatine-paclitaxel²⁴¹. Le mode d'action de ces molécules repose sur leur activité inhibitrice de tyrosine kinase (TKI) spécifique de l'EGFR. En empêchant la phosphorylation du récepteur, ils vont le rendre inactif et bloquer la voie de signalisation responsable de la prolifération et de la survie des cellules cancéreuses.

Cependant, malgré leur spécificité d'action, leur efficacité et leur faible toxicité qui en font des outils de premier choix dans le traitement des cancers des poumons, moins de 25% des patients peuvent bénéficier de ces thérapies ciblées. Bien qu'elles aient incontestablement amélioré les options de traitement contre le cancer, elles ne garantissent pas la guérison et la plupart des patients développent des résistances au cours du traitement, entraînant des rechutes²⁴². Heureusement, l'essor parallèle des immunothérapies a apporté un nouveau souffle dans la prise en charge des patients, certains ayant même été guéris de manière durable grâce à ces nouvelles approches thérapeutiques.

IMMUNOTHERAPIES

Contrairement aux thérapies conventionnelles qui visent directement les cellules tumorales, l'immunothérapie vise à renforcer la capacité naturelle du système immunitaire à lutter contre les cellules cancéreuses. De nombreuses stratégies peuvent être déployées dans le but d'induire une réaction immunitaire antitumorale. Elles passent par l'administration de cytokines (IL-2 ou IFN), la vaccination antitumorale, le transfert adoptif de LT ou de CAR (chimeric antigen receptor). Les immunothérapies actuellement administrées dans le CBNPC s'appuient sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux bloquant les points de contrôles

INTRODUCTION

immunitaires. Ces “Immune Checkpoint Inhibitors” (ICIs) sont utilisés pour lever l’anergie des cellules immunitaires, induite par les cellules tumorales au sein du microenvironnement tumoral (TME). Les mécanismes d’immunosuppression mis en place par les cellules tumorales seront plus particulièrement détaillés dans le chapitre 3 de cette introduction.

Les premiers ICIs à avoir montré une efficacité clinique dans le mélanome métastatique étaient dirigés contre CTLA-4 (Ipilimumab)²⁴³. CTLA-4 est une molécule co-inhibitrice retrouvée à la surface des LT dont elle régule l’activité en interagissant avec B7 (CD80/86) qui lui est présent sur les cellules présentatrices d’antigènes telles que les cellules dendritiques (Figure 13). Le mécanisme inhibiteur repose sur la capacité de CTLA-4 à entrer en compétition avec des molécules co-activatrices comme CD28 pour se lier à B7. Un anticorps anti-CTLA-4 empêchera l’interaction de CTLA-4 avec B7 et permettra à CD28, sans compétiteur, de promouvoir l’activation des LT. Étant fortement exprimé sur les Treg, l’anti-CTLA-4 peut réduire leur nombre au sein du microenvironnement tumoral (TME) et par conséquent diminuer l’immunosuppression et participer à la lever l’anergie des LT.

Malheureusement, l’utilisation de l’ipilimumab est associée à des effets secondaires parfois sévères appelés Immune-Related Adverse Events (IRAEs). Ces effets adverses concernent divers organes comme les intestins, le foie, le système nerveux et la peau avec notamment l’apparition de maladies auto-immunes comme le vitiligo²⁴⁴.

Depuis une dizaine d’années, d’autres ICIs ont été proposés et approuvés par la FDA (Food and Drug Administration). Il y a par exemple les anticorps dirigés contre PD-1 (pembrolizumab, nivolumab, dostarlimab et cemiplimab) ou contre son ligand PD-L1 (atezolizumab, avelumab et durvalumab). L’activité cytolytique d’un LT est limitée par l’interaction PD-1-PD-L1 dans le cas d’un contrôle de la réponse immunitaire. PD-L1, exprimé par les cellules cancéreuses leur permet ainsi d’échapper à l’élimination par les LT (Figure 13). Neutraliser l’un ou l’autre des partenaires avec un anticorps permet de surmonter l’inhibition et favorise l’établissement d’une réponse immunitaire anti-tumorale plus efficace.

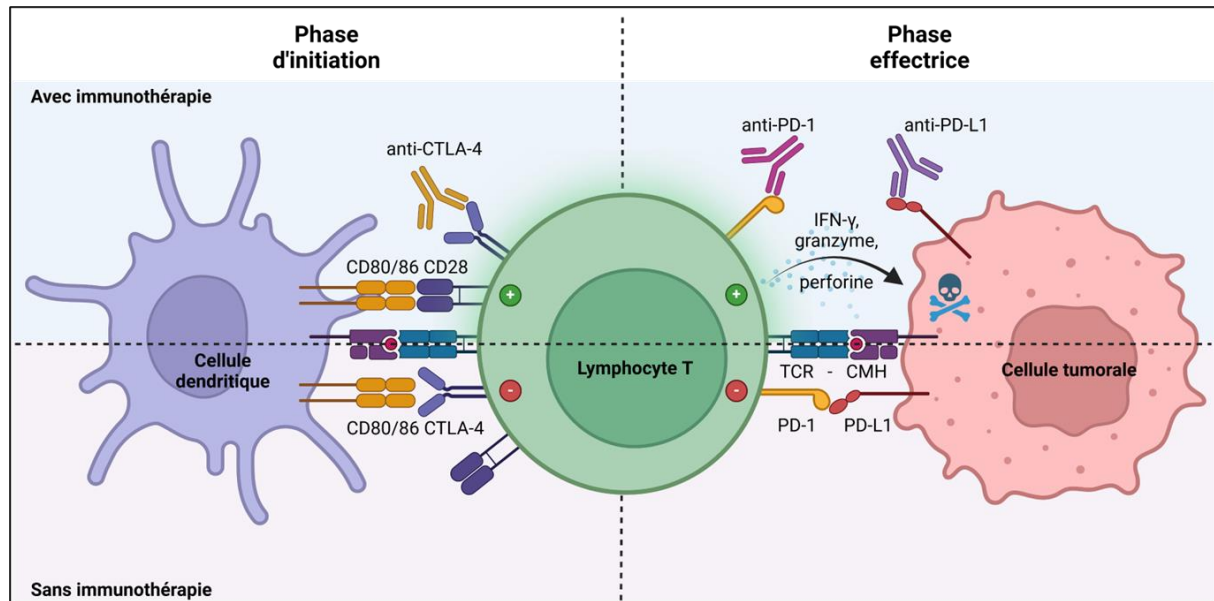


Figure 13 : Mode d'action des immunothérapies utilisant les Immune Checkpoint Inhibitors. Dans le microenvironnement tumoral, les lymphocytes T effecteurs sont exposés à des signaux inhibiteurs, tant durant la phase d'initiation que lors de la phase effectrice. L'inhibition est principalement médiée par l'interaction de CD80/86 (B7) avec CTLA-4, en phase d'initiation et par le contact entre PD-1 et son ligand PD-L1 qui est exprimé sur les cellules tumorales, en phase effectrice. Les anticorps monoclonaux qui ciblent ces points de contrôle immunitaire agissent en bloquant ces interactions délétères, ce qui permet de surmonter l'inhibition exercée et de favoriser l'établissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

Aujourd'hui, chez les patients atteints de CBNPC à un stade avancé sans mutation driver, les traitements de première ligne combinent chimiothérapie et immunothérapie par ICIs. Afin d'adapter au mieux ces traitements, un score appelé « tumor proportion score » (TPS) est évalué sur la base du nombre de cellules positives pour un marqueur donné dans la tumeur. Ainsi, des études ont montré que lorsque l'expression de PD-L1 était élevée (TP \geq 50%), l'utilisation du pembrolizumab en monothérapie conduisait à une amélioration de la survie par rapport à la chimiothérapie seule²⁴⁵. Cependant, pour les cas où l'expression de PD-L1 était faible, une combinaison de carboplatine et de pembrolizumab conduisait à une amélioration significative de la survie globale, indépendamment du niveau d'expression de PD-L1 et avec un taux de survie à 12 mois de 69,2% comparé à 49,4% pour le groupe recevant un placebo²⁴⁶.

Ces observations peuvent s'expliquer par le fait qu'un niveau élevé de PD-L1 est associé à une importante présence de lymphocytes infiltrant la tumeur, ce qui favorise une meilleure réponse aux traitements. En revanche, en cas de faible infiltration lymphocytaire, l'association immunothérapie-chimiothérapie pourrait induire une mort immunogène des cellules tumorales, favorisant ainsi la maturation des cellules dendritiques, la présentation d'antigènes tumoraux aux lymphocytes en périphérie et l'amorçage d'une réponse adaptative

INTRODUCTION

antitumorale. L'introduction du pembrolizumab viendrait alors renforcer cette réponse en agissant pour permettre une réponse T effectrice au sein du TME immunosuppresseur.

Malgré l'efficacité de ces traitements, seulement 15 à 20% des patients y répondent efficacement. La majorité de patients développera des résistances qui peuvent être primaires ou acquises, ce qui constitue de nouveaux défis pour la prise en charge thérapeutique de leur cancer.

THERAPIES ANTI-ANGIOGENIQUES

Les patients atteints de CBNPC avancé ou métastatique sans mutations ciblables, qui deviennent résistants à l'immunothérapie de première intention par ICIs, nécessitent de nouvelles options thérapeutiques en deuxième ligne. Les recherches sur l'angiogenèse tumorale dans le CBNPC sont moins avancées que dans d'autres cancers, probablement en raison de la complexité du système vasculaire pulmonaire. Actuellement, seuls deux agents anti-angiogéniques, le nintedanib (inhibiteur de type TKI) et le ramucirumab (anticorps monoclonal ciblant le VEGFR2), sont approuvés par la FDA et l'EMA (European Medicines Agency) pour le traitement du CBNPC métastatique avec progression de la maladie pendant ou après une chimiothérapie à base de platine^{247,248}. Le bevacizumab, un anticorps monoclonal ciblant le VEGF-A, est également indiqué en l'absence d'histologie épidermoïde.

L'angiogenèse et l'immunosuppression sont des processus étroitement liés avec des régulateurs communs. Des stratégies combinatoires ont émergé, notamment l'association d'ICIs et de TKI ciblant VEGFR. L'essai clinique IMpower150 a examiné l'efficacité de l'association entre l'atezolizumab (anticorps α -PD-L1) et le bevacizumab (anticorps α -VEGFA) chez des patients atteints de CBNPC avancé. L'étude a montré une augmentation des bénéfices en termes de survie par rapport à la chimiothérapie seule²⁴⁹. Cette combinaison thérapeutique bénéficie actuellement d'une approbation pour le traitement de divers cancers, tels que le CBNPC²⁵⁰.

Dans leur revue, Reck et al. font un état des lieux des résultats prometteurs obtenus avec les agents anti-angiogéniques dans les CBNPC et les immunothérapies²⁵¹. Des études relèvent cependant un manque d'effet des anti-angiogéniques dans la survie des patients et une résistance observée dans les CBNPC mutés par EGFR-T790M²⁵². L'efficacité restreinte de

INTRODUCTION

ces thérapies anti-angiogéniques pourrait être attribuée à l'adoption par la tumeur de mécanismes alternatifs d'angiogenèse, dont je parlerai un peu plus loin, dans le chapitre 3. A titre d'exemple, dans les échantillons de CBNPC de bas grade, 16 % des cas présentaient des mécanismes non angiogéniques prédominants²⁵³. Ces mécanismes de résistance ne constituent hélas qu'un des nombreux freins rencontrés dans le cadre des traitements du cancer des poumons.

RESISTANCES AUX TRAITEMENTS

Quels que soient les traitements, de nombreux patients font face à des résistances qui vont se solder par des rechutes de leur maladie. Les chimio- ou radio-résistances peuvent se manifester de différentes manières, en raison de mutations génétiques, de l'environnement tumoral ou de mécanismes de défense propres aux cellules cancéreuses. Certains types de cellules tumorales possédant des altérations génétiques et épigénétiques avantageuses qui peuvent être sélectionnées pendant le traitement, entraînant ainsi une diminution de la sensibilité de la tumeur au traitement. Parmi les grands mécanismes de résistance aux chimiothérapies, le mieux caractérisé est l'altération de l'afflux ou efflux de médicaments par l'intermédiaire des transporteurs ABC à la surface des cellules tumorales qui limite l'accumulation intracellulaire de la drogue et son activité²⁵⁴. En parallèle, les cellules tumorales renforcent leurs capacités de réparation de l'ADN pour contrer les dommages causés par les agents chimiothérapeutiques. Elles peuvent aussi échapper à la mort cellulaire par apoptose en surexprimant des protéines anti-apoptotiques²⁵⁵ ou au travers des capacités acquises par les mutations p53²⁵⁶. Ces mécanismes se retrouvent dans la radiorésistance²⁵⁷.

Les thérapies ciblées se heurtent, elles aussi, à des mutations de résistance acquises, comme avec la mutation T790M du gène EGFR retrouvé chez 50 à 60% des patients résistants aux TKI de premières générations²⁵⁸. Ces patients peuvent être traités avec un TKI de nouvelle génération, l'osimertinib, qui vient se lier au récepteur en formant une liaison covalente ce qui améliore l'efficacité de l'inhibiteur. Cependant 10 à 26% des patients également mutés EGFR^{C797S} vont présenter une progression du cancer sous osimertinib en deuxième intention²⁵⁹. Cet exemple illustre l'adaptation constante nécessaire dans l'utilisation des thérapies ciblées pour lutter contre les mutations et mécanismes d'échappement des cellules tumorales et développer des stratégies thérapeutiques plus efficaces.

INTRODUCTION

En plus des résistances induites par les mutations génétiques, certaines peuvent être associées aux caractéristiques du TME. Étant donné que le mode d'action des ICI repose sur le TME, les thérapies ciblées sont parmi celles qui seront les plus influencées par la composition cellulaire, moléculaire et les propriétés singulières du microenvironnement. Des mécanismes immunosuppresseurs en dehors de la voie ciblée par le traitement peuvent empêcher une réponse immunitaire antitumorale efficace malgré la présence ou le recrutement de LT antitumoraux²⁶⁰. Les tumeurs "froides" sont caractérisées par une faible expression de PD-L1 et de CMH-I, ainsi qu'une infiltration ténue des TILs. Bien que les LT puissent être présents, ils sont souvent limités en périphérie en raison d'une matrice extracellulaire trop dense. Ce type de tumeur a tendance à être peu réactive aux ICI en raison de leur faible immunogénicité intrinsèque²⁶¹.

En opposition, les tumeurs dites "chaudes" répondent favorablement aux immunothérapies en raison d'un environnement propice à l'activité immunitaire, caractérisé par une infiltration significative de TILs, une forte expression de PD-L1 et un niveau élevé d'IFN- γ ²⁶². D'autres facteurs tels que la charge mutationnelle tumorale et l'instabilité microsatellite sont également de puissants biomarqueurs de la réponse aux ICI. Prédire la réponse aux immunothérapies en fonction des caractéristiques des tumeurs peut améliorer le pronostic de survie en personnalisant davantage les stratégies thérapeutiques. C'est dans ce but qu'est né le concept d'immunoscore. Cet outil permet de quantifier et de caractériser les LT dans la tumeur, en se basant principalement sur l'expression des marqueurs CD3 et CD8 dans deux régions tumorales (centre et périphérie).

L'immunoscore permet une classification des patients en fonction de l'infiltration lymphocytaire ainsi qu'une indication sur leur capacité de réponse aux immunothérapies. Ainsi, la faible infiltration de cellules effectrices comme les cellules T CD8 et les NK et la forte présence de cellules immunosuppressives comme les Treg et les Myeloid-derived suppressor cell (MDSCs) représentent des mécanismes de résistance aux ICI²⁶³⁻²⁶⁵. L'immunoscore a notamment montré une efficacité de prédiction dans le CBNPC où les patients avec un faible immunoscore ont présenté une progression de la maladie en moins de 18 mois, tandis que ceux avec un immunoscore élevé ont progressé sur une période de 36 mois²⁶⁶.

INTRODUCTION

Des caractéristiques intrinsèques aux cellules tumorales peuvent aussi être responsables d'une faible réponse aux ICIs. Parmi ces caractéristiques, une diminution de l'expression²⁶⁷ ou une perte d'hétérogénéité du CMH-I ou de ses composants²⁶⁸ est associée à une faible présentation d'antigènes tumoraux et donc une mauvaise activation du SI. Les cellules tumorales expriment à leur surface d'autres protéines immunosuppressives comme TIM-3²⁶⁹ ou LAG-3²⁷⁰ suffisantes pour bloquer la levée de l'inhibition des ICIs administrés en monothérapie. Des études se sont alors intéressées à l'effet que produirait l'utilisation combinée d'agents destinés à bloquer l'axe PD-1/PD-L1 et LAG3 co-exprimés sur les TIL. Ces combinaisons ont montré une augmentation de la survie et l'élimination de plusieurs tumeurs chez la souris²⁷¹.

Parmi d'autres mécanismes initiateurs de résistances aux ICIs, la piste d'un défaut de LT mémoire antitumoraux a été envisagée. Ainsi, chez des patients traités pour un mélanome et répondant au pembrolizumab, les CD8⁺/CD4⁺ mémoires étaient majoritairement retrouvés tandis que chez les patients non répondeurs, cette population était diminuée²⁷².

La diversité des mécanismes de résistances aux immunothérapies souligne la nécessité d'explorer de nouvelles stratégies exploitant les interactions singulières au sein du TME. En effet, au-delà des cellules immunitaires et tumorales, les fibroblastes et les ECs contribuent aux caractéristiques du TME. Comprendre quels sont les rôles et impacts de chacun de ces acteurs dans la réponse immunitaire antitumorale pourrait permettre de développer des approches thérapeutiques plus efficaces et personnalisées. Il est donc primordial d'étudier la dynamique précise de ces interactions au sein du TME pour contourner les résistances aux traitements et potentiellement améliorer les résultats cliniques.

ENDOTHELIUM ET MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

Notre compréhension du cancer a considérablement évolué au cours des dernières décennies. Au-delà de causes génétiques, il faut considérer la pathogenèse tumorale comme reposant sur un écosystème diversifié où les cellules tumorales interagissent étroitement avec un microenvironnement tumoral (TME) de composition moléculaire et cellulaire complexe. Autrefois considérées comme de simples spectatrices, les cellules du TME jouent en fait une partition qui influence directement l'initiation et la progression tumorale ainsi que les réponses aux traitements. Ce changement de paradigme a poussé les chercheurs à élargir leur champ d'investigation, au-delà des seules cellules tumorales, en mettant particulièrement en lumière les interactions et signalisations qui vont piloter le système immunitaire au sein du TME^{273,274}. D'un point de vue clinique, une compréhension approfondie des propriétés structurales et fonctionnelles du TME est essentielle car de nombreuses nouvelles stratégies thérapeutiques, telles que les immunothérapies et les traitements anti-angiogéniques, ciblent l'évasion immunitaire et la néo-angiogenèse tumorale. Cette troisième partie introductive de ma thèse a pour but de faire un état des lieux des connaissances sur les différents composants du TME, avec un intérêt particulier pour le compartiment vasculaire et son rôle dans le développement tumoral.

MICROENVIRONNEMENT TUMORAL ET ECHAPPEMENT IMMUNITAIRE

L'importance du système immunitaire dans la lutte contre le développement du cancer a été mise en évidence chez les personnes immunodéprimées. L'immunodéficiência associée à l'infection par le VIH entraîne une incidence accrue du risque de développer certains types de cancers. Sans traitement, les personnes séropositives présentent des risques jusqu'à 2800 fois plus élevés de développer un sarcome de Kaposi, 10 fois plus élevés pour le lymphome non hodgkinien et 3 fois plus élevés pour le cancer du col de l'utérus par rapport à la population générale²⁷⁵. Au cours de la physiopathologie infectieuse produite par le VIH, la disparition de la population de LT CD4⁺ contribue au déclin progressif de la compétence immunitaire qui pourrait contrôler les cellules cancéreuses²⁷⁶. En parallèle, il a été démontré que des LT spécifiques de néoantigènes exprimés par les cellules tumorales peuvent être identifiés au sein d'une tumeur²⁷⁷. Ces observations corroborent l'idée que les cellules immunitaires adaptatives sont équipées pour éliminer les cellules tumorales au même titre

INTRODUCTION

que des cellules infectées ou altérées par le stress. Le concept d'immunosurveillance a ainsi émergé, postulant que les cellules immunitaires participent activement à la reconnaissance et à l'élimination des cellules tumorales dès leur émergence.

Toutefois, cette immunosurveillance ne semblant pas toujours réussir à prévenir l'émergence et le développement du cancer chez les individus immunocompétents, les mécanismes permettant aux cellules tumorales de se soustraire à la pression immunitaire ont été recherchés. Le modèle de l'immunoédition, développé par R. Schreiber, redéfinit la théorie traditionnelle de l'immunosurveillance en introduisant une dynamique en trois phases (ou modèles des trois E) : élimination, équilibre et échappement²⁷⁸ et Figure 14.

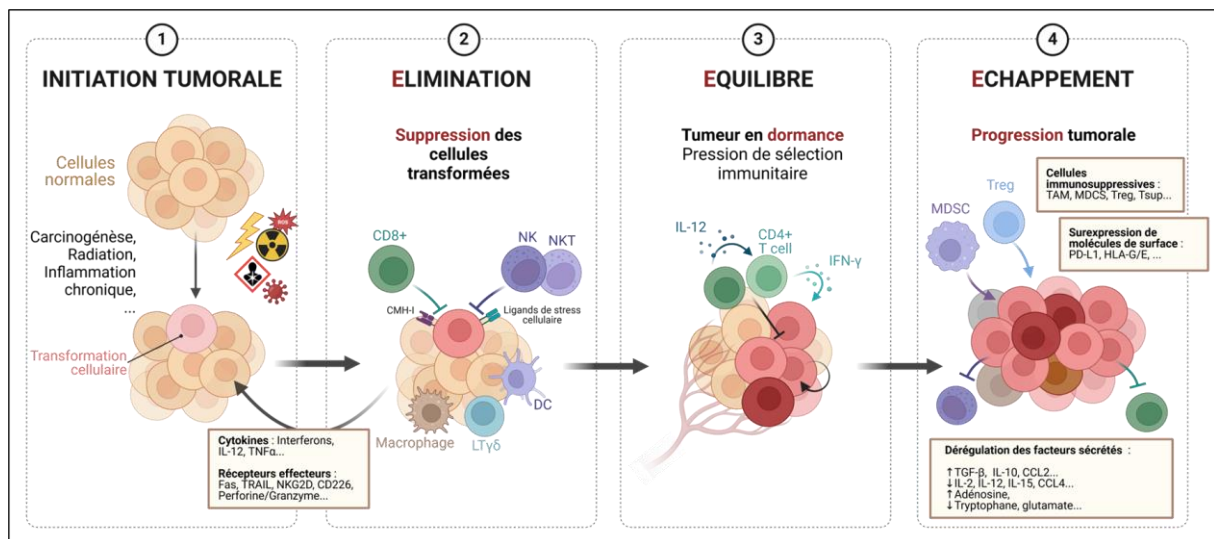


Figure 14 : La théorie de l'immunoédition. Lors de l'initiation du cancer, les cellules sous l'influence de facteurs oncogènes subissent une transformation en cellules malignes (1). Cette transformation ne reste pas invisible à la surveillance du système immunitaire qui attaque et détruit les cellules tumorales anormales, c'est la phase d'élimination (2). Cependant un défaut d'équilibre dans les facteurs environnementaux provoque une sélection de certaines cellules malignes qui échappent à l'éradication induisant une dormance tumorale sous la pression immunitaire. C'est la phase d'équilibre (3). Puis vient la phase d'échappement (4) au cours de laquelle les cellules tumorales, par l'intermédiaire de mécanismes immunosuppresseurs, aveuglent le système immunitaire dont la dysfonction favorise la prolifération incontrôlée et la progression du cancer.

La phase d'élimination est marquée par la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales par les effecteurs de l'immunité innée et adaptative. Une phase dite d'équilibre se met en place lorsque certaines cellules malignes parviennent à échapper à la phase initiale d'élimination. La phase d'équilibre est marquée par la présence de cellules tumorales résiduelles, maintenues dans un état dormant sous l'influence de la pression immunitaire qui ne permet cependant pas leur éradication complète. Cette pression de sélection immunitaire favorise l'émergence de clones tumoraux dotés de capacités d'évasion immunitaire et conduit finalement à la phase d'échappement, durant laquelle les cellules tumorales acquièrent des

INTRODUCTION

attributs les rendant indétectables par le système immunitaire²⁷⁹. Le phénomène d'échappement ne s'ancre pas uniquement dans les caractéristiques intrinsèques des cellules tumorales, mais repose sur plusieurs éléments du TME qui contribuent à l'immunosuppression. Je détaillerai ci-dessous la composition du TME et les mécanismes d'immunosuppression associés avant de me focaliser sur le rôle plus particulier que les ECs jouent au sein du TME dans la partie B.

COMPOSITION ET HETEROGENEITE DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

La composition et les fonctions du TME sont hautement hétérogènes et varient d'un patient à l'autre, même pour des types de cancers identiques²⁸⁰⁻²⁸². Cette diversité est influencée par de nombreux facteurs, tels que l'organe d'origine de la tumeur, les caractéristiques intrinsèques des cellules cancéreuses, le stade tumoral et des spécificités liées au patient. Les cellules qui composent le TME génèrent un véritable écosystème dans lequel elles peuvent adopter des rôles à la fois antitumoraux et protumoraux, déterminés par les signaux sécrétés et les contacts cellulaires auxquels ces cellules sont exposées. La figure 14 détaille la composition cellulaire d'une tumeur vascularisée et de son TME. Il faut rappeler que cette composition peut être différente selon que l'on s'intéresse au cœur de la tumeur ou à la périphérie du stroma, confirmant une organisation complexe et peut être sectorisée du TME. Appréhender cette complexité est devenu indispensable pour développer des stratégies thérapeutiques qui, en ciblant le microenvironnement et ses singularités, doivent pouvoir améliorer les réponses aux traitements de première ligne.

Les principaux composants du TME sont les cellules cancéreuses, qui sont les entités malignes à l'origine de la progression de la tumeur. La tumeur se développe cependant dans un stroma qui va constituer un écosystème dans lequel évoluent des cellules non cancéreuses telles que les cellules immunitaires innées et adaptatives, les fibroblastes associés au cancer (CAF) et les ECs de la vascularisation tumorale. Ensemble, ces éléments coexistent et interagissent au sein d'une matrice extracellulaire (MEC) profondément remodelée, créant un environnement propice à la progression tumorale.

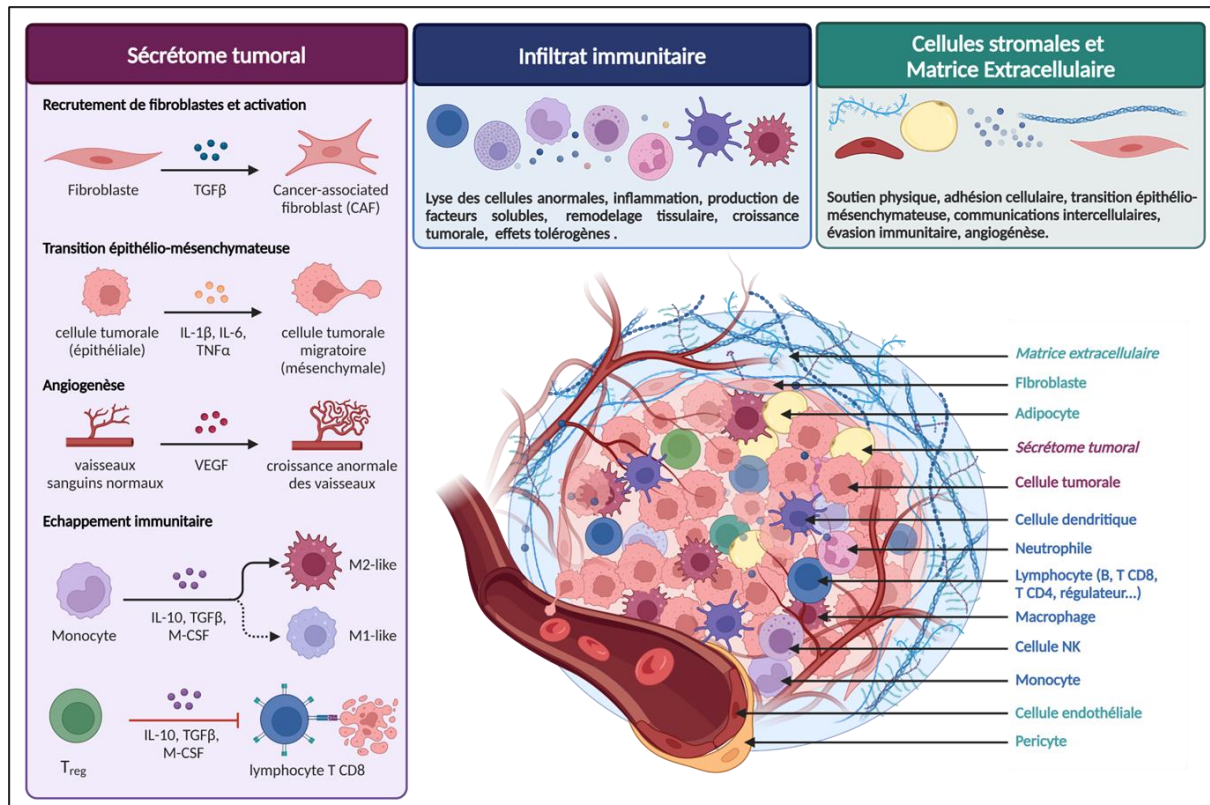


Figure 15 : Composition du microenvironnement tumoral. Le TME est un écosystème complexe et dynamique d'une tumeur. Il est composé de divers acteurs cellulaires et non cellulaires présents dans le noyau stromal de la tumeur et sa périphérie. Sous l'influence de nombreux signaux sécrétés, les cellules présentes ou recrutées sont modifiées et soutiennent la progression tumorale. Le TME est également impliqué dans la formation de métastase et la réponse aux traitements. Adapté de la thèse de Camille Chatelain, 2023. Réalisé avec Biorender.

Cellules stromales et matrices extracellulaires

Les fibroblastes :

Les fibroblastes, cellules résidentes des tissus conjonctifs, en charge de la synthèse et de la structuration des MEC deviennent des composants clés du stroma tumoral où ils subissent une reprogrammation en fibroblastes associés au cancer (CAF). Les CAF sont caractérisés par une expression accrue de marqueurs tels que l'actine alpha du muscle lisse (α -SMA), la protéine d'activation des fibroblastes (FAP), la protéine spécifique des fibroblastes 1 (FSP1), le récepteur PDGFR- α/β et la vimentine²⁸³.

Leur phénotype est acquis suite à l'exposition au TGF- β , à l'epidermal growth factor (EGF), au platelet derived growth factor (PDGF) et à l'environnement hypoxique induit par les cellules tumorales²⁸⁴. Les CAFs peuvent être originaires de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules épithéliales et ou EndMT des ECs sous l'influence du

INTRODUCTION

TGF- β ²⁸⁵. Les CAFs peuvent également évoluer à partir de la transdifférenciation des adipocytes ou des péricytes, ce qui conduit à la régulation positive des gènes engagés dans la lignée mésenchymateuse, tels que *RUNX2* et *PPAR γ* ²⁸⁶.

Il existe plusieurs sous-types de CAFs fonctionnellement distincts qui exercent des fonctions variées et souvent opposées au sein de l'environnement tumoral. A titre d'exemple, un sous-type de CAF caractérisé dans le cancer du sein et défini comme S1-myCAF participe à l'environnement immunosuppresseur en retenant les Treg FoxP3⁺ dans le TME²⁸⁷. Les CAF reprogrammés participent activement à la synthèse et au remodelage de la MEC et contribuent aux particularités du TME. Le remodelage modifie notamment les propriétés mécaniques de la MEC²⁸⁸ ce qui impacte le comportement des cellules cancéreuses et des cellules immunitaires.

Les CAFs agissent sur les processus d'angiogenèse tumorale et sont promoteurs d'invasion tissulaire en favorisant la transition épithéliomésenchymateuse (EMT) des cellules cancéreuses via la sécrétion de facteurs tels que le TGF β , l'EGF et le VEGF-A. Ils génèrent un microenvironnement immunosuppresseur en recrutant des cellules pro-tumorales telles que les MDSC ou les Treg qui vont faciliter l'évasion immunitaire²⁸⁹⁻²⁹¹. Ils ont la faculté d'orienter le phénotype des cellules recrutées dans les tumeurs, comme les macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques qui deviennent principalement de type M2-like, N2-like (neutrophiles) ou DCreg²⁹¹. Par le biais de signaux sécrétés, les CAFs sont également décrits comme capables d'atténuer les activités anti-tumorales, notamment la présentation antigénique par les DC, la phagocytose opérée par les macrophages, ainsi que la cytotoxicité des cellules NK et des lymphocytes CD8⁺ ²⁹¹.

Dans le CBNPC, les CAFs ont leur propre singularité répertoriée dans la revue de Wong et al.²⁹² et dont l'hétérogénéité a été mise en avant dans une étude publiée en mars 2024 dans le journal *Cancer Cell*²⁹³.

Les péricytes :

Comme l'indique le schéma de la figure 15, l'écosystème généré dans le TME implique la vascularisation tumorale et la présence, entre autres, de péricytes qui entourent les vaisseaux sanguins et régulent leur perméabilité. Le TME semble influencer le comportement des péricytes, les rendant susceptibles à des transformations malignes. L'altération des

INTRODUCTION

péricytes promeut la formation de vaisseaux sanguins immatures et conduit à une perméabilité accrue qui favorise l'infiltration tumorale. Ces péricytes facilitent également l'angiogenèse tumorale²⁹⁴ et dans certains cas, leurs interactions étroites avec les ECs permettent de former un bouclier protecteur pour les cellules tumorales, en les protégeant des traitements et de la surveillance immunitaire²⁹⁵. De plus, ces péricytes favorisent l'évasion immunitaire en induisant la polarisation des macrophages en type M2 like ce qui promeut la tolérance immunitaire et l'angiogenèse, aggravant ainsi la progression tumorale²⁹⁶.

La matrice extracellulaire :

La matrice extracellulaire (MEC) constitue le composant non cellulaire du TME. Il s'agit d'un réseau dynamique de protéines fibreuses comprenant du collagène, des glycoprotéines et protéoglycanes produits principalement par les CAFs sous l'influence du TGF β ²⁹⁷. La matrice est continuellement remodelée par des protéases tumorales, modifiant sa composition selon le type et le stade de la tumeur. De même, les CAFs réorganisent les fibres de collagène et de fibronectine, rendant la MEC plus rigide ce qui facilite la migration des cellules tumorales²⁹⁸. Cette rigidité accrue de la MEC (1,5 fois supérieure à celle des tissus sains)²⁸⁸, renforce l'adhésion des cellules tumorales via des récepteurs comme les intégrines et CD44²⁹⁹. Ces caractéristiques semblent de plus favoriser la prolifération, la survie et l'invasivité des cellules tumorales tout en limitant l'efficacité des traitements³⁰⁰. Une MEC dense et rigide favoriserait également un environnement immunosuppresseur, en réduisant l'accessibilité à la tumeur ainsi que l'activité des lymphocytes T, en augmentant l'expression de PD-L1 dans le cancer du poumon³⁰¹, et en altérant la fonction des cellules dendritiques³⁰². De plus, la MEC impacte la communication cellulaire en servant de réservoir pour les molécules sécrétées.

Sécrétome, vésicules extracellulaires et communication intercellulaire

Outre les communications par contact direct, les communications intercellulaires au sein du TME reposent sur de la signalisation paracrine et au moyen de vésicules extracellulaires (EVs). La signalisation paracrine concerne la libération et la réception de signaux de type cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et protéases. Ces molécules sont sécrétées en réponse aux caractéristiques du cancer et aux stress cellulaires puis elles agissent directement sur les cellules cibles ou modifient la MEC pour influencer le TME. À titre d'exemple, dans le cadre de l'adénocarcinome, la libération de CCL9 et d'IL-23 engendre un

INTRODUCTION

TME protumoral caractérisé par des propriétés inflammatoires, angiogéniques et immunosuppressives³⁰³.

Les EVs jouent également un rôle décisif dans les voies de communication en transportant de multiples médiateurs de façon non conventionnelle ainsi que des acides nucléiques, des protéines et des lipides vers d'autres cellules et en modifiant l'environnement local et même des sites distants^{304,305}. Les EVs sont classées selon leurs voies de biogenèse et leurs tailles en microvésicules et petites vésicules extracellulaires (sEVs) aussi appelées exosomes³⁰⁶. Les sEVs, mesurent entre 40 et 160 nm de diamètre et elles sont produites dans les corps multivésiculaires (MVBs) par invagination de la membrane des endosomes, avant d'être libérés par exocytose dans le milieu extracellulaire.

La production et le contenu des exosomes peuvent varier en fonction de divers stress ou modifications dans le microenvironnement, influençant ainsi les réponses cellulaires et stimulant l'immunité. En effet, les sEVs transportent des biomolécules spécifiques de leur cellule d'origine, y compris des molécules du CMH, ce qui leur confère des fonctions immunorégulatrices³⁰⁷. Par exemple, des travaux de notre équipe ont montré que les sEVs du mélanome peuvent diminuer les capacités cytotoxiques des LT CD8⁺³⁰⁸, mais aussi reprogrammer les progéniteurs de la moelle osseuse et favoriser les processus métastatiques³⁰⁹. Des EVs exprimant PD-L1 peuvent inhiber l'activation des LT, contribuer à la progression tumorale et à la résistance aux traitements^{310,311}. Les EVs favorisent un environnement immunosuppresseur au sein du TME et participent à la progression du cancer et à la formation de métastases^{312,313}.

Les EVs sont également étudiés pour leur potentiel rôle de biomarqueurs dosable dans le sang circulant. Dans le CBNPC, des travaux effectués par Vetsika et al., ont révélé qu'une augmentation des EVs circulants dans le sang de patients de haut grade était associée à des niveaux accrus de CTLA4, PD-L1 et FAS-L. De surcroît, une meilleure réponse à la chimiothérapie a été observée chez les patients avec un faible niveau d'EVs plasmatiques³¹⁴.

De leur côté Brocco et al., ont mis l'accent sur les EVs produits par l'endothélium, en se concentrant sur les EVs CD31+ et ont montré que leur présence était augmentée dans la plupart des cancers dont le CBNPC. De plus, une analyse comparative des cargaisons de protéines des EVs entre les patients répondant à l'immunothérapie et ceux subissant une

INTRODUCTION

progression tumorales pendant le traitement a identifié un ensemble de 10 protéines, telles que l'annexine A2 et S100A9, exclusivement présentes que dans les EVs des patients répondeurs³¹⁵. En somme, l'étude des EVs soulignent leur potentiel en tant que biomarqueurs non invasif, offrant des perspectives prometteuses pour le diagnostic et la personnalisation des traitements en cancérologie.

Il me faut souligner que la compréhension des fonctions de la communication intercellulaire par sEVs dans plusieurs types de pathologies allant des maladies infectieuses au cancer, ou leur utilisation comme systèmes de vectorisation, par exemple d'antigènes en vaccinologie, suscite un intérêt croissant depuis une grosse dizaine d'années. A ce titre, j'ai eu l'opportunité de participer à la rédaction d'une revue de la littérature sur ces vésicules et leur intérêt comme biomarqueurs et comme stratégies vaccinales³¹⁶. Cette revue est jointe en annexe.

Les cellules de l'immunité innée

L'environnement inflammatoire du TME, caractérisé par une hypoxie sévère et une dégradation tissulaire liée à la croissance tumorale³¹⁷, favorise le recrutement et la polarisation de divers types de cellules de l'immunité innée au sein de la tumeur. Parmi elles, des monocytes circulants, des macrophages, des DC, des neutrophiles³¹⁸, des mastocytes, des éosinophiles^{319,320}, des NK et des $LT\gamma\delta$. Sous l'influence de facteurs particuliers du microenvironnement, ces cellules immunitaires subissent des processus de différenciation et de maturation, généralement en faveur de la progression tumorale. Par exemple, les neutrophiles, en association avec les monocytes immatures, donnent naissance à une sous-population de cellules myéloïdes, les MDSC reconnues pour leurs propriétés immunosuppressives³²¹.

La présence persistante de ces cellules dans le TME est associée à un pronostic défavorable pour la survie des patients. Les monocytes recrutés peuvent également se polariser en macrophages associés aux tumeurs (TAM) qui représentent la population cellulaire immunitaire la plus abondante dans le TME de la majorité des cancers. Au cours de ma thèse, j'ai exploré la polarisation des macrophages dans des conditions spécifiques de coculture. C'est pourquoi cette introduction se concentre exclusivement sur les TAM. Le concept de polarisation des macrophages a été introduit afin de différencier les divers états fonctionnels

INTRODUCTION

de ces cellules. Il est essentiel de préciser que cette notion ne fait pas référence à des sous-types de macrophages distincts, mais plutôt à une simplification des différents états du macrophage et de sa plasticité, en réponse aux variations du microenvironnement tissulaire.

Les Macrophages associés au cancer :

Les TAM sont principalement dérivés de la différenciation de monocytes sanguins, bien qu'une part provienne de macrophages résidants du tissu³²²⁻³²⁴. Ce processus de recrutement et d'activation des monocytes au sein du TME est médié par plusieurs facteurs, notamment le macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), la CCL2, le VEGF, le TNF- α et la sémaphorine 3A³²⁵. Leur expression au sein de la tumeur est généralement corrélée à un pronostic défavorable et à une réponse thérapeutique limitée³²⁴⁻³²⁶. Des études ont montré que la déplétion, l'inhibition ou la reprogrammation des TAM dans des modèles murins peut ralentir la progression de divers cancers et optimiser l'efficacité de plusieurs traitements tels que les chimiothérapies ou les immunothérapies ICI³²⁷⁻³²⁹.

Les TAM se composent de diverses sous-populations hétérogènes, qui ont longtemps été définies comme les phénotypes anti-tumoraux M1-like et pro-tumoraux M2-like (Figure 16). Ces derniers sont majoritairement présents dans le TME et influencent des processus pathologiques tels que l'angiogenèse, l'immunosuppression et la dissémination métastatique, ce qui fait des TAM et de leurs activités un axe de recherche majeur en oncologie. Les TAM M2-like sont caractérisés par l'expression des récepteurs CD68, CD163, CD206 (aussi appelé MRC1) et CD209^{325,330,331}. Ils présentent une activité arginase élevée ainsi qu'une sécrétion marquée de cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β qui inhibent la réponse lymphocytaire T CD8. A l'inverse, les TAM M1-like se caractérisent par l'expression des récepteurs CD68, CD80, CD86, du CMH-II, par la production élevée d'iNOS, un précurseur de la nitric oxide synthase (NOS), et par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-12, l'IL-23 et le TNF- α ^{325,330,331}. La sécrétion d'IL-12 favorise notamment le développement de la réponse lymphocytaire Th1 et cytotoxique³³². Il est essentiel de souligner que cette typologie est imparfaite et que les macrophages ne se limitent pas à une simple classification M1/M2³³³. Certains TAM ont même montré une capacité à exprimer à la fois des marqueurs de type M1 comme de type M2³³⁴⁻³³⁶.

INTRODUCTION

Un sous-ensemble distinct de TAM réside dans la niche périvasculaire et participe activement au modelage du TME. Ces TAM périvasculaires constituent une population hétérogène qui favorise la progression du cancer. Cependant, notre compréhension de ce sous-ensemble, ainsi que son développement et ses fonctions restent incomplets. Les premières études ont défini que ces cellules expriment fortement le récepteur TIE2 et contribuent au processus d'angiogenèse tumorale³³⁷. Ces TAMs s'accumulent autour des vaisseaux sanguins tumoraux et expriment des niveaux élevés de gènes proangiogéniques, tels que Mmp9, Vegfa et Cxcl12³³⁸. Leur proximité avec les vaisseaux sanguins permet un dialogue avec les ECs. Ainsi, la molécule ANGPT2, produite par les ECs activées, stimule les macrophages TIE2 pour réguler à la hausse l'IL-10 immunosuppressive³³⁹.

Des études plus récentes identifiant un type de TAM exprimant le récepteur endothélial de l'hyaluronane (LYVE-1), impliqué dans les mécanismes d'immunosuppression. En effet, après déplétion de cette population grâce à des modèles de souris génétiquement modifiées, une augmentation du recrutement des lymphocytes T CD8 dans la tumeur et une meilleure réponse à la chimiothérapie ont été observées³⁴⁰.

Il existe un manque de standardisation dans les approches et les méthodes employées dans l'étude des macrophages par les différentes équipes de recherche. Par exemple, Mantovani et al. ont proposé une classification en subdivisant les macrophages M2 en M2a, M2b et M2c, en fonction des stimuli spécifiques tels que l'IL-4/IL-13, les complexes immunitaires et le récepteur des LPS/IL-1 et IL-10, respectivement³⁴¹. Les macrophages M2a et M2b jouent un rôle clé dans l'immunomodulation et favorisent l'activation des cellules Th2, tandis que les M2c sont davantage impliqués dans la suppression des réponses immunitaires et le remodelage tissulaire. En outre, le concept des macrophages M2d (souvent appelés TAM) a été introduit, désignant des macrophages activés par les récepteurs de type Toll qui expriment le VEGF et l'IL-10^{342,343}.

Cependant, de nombreux types de macrophages moins conventionnels manquent à cette classification. Au sein de notre équipe, nous avons démontré que les macrophages de type M2-like associés au mésothéliome pleural malin (MPM) peuvent être induits par la stimulation avec du M-CSF^{344,345}. En conséquence, pour nos contrôles de polarisation, nous traitons nos monocytes avec du GM-CSF ou du M-CSF afin de générer des macrophages de type M1-like ou M2-like, respectivement.

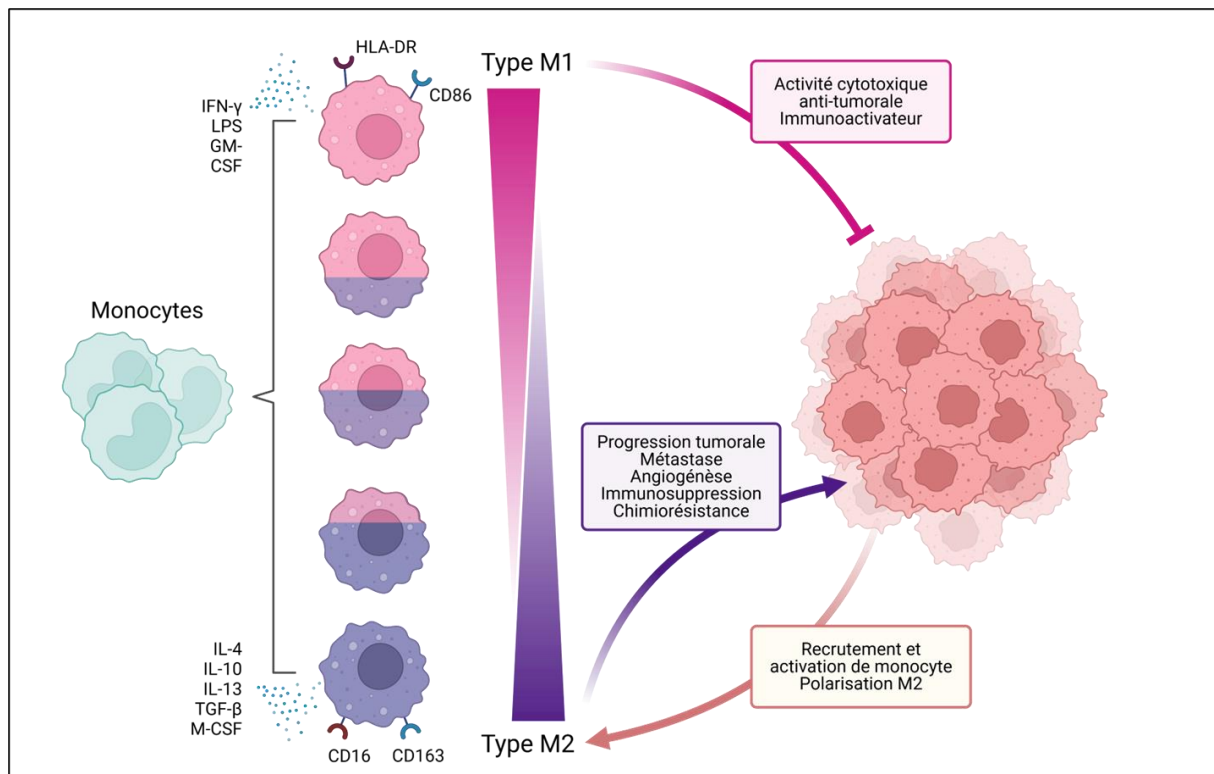


Figure 16 : Gradient de polarisation des Macrophages Associés aux Tumeurs (TAM) : De l'activité cytotoxique à la promotion tumorale. Les TAMs se composent de sous-populations hétérogènes, allant d'un phénotype M1-like anti-tumoral à un phénotype M2-like pro-tumoral. Les macrophages M1-like exercent une activité cytotoxique contre la tumeur, bien que leur contribution à une inflammation excessive puisse parfois favoriser la progression tumorale. À l'inverse, les M2-like facilitent l'évasion tumorale en renforçant l'immunosuppression, l'angiogenèse et la formation de métastases, leur présence étant souvent corrélée à un pronostic défavorable.

Il existe une diversité de sous-types de macrophages, non seulement d'un type de tumeur à l'autre, mais également au sein d'une même tumeur. L'utilisation de la transcriptomique en cellule unique a permis d'explorer cette hétérogénéité tant intertumorale que intratumorale^{346,347}. En s'appuyant sur les résultats de multiples études transcriptomiques, Ma et al. ont élaboré une classification plus nuancée des TAM³⁴⁸. Cette classification repose sur l'analyse de l'expression génique et des voies de signalisation enrichies des différents macrophages dans le contexte tumoral.

Leur travaux ont permis l'identification de sept sous-types distincts, définis en fonction de leurs fonctions présumées : interferon-primed TAM (IFN-TAM), immune regulatory TAM (Reg-TAM), inflammatory cytokine enriched TAM (Inflam-TAM), lipid-associated TAM (LA-TAM), pro-angiogenic TAM (Angio-TAM), resident tissue macrophages-like TAM (RTM-TAM) et proliferating TAM (Prolif-TAM).

INTRODUCTION

Les TAM dans le CBNPC :

Dans les cancers pulmonaires, des études histologiques de CBNPC chez la souris ont révélé que les macrophages alvéolaires restent localisés dans l'espace alvéolaire sain, évitant les nodules tumoraux³⁴⁹. Ces macrophages seraient donc éliminés progressivement durant l'expansion tumorale, ou subiraient une conversion phénotypique complète. Le rôle pro/antitumoral des macrophages alvéolaires suscite un débat, car ils sont associés à la fois à la promotion et à l'inhibition des tumeurs pulmonaires. Néanmoins, un consensus émerge, suggérant que les macrophages alvéolaires tendent à exercer un effet pro-tumoral plus marqué. Bien que des macrophages issues de CBNPC, lors d'une activation par IFN- γ ou le GM-CSF, vont produire de l'IL-6, de l'IL-1 β et du TNF- α qui contribuent à la régression tumorale³⁵⁰, un nombre important de données suggère que les capacités anti-tumorales des macrophages alvéolaires (phagocytose et sécrétion de cytokine pro-inflammatoire), diminuent au cours du développement tumoral. Cette perte de fonction les implique dans l'immunité dysfonctionnelle d'un TME immunosuppresseur³⁵¹.

En parallèle, les macrophages résidents interstitiels se joignent aux macrophages dérivés de monocytes pour constituer le réservoir TAM dans les cancers pulmonaires, participant au remodelage tumoral et à sa dissémination. Des études complémentaires ont montré que durant la progression tumorale dans des modèles murins de CBNPC et chez l'homme, les macrophages résidents se relocalisent au pourtour du TME, qui devient progressivement dominé par les macrophages recrutés³⁵².

Toutefois, les signaux exacts déterminant les modifications des macrophages pulmonaires dans le TME restent énigmatiques même si l'IL-9, produite par les lymphocytes T CD4, semble promouvoir l'expansion des macrophages interstitiels dans les modèles de tumeur pulmonaire³⁵³. La perspective de pouvoir agir sur la modulation du comportement des TAM dans le cancer demeure une tâche complexe, en raison d'une compréhension incomplète de la diversité moléculaire et fonctionnelle au sein du compartiment macrophagique tumoral.

Les cellules de l'immunité adaptative

Les premières études cliniques ont révélé que les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) jouent un rôle déterminant dans l'évolution de divers cancers³⁵⁴⁻³⁵⁶. Dans le contexte du CBNPC, il a été observé que 80% des TIL sont des LT³⁵⁷. Accompagnés par les cellules immunitaires innées, les lymphocytes naïfs et mémoire, ainsi que les lymphocytes B et divers sous-types de lymphocytes T effecteurs (y compris les cellules T auxiliaires Th1, Th2 et Th17, les Treg et les LT cytotoxiques) peuvent être identifiés dans le noyau tumoral ou dans le stroma tumoral adjacent. La nature, la densité et le positionnement des cellules immunitaires, ainsi que l'orientation fonctionnelle des différentes populations, affectent significativement la progression tumorale et la réponse aux traitements.

Les TLS, que nous avons évoquées dans le chapitre 1 de cette introduction, favorisent l'interaction entre les cellules immunitaires innées et adaptatives afin d'induire une réponse antitumorale. Leur présence constitue généralement un indicateur de bon pronostic. Les TILs dérivés de la circulation périphérique sont recrutés vers le TME par des chimiokines telles que CXCL9 et CXCL10, produites par les cellules de l'immunité innée, ce qui leur permet de pénétrer dans le TME³⁵⁸.

Au sein de cet environnement, les LT CD8⁺, qui représentent les principaux effecteurs de la réponse antitumorale, détectent des antigènes spécifiques, appelés antigènes associés aux tumeurs (TAA) et qui sont présentés par les CPA³⁵⁹. Ils exercent alors une activité de lyse cytotoxique anti-tumorale par la libération de perforine et de granzyme B, ou provoquent l'apoptose des cellules tumorales via des interactions médiées par la voie Fas/FasL ou le ligand TRAIL (Figure 17).

L'activité des lymphocytes T cytotoxiques est modulée par la présence de macrophages pro-inflammatoires au sein du TME et par celle de LT auxiliaires qui sécrètent des cytokines telles que l'IL-2, l'IL-12 et l'IFN γ ³⁶⁰. Les LT CD4⁺ de type Th1, souvent considérés comme ayant un rôle antitumoral, favorisent la maturation des DC par le biais de la voie CD40/CD40L, assurant ainsi une costimulation essentielle pour l'activation des LT CD8⁺³⁶¹ (Figure 17).

INTRODUCTION

Bien que présents en faible quantité dans les tumeurs, les LB contribuent également à l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale. Situés généralement dans les TLS adjacents ou à la périphérie de la tumeur, ils renforcent la réponse adaptative grâce à leurs aptitudes de CPA et en sécrétant des cytokines. En complément, ils amplifient l'action des cellules innées par la production d'anticorps, lesquels activent les récepteurs Fc sur les cellules phagocytaires ce qui favorise la phagocytose des corps apoptotiques tumoraux³⁶².

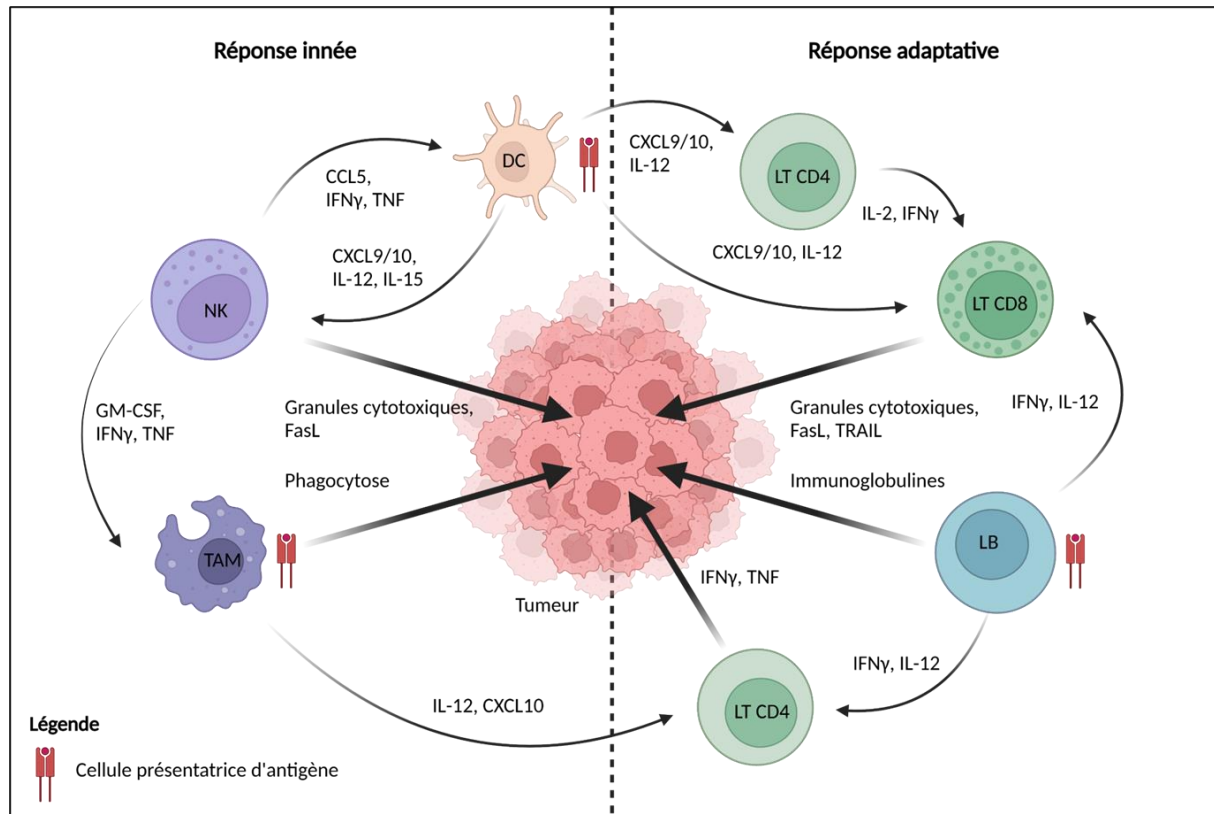


Figure 17 : Réponse immunitaire anti-tumorale. Les cellules impliquées dans la réponse innée constituent les premières populations cellulaires mobilisées lors de l'oncogenèse. La libération de cytokines pro-inflammatoires favorise la maturation des cellules présentatrices d'antigènes, lesquelles participent activement au recrutement et à l'activation des lymphocytes T. Les effecteurs immunitaires exercent leur activité en phagocytant les cellules tumorales, en sécrétant des granules cytotoxiques, ou encore en exprimant des ligands tels que le ligand de Fas (FasL) et le tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), qui sont des inducteurs d'apoptose. Adapté de la thèse de Ugo Hirigoyen, 2023.

Cependant, l'efficacité de la réponse adaptative anti-tumorale peut être entravée par des mécanismes d'immunosuppression liés au microenvironnement tumoral, parmi lesquels la présence de cellules suppressives et de cytokines immunomodulatrices.

INTRODUCTION

ÉCHAPPEMENT IMMUNITAIRE ET PROGRESSION TUMORALE

Le système immunitaire exerce une fonction ambivalente dans le développement tumoral, car il peut à la fois inhiber la progression du cancer en éliminant les cellules tumorales et, paradoxalement, promouvoir la croissance tumorale en favorisant la survie des cellules cancéreuses ayant développé des mécanismes d'évasion. Lors de la phase d'élimination, des sous-populations de cellules tumorales de faible immunogénicité sont sélectionnées, devenant en quelque sorte invisibles pour les cellules immunitaires.

Ce phénomène, connu sous le nom d'immunosélection, englobe divers mécanismes intrinsèques des cellules tumorales visant à contourner la surveillance immunitaire. Les caractéristiques associées à ce processus incluent une faible charge mutationnelle (TMB), entraînant une réduction de l'expression de néoantigènes pouvant être présentés aux cellules immunitaires, ainsi qu'une diminution ou une perte de l'expression de certaines molécules du CMH de classe I, observée dans 20 à 60% des tumeurs solides. De plus, certaines cellules tumorales peuvent présenter une surexpression de protéines anti-apoptotiques, telles que Bcl-xl (B cell lymphoma extra large), les rendant moins sensibles à la lyse cytotoxique induite par les lymphocytes T CD8+ effecteurs.

Le second mécanisme d'évasion tumorale, désigné sous le terme d'immunosubversion, implique des stratégies déployées au sein du TME pour inhiber activement la réponse immunitaire antitumorale. En plus de l'exclusion des cellules immunitaires du site tumoral, l'immunosubversion se manifeste également par le recrutement ou l'induction de cellules immunitaires ayant des propriétés anti-inflammatoires. Les cellules tumorales ont la capacité de sécréter des molécules immunosuppressives, telles que le TGFβ et l'IL-10, favorisant l'activation et le recrutement de Treg, de MDSC et de TAM de type M2-like qui amplifieront l'immunosuppression³⁶³.

Comme évoqué précédemment, ces cellules renforcent l'environnement immunosuppresseur en produisant des cytokines qui induisent la tolérance des DC et inhibent l'activation des LT CD8⁺ cytotoxiques³⁶⁴. Les MDSC synthétisent l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) ce qui entraîne la production d'oxyde nitrique (NO) connu pour perturber la signalisation du TCR et induire l'apoptose des LT CD8⁺³⁶⁴. Parallèlement, les TAM expriment l'indole-amine 2,3-dioxygénase (IDO) et l'arginase 1 (ARG1), ce qui réduit la disponibilité du

INTRODUCTION

tryptophane et de l'arginine, nécessaire à la prolifération des LT³⁶⁵. Ils sont également responsables de la production de nombreuses espèces activées de l'oxygène (ROS) qui entravent la capacité du système immunitaire à éliminer efficacement les cellules cancéreuses³⁶⁶.

Les cellules Treg, en particulier le sous-ensemble CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺, sont cruciales pour maintenir l'autotolérance périphérique et réguler l'inflammation excessive. Elles contribuent ainsi à l'homéostasie tissulaire dans des conditions normales. Toutefois, elles peuvent également faciliter la progression tumorale et les métastases dans divers types de cancer en raison de leur fonction immunorégulatrice, modulatrice de l'activité des LT CD4⁺, CD8⁺, des cellules NK, ainsi que les LB et cellules myéloïdes³⁶⁷.

Cette régulation par les Treg s'effectue au travers de leur sécrétion d'IL-10 et de TGFβ et de leur consommation élevée d'IL-2 qui réduit la disponibilité de cette cytokine pour les LT effecteurs. Les Tregs peuvent également exprimer des récepteurs d'inhibition, tels que des points de contrôle immunitaire³⁶⁸ et des ectonucléotidases comme CD73 et CD39, qui génèrent de l'adénosine avec des propriétés immunosuppressives³⁶⁹. De plus, ils ont la capacité de détruire directement les CPA ou les LT en libérant des granzymes et des perforines³⁷⁰ ainsi qu'en diminuant l'expression des molécules de costimulation CD80/86 sur les CPA par un mécanisme de trans-endocytose³⁷¹.

L'apoptose des LT CD8⁺ effecteurs peut être induite par des interactions FAS/FASL et TRAIL-R/TRAIL avec les cellules tumorales³⁷² ou par l'action fratricide d'autres LT. Dans le TME, les lymphocytes CD8 cytotoxiques en état d'hyperstimulation, subissent un épuisement. La sécrétion de diverses molécules, couplée à la présence accrue de ligands de points de contrôle immunitaire tels que PD-L1 sur les cellules tumorales qui interagit avec le récepteur PD-1 des LT, conduisent à l'inhibition de l'activation des CD8 et à leur anergie. En plus de PD-L1, d'autres molécules inhibitrices, telles que CTLA-4 et TIM-3, peuvent également être exprimées dans le TME par divers types cellulaires, notamment les cellules tumorales, stromales ou immunitaires.

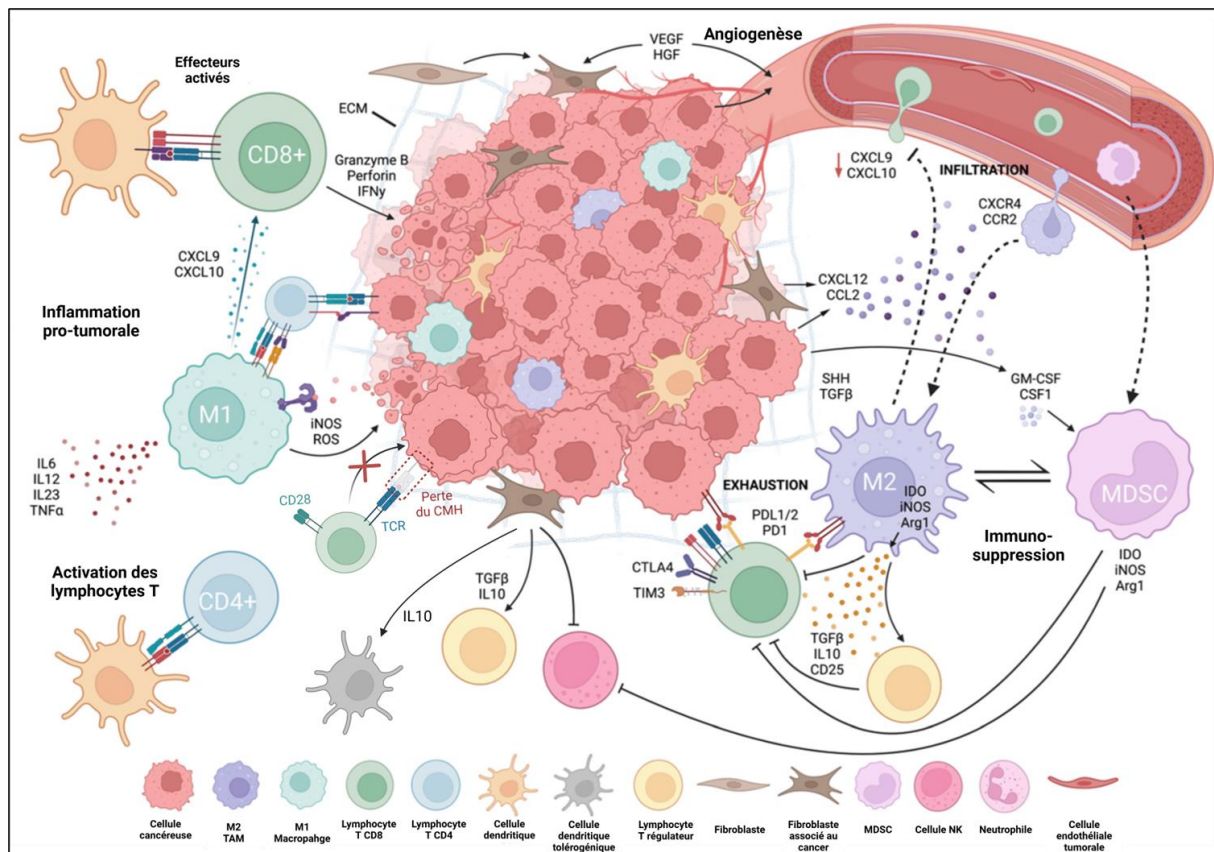


Figure 18 : Mécanismes induisant un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. Adapté de Peterson et al, ³⁷³. Les mécanismes complexes d'immunosuppression au sein du microenvironnement tumoral favorisent la progression tumorale en inhibant les réponses immunitaires effectrices. Ils sont induits par la sécrétion de cytokines inhibitrices produites par diverses cellules immunitaires, telles que les macrophages M2, les cellules myéloïdes suppressives (MDSC), et les lymphocytes T régulateurs (Tregs). Les cellules immunitaires effectrices, comme les lymphocytes T CD8+ et les macrophages M1, sont représentées dans leur tentative d'éliminer les cellules cancéreuses via la sécrétion de molécules cytotoxiques, mais leurs efforts sont entravés par l'expression de molécules inhibitrices (comme PD-L1, CTLA-4) et par la sécrétion de cytokines suppressives (TGFβ, IL10) par les cellules immunosuppressives. Les fibroblastes associés au cancer (CAF) contribuent également au microenvironnement immunosuppresseur, réduisant l'efficacité des réponses immunitaires et facilitant la progression tumorale.

Ces éléments font du microenvironnement tumoral un contexte particulièrement défavorable à l'activité des lymphocytes CD8. Les différents mécanismes associés intéressent à juste titre la communauté scientifique pour espérer rétablir une réponse immunitaire antitumorale efficace. Ceci inclut notamment les stratégies thérapeutiques utilisant des Immunes Checkpoint Inhibitors, comme discuté dans le chapitre précédent sur le cancer pulmonaire.

A ce stade du descriptif de l'écosystème et du microenvironnement tumoral, on mesure que les acteurs du développement de la tumeur sont multiples et que les cellules malignes ont développé des stratégies pour surmonter les tentatives de contrôle de leur multiplication anarchique. Elles manipulent les signaux des tissus environnants pour favoriser leur croissance et elles acquièrent la capacité à échapper à la surveillance immunitaire. Elles

INTRODUCTION

transforment le stroma autour d'elles en environnement favorable, capable d'assurer un apport suffisant en oxygène et en nutriments pour satisfaire des besoins métaboliques élevés.

Au cœur du TME, un autre acteur cellulaire longtemps ignoré émerge comme pièce maîtresse du remodelage du microenvironnement, révélant un double jeu fascinant. Ces nouveaux acteurs sont les ECs du système vasculaire mis en place dans la tumeur. Garanties de la survie tumorale, elles se retrouvent également au centre des intrigues de l'immunité antitumorale et des stratégies d'échappement. Autrefois en arrière-plan, elles suscitent un intérêt grandissant et elles captivent désormais l'attention pour leur influence déterminante dans la dynamique tumorale.

CELLULE ENDOTHELIALE ET CANCER

Les vaisseaux sanguins tumoraux pourraient être comparés à un réseau routier chaotique et anarchique³⁷⁴. Leur structure est caractérisée par une instabilité et une perméabilité excessive, résultant de jonctions endothéliales lâches, ce qui favorise le développement d'œdèmes et une pression interstitielle augmentée de 20 à 50 mmHg³⁷⁵. La fragilité structurelle découle également de l'absence ou du recrutement insuffisant de péricytes assurant traditionnellement la stabilisation des vaisseaux partiellement provoquée par une synthèse déséquilibrée de molécules telles que les facteurs de croissance et les prostaglandines³⁷⁶.

Contrairement à l'architecture ordonnée des vaisseaux normaux, ceux présents dans les tumeurs démontrent une configuration tortueuse et sinueuse, avec des variations de diamètre. Cette irrégularité reflète la croissance anarchique des cellules tumorales environnantes. La formation des vaisseaux tumoraux est désorganisée, avec une disposition désordonnée des ECs et une hiérarchie floue entre artérioles, capillaires et veinules. Cette désorganisation altère l'efficacité de la circulation sanguine au sein de la tumeur, entraînant un flux souvent irrégulier, marqué par des zones d'hypoperfusion et d'hyperperfusion. Cette hétérogénéité de la perfusion peut engendrer des zones d'hypoxie propices à l'agressivité tumorale et une administration non uniforme de chimiothérapies induisant des résistances. Ces caractéristiques structurelles et fonctionnelles émanent d'un processus d'angiogenèse tumorale dysfonctionnel, et contribuent activement à l'établissement d'un TME permettant la progression tumorale.

INTRODUCTION

Une relation stricte entre progression tumorale et vascularisation a été mise en avant pour la première fois par Folkman en 1971 dans son hypothèse du « switch angiogénique », publiée dans le *New England Journal of Medicine*³⁷⁷. Selon Folkman, une phase déterminante dans l'oncogénèse survient lorsque la tumeur en croissance induit la formation de nouveaux vaisseaux afin de satisfaire ses besoins en oxygène et nutriments. Ce mécanisme est fondamental pour permettre à la tumeur de dépasser une taille critique et potentiellement métastaser.

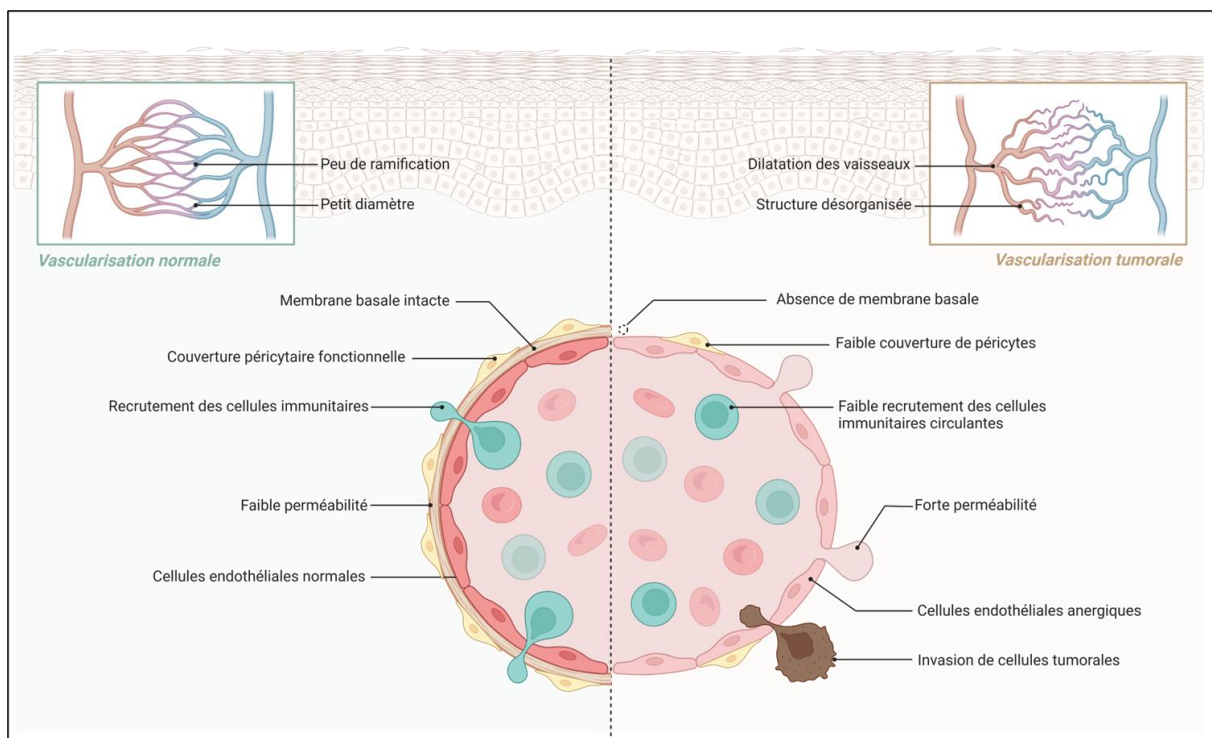


Figure 19 : Divergence entre les vaisseaux sanguins sains et tumoraux. Sous l'influence de l'environnement tumoral, les vaisseaux sanguins proches de la tumeur sont caractérisés par une structure désorganisée et fragile facilitant la dissémination des cellules tumorales dans la circulation sanguine. Cette fragilité s'explique par la perte de la couverture péricytaire et par une membrane basale dégradée. Les cellules endothéliales qui composent ces vaisseaux ne répondent plus aux signaux inflammatoires et sont en état d'anergie qui ne leur permet plus de recruter efficacement des cellules immunitaires dans les tissus.

Initialement, les tumeurs sont petites, dépourvues d'un réseau vasculaire propre. Elles tirent leur subsistance des vaisseaux sanguins préexistants à proximité. Leur croissance reste ainsi contrainte, limitée à une taille de quelques millimètres. Cependant, lorsque la tumeur dépasse le seuil de 1 à 2 mm, il devient impératif qu'elle développe sa propre infrastructure vasculaire. Quelques années plus tard, Folkman et Hanahan complètent l'hypothèse en attribuant un rôle critique au « switch angiogénique » dans la sortie de dormance tumorale, c'est-à-dire la capacité de la tumeur à établir un réseau vasculaire connecté avec l'environnement extra-tumoral³⁷⁸.

INTRODUCTION

En effet, seules les tumeurs capables de mettre en place un réseau vasculaire prospèrent, tandis que les autres stagnent à l'état microscopique en raison du manque d'oxygène et de nutriments qui favorise l'apoptose. Des études post-mortem chez des sujets apparemment sains ont révélé la présence de petites tumeurs dormantes dépourvues de formation active de vaisseaux sanguins dans divers organes, tels que le sein, la prostate et la thyroïde³⁷⁹⁻³⁸². Il est donc postulé que l'absence de néovascularisation est un facteur expliquant pourquoi certaines tumeurs ne progressent pas vers un cancer invasif³⁸².

À un certain stade de la progression tumorale, les cellules tumorales commencent à synthétiser et à sécréter des médiateurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF-A. Cette sécrétion peut être initiée par des stimuli environnementaux stressants, notamment l'hypoxie, qui survient lorsque la taille de la tumeur dépasse la capacité des vaisseaux sanguins environnants à répondre à ses besoins. Ce phénomène marque le commencement du processus d'angiogenèse tumorale.

NEOVASCULARISATION ET PROGRESSION TUMORALE

La néovascularisation au sein des tumeurs résulte de plusieurs processus cellulaires résumés dans la figure 20. L'angiogenèse germinative est considérée comme le mécanisme le plus important de la vascularisation tumorale¹⁹. Bien que le mécanisme de base de l'angiogenèse germinative soit globalement conservé en contexte tumoral, sa régulation, son déroulement et les conséquences sur la vascularisation diffèrent. La première différence concerne l'initiation. L'angiogenèse germinative dans des tissus sains est finement régulée par un équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques tels que le fibroblast growth factor (FGF), le VEGF, l'IL-8 et le PDGF-B et les facteurs anti-angiogéniques tels que la thrombospondine-1, l'endostatine et l'angiostatine. L'initiation du processus répond à des besoins physiologiques spécifiques, tels que la cicatrisation des plaies, la croissance normale des tissus, ou pendant la menstruation. Le processus est activé de manière transitoire et s'arrête une fois que le besoin en nouveaux vaisseaux est satisfait, ce qui n'est pas le cas dans une tumeur.

Dans le contexte malin, l'angiogenèse est souvent déclenchée de manière aberrante et continue, principalement en réponse à l'hypoxie au sein de la tumeur. Les cellules tumorales produisent une quantité excessive de facteurs pro-angiogéniques, avec en tête le VEGF-A, qui joue un rôle central dans l'activation des ECs angiogéniques. Cette suractivation provoque une

INTRODUCTION

prolifération accélérée et une migration désordonnée des EC, entraînant une angiogenèse anarchique, caractéristique des tumeurs. En plus du VEGF, d'autres facteurs pro-angiogéniques sont sécrétés par les cellules cancéreuses, tels que le FGF, les angiopoïétines (Ang), l'EGF et le PDGF-B. Ce cocktail pro-angiogénique est renforcé par l'inhibition des facteurs anti-angiogéniques, comme la thrombospondine-1 (TSP-1), DLL4, la vasohibine-1 (VASH1) et DSCR-1 (région critique du syndrome de Down), limitant ainsi les mécanismes de contrôle de la néo-vascularisation. Cette désactivation des inhibiteurs de l'angiogenèse est fréquemment liée à des mutations du gène p53, un régulateur clé de la croissance cellulaire et de la suppression tumorale, dont l'altération entraîne une diminution de l'expression de TSP-1³⁸³. Cette cascade d'événements favorise la formation de vaisseaux sanguins pathologiques.

Au sein du TME, les cellules tumorales ne sont pas les seules à produire des médiateurs pro-angiogéniques. Les TAM sécrètent du VEGF-A, du FGF2, le placental growth factor (PlGF) et le TNF α . Ces macrophages libèrent également des protéases, dont les métalloprotéinases matricielles (MMP) et les cathepsines qui dégradent la MEC. Des facteurs pro-angiogéniques auparavant immobilisés dans la MEC deviennent alors biodisponibles et stimulent l'angiogenèse^{384,385}. Enfin, les CAF aussi jouent un rôle dans l'angiogenèse tumorale. À l'instar des cellules immunitaires, elles produisent divers médiateurs dont le VEGF-A, le FGF2 et le CXCL12 qui contribuent à la dynamique complexe de l'angiogenèse dans le contexte tumoral^{384,386}.

Comme précisé dans le premier chapitre de l'introduction sur la dynamique cellulaire à l'origine de l'angiogenèse, les ECs vont se différencier en cellules de front sous l'action de facteurs pro-angiogéniques. Les cellules de front développent de multiples filopodes et acquièrent des caractéristiques phénotypiques associées à la mobilité et l'invasion, tout en sécrétant des enzymes qui dégradent la MEC. Elles répondent à des gradients de cytokines (principalement VEGF) pour migrer vers la tumeur³⁸⁷. Parallèlement, les cellules endothéliales voisines adoptent, par un mécanisme d'inhibition moléculaire, un comportement de cellules de soutien, suivant ainsi les cellules de front dans leur progression. Lorsque les nouveaux vaisseaux approchent de la tumeur, ils établissent des connexions avec d'autres structures vasculaires par anastomose, contribuant ainsi à la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux (Figure 20).

INTRODUCTION

Outre ce mécanisme d'angiogenèse, des recherches ont démontré que les tumeurs peuvent également établir leur propre réseau vasculaire et accéder à des nutriments par le biais de mécanismes de vascularisation alternatifs. Ceux-ci incluent la division des vaisseaux sanguins via le phénomène d'angiogenèse intussusceptive, la cooptation des vaisseaux préexistants et l'adoption de caractéristiques vasculaires par les cellules tumorales appelé mimétisme vasculaire ou «vascular mimicry»^{253,388,389}.

Les mécanismes moléculaires régissant l'angiogenèse intussusceptive demeurent partiellement élucidés, bien que ce phénomène puisse être stimulé par des facteurs de croissance tels que le VEGF, le PDGF-B et l'érythropoïétine³⁹⁰⁻³⁹². L'angiogenèse intussusceptive a été identifiée pour un large éventail de cancers comme le mélanome, le cancer colorectal, les glioblastomes et les carcinomes mammaires³⁹³⁻³⁹⁶. Des xénogreffes d'un adénocarcinome humain exploitent ce mécanisme comme une stratégie de remodelage vasculaire accéléré dans les tumeurs³⁹⁵. Il est postulé que l'angiogenèse intussusceptive joue un rôle crucial dans l'expansion tumorale en augmentant la diversité et la densité des structures microvasculaires au sein de la néoplasie.

Un des mécanismes alternatifs de vascularisation est la cooptation vasculaire, un phénomène documenté pour la première fois par Francesco Pezzella dans les années 1990^{253,397}. Ce mécanisme permet aux cellules tumorales d'exploiter des vaisseaux déjà existants, sans avoir à induire une nouvelle angiogenèse³⁹⁸. Les cellules tumorales migrent le long de la face externe des vaisseaux puis envahissent les tissus sains environnants et modifient la structure vasculaire de l'organe hôte. Leur incorporation entraîne un élargissement et un détournement des vaisseaux durant le développement tumoral³⁹⁹. La cooptation vasculaire est particulièrement fréquente dans les tumeurs primaires et métastatiques et est souvent corrélée à un pronostic défavorable³⁹⁸.

Les organes où cette stratégie est la plus couramment observée incluent le foie, le cerveau et le poumon, tant pour les tumeurs primitives que pour les métastases qui y apparaissent. En effet, des modèles de croissance cooptive ou alvéolaire ont été identifiés dans près de 50 % des CBNPC et dans environ un tiers des CBPC^{400,401}.

INTRODUCTION

Une équipe de recherche a exploré la dynamique cellulaire au cours du processus à l'aide d'un modèle murin de tumeur pulmonaire résistante au traitement anti-angiogénique. Dans ce modèle, le ciblage du VEGF-A par l'anti-angiogénique sunitinib conduit à la cooptation des vaisseaux⁴⁰². Dans cette étude, les ECs et les péricytes des vaisseaux cooptés affichaient un profil transcriptomique similaire à celui de leurs homologues sains et une population de macrophages impliqués dans le remodelage de la matrice a été identifiée comme potentiel acteur de la cooptation.

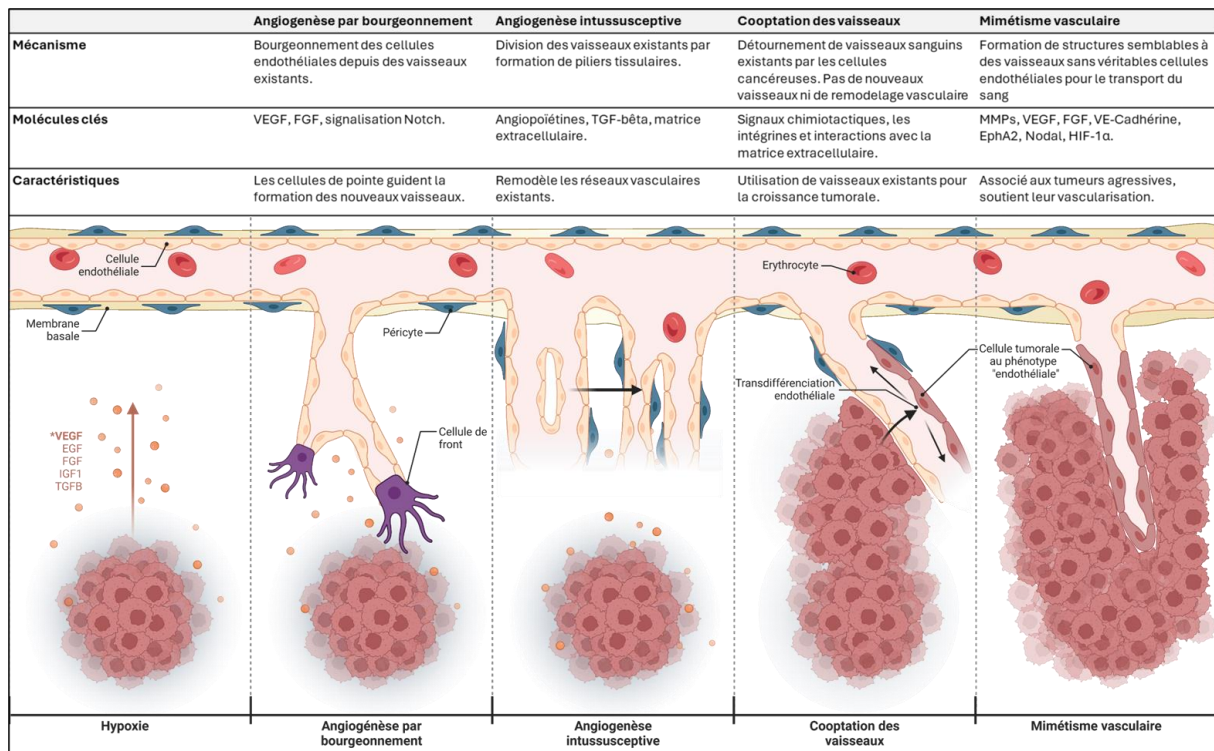


Figure 20 : Angiogenèse pathologique et néovascularisation tumorale. Adapté de Ackermann et al,⁴⁰³. L'angiogenèse par bourgeonnement permet la néovascularisation de la tumeur en induisant la formation de nouveaux vaisseaux. L'angiogenèse intussusceptive s'appuie sur l'existence de vaisseaux préexistants et induit leur division ce qui augmente le nombre de vaisseaux irriguant la tumeur. Les phénomènes de cooptation et de mimétisme vasculaire concernent la capacité des cellules tumorales à agir elles-mêmes pour assurer leur oxygénation en proliférant autour des vaisseaux existants ou en créant des structures semblables aux vaisseaux sanguins mais sans cellules endothéliales.

La dernière stratégie de néovascularisation adoptée par les cellules tumorales est le mimétisme vasculaire. Au cours de ce processus, les cellules cancéreuses forment des canaux tapissés de cellules tumorales qui s'intègrent au réseau vasculaire préexistant, avec ou sans accumulation de protéines matricielles⁴⁰⁴. Ce phénomène a été initialement démontré par Maniotis et al. en 1999 dans un modèle de mélanome malin⁴⁰⁵. Les chercheurs ont avancé l'hypothèse que cette architecture vasculaire atypique résulte d'une dédifférenciation des cellules tumorales vers un phénotype se rapprochant de celui des ECs.

INTRODUCTION

Les implications cliniques de ce mécanisme sont des tumeurs plus agressives, souvent associées à des résistances accrues aux traitements anticancéreux. Tout comme pour le phénomène de cooptation, les mécanismes sous-jacents à l'initiation du mimétisme vasculaire ne sont pas entièrement élucidés, bien que des interactions avec les cellules du TME semblent jouer un rôle clé dans ce processus⁴⁰⁶.

CELLULES ENDOTHELIALES TUMORALES

Les anomalies de la vascularisation tumorale ne sont pas seulement la conséquence des mécanismes atypiques d'angiogenèse et des études de plus en plus nombreuses indiquent que les ECs constituant ces vaisseaux présentent des caractéristiques discriminantes. Les cellules endothéliales tumorales (TEC) se distinguent des cellules endothéliales normales (NEC) par des variations dans leurs profils métaboliques, génétiques et transcriptomiques, ainsi que par des attributs phénotypiques et fonctionnels uniques. Sur le plan morphologique, les TEC présentent une surface cellulaire irrégulière leur conférant une capacité à constituer des endothéliums multicouches, contrairement aux NEC qui s'organisent en une seule couche²⁹. Les travaux de Sievert et al. ont établi que les TEC sont de plus grande taille que les NEC. Elles se propagent plus rapidement au sein d'une architecture vasculaire plus désordonnée, tout en montrant une capacité d'adaptation réduite aux variations du flux sanguin. De plus, la structure tubulaire développée par les TEC se caractérise par une moins grande ramification par rapport aux NEC. Par ailleurs, les TEC ont démontré une surexpression du marqueur des cellules souches CD34 ainsi que des marqueurs associés à l'angiogenèse tels que la CD61 (intégrine β 3) et la CD105 (endogline)⁴⁰⁷.

Une autre caractéristique essentielle des TEC est leur potentiel de prolifération élevé. Elles présentent un métabolisme marqué par une hyperglycolyse, s'appuyant en grande partie sur la glycolyse aérobie pour satisfaire leurs exigences énergétiques. C'est ce qui a été montré dans des TEC issues de mélanome ectopiques murins⁴⁰⁸ ou isolées à partir de biopsies humaines de CBNPC⁴⁰⁹. Cette forte demande énergétique se traduit par un contenu en ARN pouvant atteindre quatre fois celui des NEC⁴¹⁰. De plus, les TEC manifestent une instabilité génomique, illustrée par des anomalies chromosomiques telles que des aneuploïdies, des délétions, des translocations et la présence de centrosomes surnuméraires^{411,412}.

INTRODUCTION

Dans le cadre de la formation des métastases, la fragilité structurelle des vaisseaux tumoraux facilite l'entrée des cellules tumorales dans la circulation sanguine. Les TECs participent à l'établissement de nouvelles niches tumorales à distance en protégeant, lors de leur voyage dans le système sanguin, les cellules tumorales de l'anoikis, un mécanisme de mort cellulaire programmée déclenché par la perte d'ancrage aux MEC⁴¹³.

Au cœur du TME, un ensemble complexe de facteurs semble pouvoir engendrer une surprenante hétérogénéité de populations de ECs, révélant ainsi une dynamique jusque-là insoupçonnée, en particulier dans ses aspects pathologiques. Par exemple, le processus d'EndoMT, décrit dans la section sur la plasticité endothéliale de cette introduction, est induite chez les TECs en présence de TGF- β sécrété dans le TME, et contribue à l'extravasation et à la dissémination des cellules tumorales. En effet, l'EndoMT entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire due à la perte de molécules d'adhésion (claudines et VE-cadhérine) et un remodelage du cytosquelette⁴¹⁴.

Par ailleurs, des études de scRNAseq ont révélé de multiples profils attestant de l'hétérogénéité endothéliale intra-tumorale^{410,415}. En particulier, les travaux de Goveia et al., comparant des biopsies d'adénocarcinome pulmonaire et des tissus sains ont permis d'identifier 13 populations distinctes de ECs humaines, variant selon la provenance tissulaire. Parmi les populations de TECs, un groupe possédant un profil transcriptomique pro-angiogénique représentant 8% du pool endothélial total a été retrouvé ainsi qu'une population aux caractéristiques de ECs de veinules postcapillaires activées, exprimant des gènes aux fonctions immunorégulatrices tel que CCL14⁵⁷.

Ces spécificités renforcent l'hypothèse d'une implication fonctionnelle des ECs dans le paysage immunitaire tumoral. Les TECs occupent en effet une position stratégique, à l'interface entre le TME et le système vasculaire. Elles constituent le point de rencontre initial entre les cellules immunitaires en circulation et le stroma tumoral⁴¹⁰. Ainsi, les TECs avec leurs capacités de présentation antigénique peuvent influencer l'immunogénicité du TME en orchestrant activement le processus de recrutement des cellules immunitaires et en exerçant des propriétés régulatrices de l'immunité telles que l'activation et l'amorçage des LT⁴¹⁶.

INTRODUCTION

Il est par ailleurs établi que, de manière similaire aux lymphocytes T effecteurs, les ECs peuvent entrer dans un état d'anergie suite à une stimulation excessive par des cytokines pro-inflammatoires et angiogéniques, limitant ainsi leur capacité d'activation. En effet, il a été démontré que la pré-incubation des ECs avec VEGFA ou bFGF inhibe l'augmentation des molécules d'adhésion induite par le TNF α via l'inhibition de NF- κ B et l'activation de la voie p38-MAPK^{417,418}. Des études in vivo renforcent ces résultats, montrant que l'administration de bFGF supprime l'expression de ICAM1 et VCAM1, ainsi que l'adhésion des cellules immunitaires aux parois des vaisseaux sanguins⁴¹⁸⁻⁴²⁰.

À ce jour, les études portant sur la barrière endothéliale tumorale se sont largement concentrées sur les interactions d'adhésions entre l'endothélium et les LT mais évolue de plus en plus vers leur capacité de semi APC. Par exemple, les TECs des adénocarcinomes montrent une réduction de l'expression des gènes associés au recrutement des cellules immunitaires (ICAM1 et VCAM1), au chimiotactisme (CCL2 et CCL18), mais également à la présentation d'antigènes (HLA-I/HLA-II)⁴¹⁰, ce qui suggère une diminution du recrutement des cellules immunitaires et de leur activation³⁰. De plus, les TEC semblent avoir la capacité d'augmenter l'expression de marqueurs d'adhésion spécifiques, impactant la direction des réponses immunitaires. À cet égard, le récepteur endothélial lymphatique commun et l'endothélium vasculaire (CLEVER 1) exprimé par les TEC, a été identifié comme une molécule immunosuppressive, facilitant l'infiltration des Treg ainsi que celle des TAM^{421,422}. La figure 21 donne un aperçu des activités régulatrices et de la dualité fonctionnelle des TECs d'après les dernières données bibliographiques.

En effet, au-delà de freiner leur infiltration dans le tissu tumoral, les TECs possèdent aussi le pouvoir d'amorcer l'inactivation des LT, ajoutant de la complexité au rôle qui leur est attribué dans l'évasion immunitaire. En effet, les ECs dans les tissus pulmonaires humains et murins surexpriment des gènes codant pour FasL¹⁷⁵. Ce ligand Fas (FasL, CD95L) est un composant clé de la mort cellulaire programmée⁴²³ et en réponse à certains facteurs tels que le VEGF, l'IL-10 et la prostaglandine E2 (PGE2), les TECs sont stimulées pour exprimer FasL. Cette expression entraîne l'apoptose des LT CD8⁺ effecteurs, tout en épargnant les Tregs. Ce phénomène de protection des Tregs est attribué à une élévation de l'expression de la protéine inhibitrice c-FLIP dans ces cellules¹⁷⁵. De plus, les TEC d'adénocarcinome pulmonaire surexpriment les molécules co-inhibitrices PD-L1 et PD-L2⁴²⁴, ce qui participe à l'inhibition de

INTRODUCTION

l'activité des LT au sein du TME. Dans un modèle murin de mélanome, une augmentation de l'expression d'IDO par les TEC a également été observée après stimulation par de l'IFN γ . Ce nouveau phénotype TEC a ainsi contribué à l'immunosuppression locale en privant les LT de tryptophane essentiel à leur activation⁴²⁵.

Une étude récente menée en Belgique a identifié l'autophagie comme l'un des principaux mécanismes anti-inflammatoires de la vascularisation tumorale, atténuant l'immunité dans un modèle de mélanome. En effet, l'expression génique des facteurs impliqués dans la voie NF- κ B et diverses molécules d'adhésion ont été significativement up-régulées dans les TECs de souris mutées ayant perdu la capacité d'autophagie. Les gènes concernés comprenaient VCAM1, ICAM1, SELE et SELP ainsi que des cytokines et des chimiokines telles que : IL6, CX3CL1/fractalkine, CXCL2, CXCL1. Cette étude a également souligné que l'autophagie des TECs limite la réponse au traitement anti-PD1 dans le mélanome, puisque les patients répondeurs ont montré une fraction plus importante de LT CD8⁺ interagissant avec les TECs présentant une signature inflammatoire⁴²⁶.

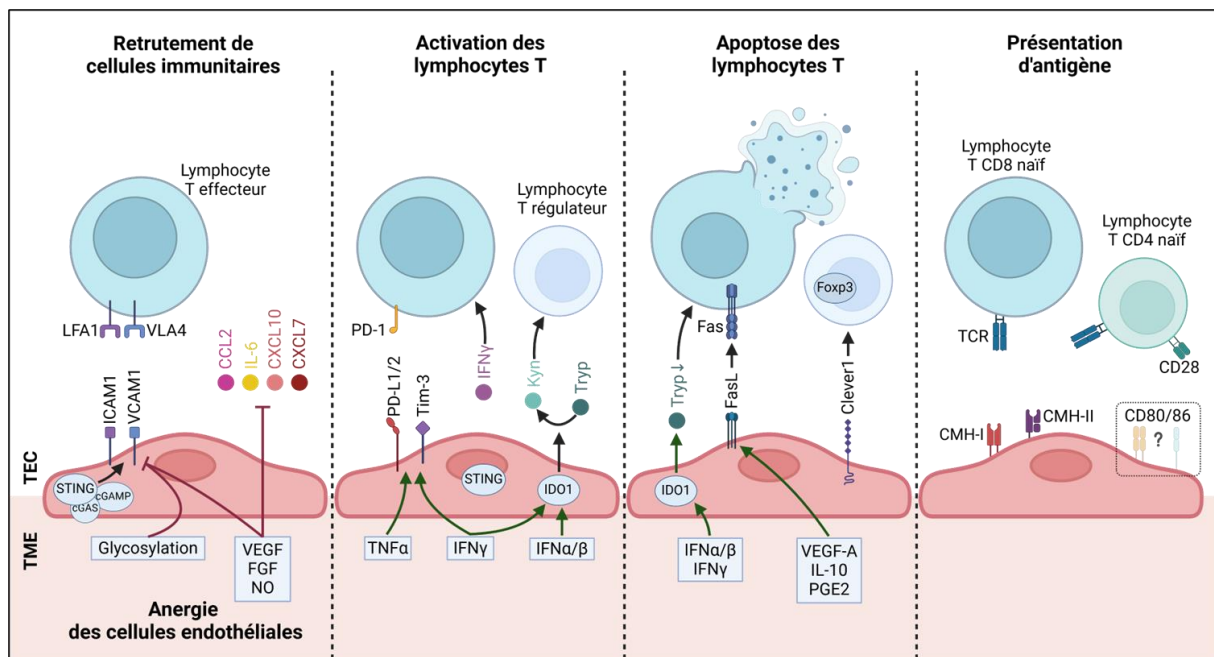


Figure 21 : Capacités immunomodulatrices des cellules endothéliales tumorales. Adapté de Nagl et al,⁴²⁷. Les TECs se situent au cœur d'une dualité fonctionnelle qui oppose les mécanismes d'immunosuppression à ceux d'immunoactivation dans le TME. Influencées par les signaux environnementaux, ces cellules diminuent l'expression des molécules d'adhésion indispensables à l'infiltration des cellules effectrices dans le TME. Par exemple, les TECs peuvent induire une immunosuppression en favorisant l'anergie des lymphocytes T via l'expression de PD-L1 et par la sécrétion de molécules telles que l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO1). Parallèlement, elles sont capables d'initier une réponse antitumorale en modulant les voies de signalisation STING/cGAS, sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et présentant des néoantigènes tumoraux aux lymphocytes T. Néanmoins, leur contribution à l'éducation des lymphocytes T naïfs demeure encore mal définie. Ce schéma souligne l'importance de la plasticité des TECs dans la balance entre immunosuppression et activation immunitaire au sein des tumeurs.

INTRODUCTION

En revanche, certaines études ont indiqué que l'inflammation tumorale chronique peut engendrer des cellules endothéliales pro-inflammatoires similaires aux HEV, phénomène également observé dans d'autres tissus soumis à une inflammation chronique. De plus, la population de ECs de veinules postcapillaires activées, identifiée par les travaux de Goveia et al., et dont l'abondance est accrue dans les CBNPC, serait associée à une signature génétique caractéristique des HEV ainsi qu'à une augmentation de l'expression d'ACKR1 régulateur majeur de l'activité des chimiokines endothéliales.

La découverte de vaisseaux sanguins présentant des caractéristiques analogues à celles des HEV, décrites avec les TLS dans le 1er paragraphe, a conduit à la formulation de l'hypothèse selon laquelle certains vaisseaux tumoraux pourraient exercer un rôle bénéfique en renforçant l'immunité anti-tumorale. Les HEV jouent un rôle crucial en tant que régulateurs de la réponse immunitaire au sein des TLS. Leur présence est corrélée avec un pronostic favorable. Situés en périphérie des TLS, les HEV facilitent le recrutement des cellules immunitaires vers les sites d'inflammation. Cependant, les HEV tumoraux (TA-HEV) ne se localisent pas systématiquement dans les TLS. Ils peuvent également être détectés dans le TME, particulièrement au sein des zones contenant une forte densité de LT et de DC matures mais sans LB associés.

Des études en microscopie intravivante ont révélé que les TA-HEV constituent les principaux sites d'adhérence et d'extravasation des lymphocytes dans les tumeurs⁴²⁸. Contrairement aux HEV ganglionnaires, souvent considérés comme « matures », les vaisseaux HEV des tumeurs affichent des caractéristiques « immatures », mais témoignent d'un profil plus pro-inflammatoire, avec une expression accrue de la P-sélectine⁴²⁹. Alors que les HEV ganglionnaires sont principalement impliqués dans le recrutement de lymphocytes naïfs, les TA-HEV sont capables d'attirer également des lymphocytes T activés, qui sont des acteurs essentiels de l'immunité anti-tumorale⁴³⁰. Sur le plan clinique, des études suggèrent que la présence d'HEV pourrait constituer un facteur pronostique favorable pour les patients atteints de CBNPC⁴³¹ et parmi les approches thérapeutiques, l'induction de la formation d'HEV au sein du TME est en cours d'investigation⁴³².

INTRODUCTION

Les TECs se trouvent au centre d'un dilemme scientifique fascinant : tout en possédant la capacité de stimuler une réponse immunitaire contre la tumeur, elles sont également dotées de mécanismes puissants d'immunosuppression qui favorisent l'évasion tumorale. Ce paradoxe met en lumière le rôle complexe de ces cellules, oscillant entre alliées potentielles du système immunitaire et complices dans la progression tumorale. Cette dualité constitue un défi pour le développement ou l'amélioration de nouvelles stratégies thérapeutiques. Parmi les stratégies prometteuses, le remodelage des vaisseaux sanguins émerge comme une approche clé pour optimiser l'efficacité des thérapies actuelles. Plusieurs de ces techniques ont non seulement franchi avec succès les étapes des essais cliniques, mais elles commencent également à démontrer leur véritable potentiel en offrant des résultats concrets et encourageants chez les patients.

THERAPIES CIBLANT LES ECS DANS LE CANCER

En s'appuyant sur ses recherches relatives à la dormance tumorale et au phénomène de switch angiogénique, Folkman a proposé que l'inhibition des voies de signalisation angiogéniques pourraient limiter la néoangiogenèse et favoriser la dormance des tumeurs. Ce concept novateur a suscité un grand engouement au sein de la communauté scientifique. En 2003, un essai clinique a montré que l'association de la chimiothérapie avec des anticorps neutralisants ciblant le VEGF-A prolongeait la survie des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Cette découverte a conduit la FDA à approuver en 2004 l'utilisation de traitements anti-angiogéniques car ayant démontré leur efficacité dans la lutte contre le cancer⁴³³. Par la suite, plusieurs anticorps et inhibiteurs de la tyrosine kinase, visant à freiner la signalisation pro-angiogénique, ont été autorisés en tant que thérapies.

Selon la dose et une fenêtre de temps particulière, le traitement anti-angiogénique entraîne une normalisation vasculaire. En principe, la normalisation des vaisseaux conduit à l'élagage sélectif des vaisseaux immatures conduisant à une amélioration de l'intégrité et des fonctions du réseau vasculaire restant⁴³⁴. Morphologiquement, cet effet est attribué à des jonctions cellulaires endothéliales plus stables, avec une perméabilité réduite grâce à une couverture homogène et optimale par les péricytes et la membrane basale⁴³⁵. La normalisation vasculaire, dans le cadre des traitements anti-angiogéniques, est en grande partie due à l'inhibition du facteur de croissance VEGF-A, qui en retour augmente l'expression

INTRODUCTION

de l'angiopoïétine-1 (Ang1). Cette dernière favorise le recrutement de péricytes supplémentaires, stabilisant ainsi de manière bénéfique la paroi vasculaire.

Le processus de normalisation du réseau vasculaire tumoral ouvre de nouvelles voies thérapeutiques qui viennent renforcer l'efficacité de la chimiothérapie néoadjuvante et de l'immunothérapie. Le couplage des deux types de traitements améliore la perfusion tumorale ainsi que l'infiltration des LT effecteurs. Cela optimise leurs fonctions antitumorales, facilite l'établissement d'une mémoire immunitaire et diminue les effets d'un environnement immunosuppresseur. En effet, le VEGF-A est impliqué dans la suppression de la maturation des DC, l'augmentation du nombre de Tregs et le renforcement des fonctions immunosuppressives des TAM⁴³⁶⁻⁴³⁹. Par conséquent, cibler le VEGF-A avec des traitements anti-angiogéniques contribue à atténuer l'immunosuppression présente dans le TME.

De plus, les thérapies anti-angiogéniques augmentent l'expression des molécules d'adhésion et favorisent le recrutement des cellules immunitaires⁴⁴⁰. Fait intéressant, l'association de l'ipilimumab et du bevacizumab a entraîné l'activation des TECs⁴⁴¹, et des études in vitro ont révélé que cette association favorise l'expression de la E-sélectine, de l'ICAM-1 et du VCAM-1 sur les TEC, ainsi que l'adhésion des lymphocytes T activés aux TEC en augmentant les niveaux d'IL-1 α et de TNF- α ⁴⁴². Toutefois, malgré la liste toujours plus longue des médicaments anti-angiogéniques approuvés par la FDA⁴⁴³, l'efficacité des thérapies anti-angiogéniques reste limitée, fournissant souvent un soulagement temporaire de la progression tumorale avant l'émergence de résistances et qui s'accompagnent de bénéfices finalement modestes en termes de survie.

D'autres médiateurs responsables de l'anergie endothéliale ont été identifiés comme des cibles thérapeutiques prometteuses pour rétablir les réponses immunitaires anticancéreuses⁴⁴⁴. À titre d'exemple, les antagonistes de l'oxyde nitrique (NO) ont démontré leur capacité à restaurer l'adhésion des LT aux ECs en induisant une régulation positive des molécules adhésives^{445,446}. Par ailleurs, l'administration de la protéine NGR-TNF provoque une induction de VCAM-1 et ICAM-2 sur l'endothélium tumoral, facilitant ainsi le recrutement des LT⁴⁴⁷. Le NGR-TNF a significativement amélioré l'efficacité anticancéreuse des vaccins ainsi que des thérapies basées sur le transfert de cellules T⁴⁴⁷. Enfin, l'activation de CD137, une molécule co-stimulatrice présente sur les vaisseaux tumoraux, a également conduit à une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion sur les TECs.

INTRODUCTION

Parmi les stratégies émergentes ciblant les TECs, des avancées récentes mettent l'accent sur l'induction des vaisseaux lymphatiques HEV intratumoraux et des TLS pour renforcer l'immunité anticancéreuse. Des recherches précliniques ont démontré que certaines cytokines, notamment l'IL-7 et l'IL-15, ainsi que CXCL13, CCL21-19, TNF α et LT β (Lymphotoxin- β) peuvent favoriser la formation de HEV au sein des tumeurs et conduire à une augmentation de l'infiltration des LT et à une amélioration de la réponse aux immunothérapies^{448,449}. De plus, des stratégies combinant un traitement anti-VEGF, qui facilite la normalisation des vaisseaux, avec une immunothérapie anti-PDL1 ont été montrées comme induisant la formation de HEV^{450,451}. Parallèlement, la co-administration d'anticorps anti-PD1 avec des protéines LIGHT, a activé la signalisation NF- κ B essentielle pour la différenciation des ECs vers un phénotype HEV, et a renforcé l'immunité tumorale^{432,452}. D'autres études ont également mis en lumière le potentiel d'une approche combinée ciblant VEGFR2, PDL1 et LT β pour améliorer la formation de HEV et des TLS^{450,453}.

Les traitements visant à normaliser les vaisseaux tumoraux demeurent prometteurs pour renforcer l'efficacité de la chimiothérapie, de la radiothérapie et de l'immunothérapie. Tester cliniquement des stratégies qui améliorent le recrutement et l'activation des lymphocytes par les TECs devient essentiel, surtout face à la complexité du rôle de l'endothélium dans la progression du cancer. A titre d'exemple, l'expression de PD-L1 sur les TECs peut être modulé de manière variable en fonction des thérapies anti-angiogéniques administrées. Il a été montré que le bevacizumab a conduit à une augmentation de l'expression de PD-L1 associé aux structures vasculaires tandis qu'un traitement par inhibiteur de tyrosine kinase tel que l'anlotinib, a produit des effets opposés dans un modèle de mélanome murin⁴²⁴. Dans ce contexte, les tumeurs soumises à l'anlotinib ont montré une élévation significative du rapport entre les LT CD8+ et les Tregs. Actuellement des essais cliniques de phase 2 (ClinicalTrials.gov IDs NCT05028504 et NCT05218629) sont en cours pour évaluer l'efficacité et la tolérance de l'association de l'anlotinib avec des anticorps anti-PD-1 dans divers types de cancers.

Bien que les connaissances sur les TECs se développent rapidement, leur implication précise dans l'échappement immunitaire et la réponse aux thérapies reste très mal connue. L'un des principaux défis à venir réside dans la caractérisation détaillée du profil phénotypique et fonctionnel des TECs, avec pour objectif final l'identification de cibles thérapeutiques

INTRODUCTION

spécifiques permettant d'améliorer et de potentialiser les traitements contre le cancer. C'est dans ce cadre que cette thèse a été réalisée, contribuant ainsi à déterminer quels sont les freins techniques aux études à mener sur les TECs et dans le but d'améliorer notre compréhension des échanges au sein du TME.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

La découverte des propriétés immunomodulatrices des TECs a ouvert un champ de recherche prometteur de nouvelles stratégies thérapeutiques, tout en soulevant un défi de taille : comment aborder la variabilité observée des TECs pour en caractériser les sous-types et établir leurs rôles respectifs dans la progression et l'immunomodulation du cancer ?

Grâce aux avancées technologiques, notamment le scRNAseq, notre compréhension de la composition cellulaire et moléculaire du TME s'est considérablement affinée. Ces techniques ont permis de révéler l'hétérogénéité des transcriptomes des TECs, notamment dans le contexte du CBNPC^{57,410}. Cependant, le rôle précis des différentes sous-populations dans la modulation immunitaire restait largement méconnu. Valider les données obtenues *in vitro* et *in vivo* demeure un défi, en raison de la complexité des modèles précliniques nécessaires.

Notre équipe de recherche, spécialisée dans la vectorisation d'agents thérapeutiques pour les cancers thoraciques et l'exploration du TME immunitaire, a choisi de porter une attention particulière au compartiment vasculaire des cancers pulmonaires. Cette thèse s'inscrit dans cette dynamique, dans le but d'éclairer les fonctions des différentes sous-populations de TECs pulmonaires et d'ouvrir des perspectives pour des stratégies thérapeutiques ciblées.

Le premier objectif de ma thèse a consisté à caractériser les TECs isolées de biopsies de patients atteints de CBNPC et d'étudier la capacité des vaisseaux tumoraux à moduler l'immunité, sur des critères jamais explorés à ce jour tels que les niveaux d'expression des miRNA et la production d'EVs. La première partie de mon travail a montré que, bien que des différences transcriptomiques aient été observées, aucune distinction fonctionnelle majeure n'a pu être caractérisée *in vitro* entre les TECs et les NECs. Il n'a pas non plus été possible de dégager d'impact significatif des EVs produites par les TECs/NECs sur l'activité des LT. Il est en revanche apparu que la durée du processus de sélection des cellules après leur isolement n'était pas optimale pour l'étude de cellules aussi plastiques que les ECs.

INTRODUCTION

Face aux difficultés techniques rencontrées lors de cette caractérisation des TECs/NECs de CBNPC, le second objectif de ma thèse a été de développer des modèles alternatifs de cocultures en 2D et 3D permettant de mimer certains aspects d'un environnement tumoral, en y intégrant divers types cellulaires tumoraux et immunitaires. Ces modèles permettent d'étudier les interactions complexes entre les ECs et leur microenvironnement. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que la présence des cellules tumorales transforme les ECs de tissus sains, les orientant vers un profil TEC immunosuppresseur et/ou pro-angiogénique par contact direct. La reprogrammation des ECs pourrait ensuite influencer leurs interactions avec les cellules du système immunitaire.

Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé des cocultures en 2D des HUVECs comme modèle de tissu sain, exposées à des cellules tumorales de lignées issues de CBNPC. Après 2 jours, les ECs ont été isolées puis mises au contact de différentes cellules immunitaires afin d'observer les altérations de la réponse immunitaire. En parallèle, une étude par scRNAseq a été menée sur un modèle 3D de sphéroïdes multicellulaires combinant des cellules de CBNPC, des ECs, des fibroblastes et des monocytes, pour approfondir notre compréhension des interactions cellulaires au sein du TME.

Au cours de mes travaux de thèse j'ai pu montrer que les cellules tumorales induisent une transformation des ECs qui les oriente vers un profil inflammatoire, influençant à son tour le comportement des cellules immunitaires dans le TME. Ces découvertes, qui apportent un nouvel éclairage sur les dynamiques complexes du TME et font l'objet d'un article scientifique dont je suis le premier auteur. Concernant cet article, nous comptons dans un premier temps, le déposer pour publication dans Biorxiv avant de le soumettre au *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*.

RESULTATS



CELLULES ENDOTHELIALES TUMORALES : PARTENAIRES DE
L'IMMUNOSUPPRESSION

INTRODUCTION/CONTEXTE

La problématique de la recherche des fonctions immunorégulatrices des TECs posée, un premier objectif de ma thèse était d'obtenir des TECs à partir de biopsies de patients atteints de CBNPC, de caractériser leurs phénotypes et d'explorer les mécanismes de leur reprogrammation et de leurs fonctions au sein du TME. Les travaux que je présente pour cet axe initial de ma thèse m'ont mobilisée pendant les deux premières années avant de céder la priorité à la mise en place de modèles alternatifs. Cette décision a été prise en raison de contraintes techniques qui se sont révélées limitantes pour mener à bien le projet.

La caractérisation de sous populations de TECs et de leurs fonctions faisait suite aux précédents travaux de Lucas Treps, directeur de cette thèse, qui avait révélé l'hétérogénéité des populations de TECs dans le TME du CBNPC. Un des résultats remarquables obtenus au cours de son étude concernait la mise en évidence d'une sous-population particulière de TECs dont le transcriptome suggérait une activité immunitaire.

Cette découverte nous a conduits à chercher un moyen d'isoler cette sous-population particulière de TECs pour l'étudier spécifiquement *ex vivo*. Cependant, devant l'absence de marqueur véritablement discriminant, nous avons opté pour une analyse de l'ensemble de la population de TECs provenant de CBNPC, avec pour objectif de comparer ces cellules à leurs homologues non tumoraux (NECs) issus des tissus sains du même patient.

Nous sommes partis du postulat que les TECs, sous l'influence du microenvironnement, présentent un transcriptome/protéome différent de celui des NECs et que cette modification de leur phénotype agit sur les étapes clés de la réponse immunitaire antitumorale. Ce postulat a soulevé plusieurs questions essentielles :

- Les TECs influencent-elles l'infiltrat immunitaire dans les tumeurs pulmonaires ?
- Participent-elles à l'anergie des LT anti-tumoraux ou, au contraire, à leur activation ?
- Et si oui, par quels mécanismes les TECs modulent-elles l'infiltration immunitaire et la réponse anti-tumorale : par contact direct et/ou via la communication par les EVs ?

RESULTATS

Ma démarche expérimentale s'est articulée autour de deux axes principaux. Le premier consistait à approfondir les connaissances sur les différences fonctionnelles entre les NECs et les TECs *in vitro*, afin de mieux comprendre leurs rôles dans la réponse immunitaire. Le second axe visait à étudier le rôle des TECs dans l'activité immunitaire avec un focus sur la communication intercellulaire par les sEVs, pour déterminer leur contribution dans la modulation de la réponse anti-tumorale.

RESULTATS

MATERIELS & METHODES

EXTRACTION DES TEC/NEC A PARTIR DE BIOPSIE ET ENRICHISSEMENT EN CD31

Après la résection chirurgicale de CBNPC (réalisée au Service d'oncologie thoracique, CHU Nantes), des échantillons de la tumeur et du tissu distal ont été prélevés et confiés au centre de recherche. À leur réception, les échantillons ont été lavés avec une solution phosphate-buffered saline (PBS), découpés en fragments de moins de 1 mm³, puis transférés dans 5 ml de milieu de digestion. Ce milieu était constitué de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) enrichi en glucose (4500 mg/l), supplémenté en pénicilline/streptomycine (100 U/ml, Thermo Fisher Scientific), en pyruvate de sodium (1 mM), en acides aminés non essentiels (NEAA MEM, 1x), en solution vitaminique MEM (1x), en glutamine (2 mM), en héparine (10 U/ml, PromoCell), et en facteurs de croissance endothéliaux dérivés (ECGF; kit EGM-2, PromoCell). De plus, il contenait 0,1 % de collagénase I, 0,1 % de collagénase II (Thermo Fisher Scientific), de la DNase I (75 U/ml) et de la dispase (2,5 U/ml). Les échantillons ont été incubés pendant 30 minutes à 37 °C avec une agitation manuelle réalisée toutes les 5 minutes. Par la suite, 10 ml de PBS froid avec 0,1 % d'albumine sérique bovine (BSA) (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés, et filtrés à 100 µm (Corning). Après centrifugation à 1200 tr/min à température ambiante pendant 5 minutes, le surnageant a été soigneusement éliminé, et les culots cellulaires, resuspendues dans du milieu Endothelial Cell Growth Medium MV2 (C-22022, PromoCell) puisensemencé dans une plaque pré-coatée avec de la gélatine 0,1%.

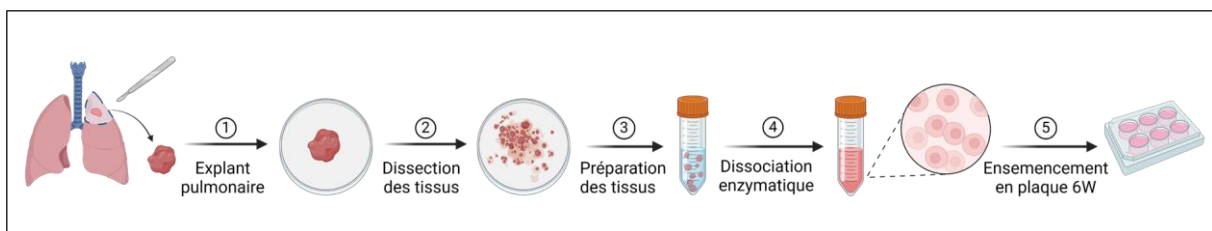


Figure 22 : Extraction des cellules endothéliales de tissus pulmonaires humains. Dans un premier temps, après la résection chirurgicale, les explants pulmonaires de tissus sains et tumoraux sont transportés au centre de recherche (1) où ils sont disséqués pour faire des fragments de de 1 mm³ (2). Ils sont transférés dans une solution de digestion (3) puis laissés 30 minutes à 37 °C pour la dissociation enzymatique (4). La suspension cellulaire obtenue est centrifugée etensemencée dans des plaques pré-coatées à la gélatine (5).

Une fois que les cellules ont proliféré, les ECs ont été enrichies à l'aide du système MACS (Miltenyi Biotec) avec des billes magnétiques coatées avec un anti-CD31 selon les instructions du fabricant. Les cellules triées ont ensuite été centrifugées et réensemencées dans une plaque 6 puits pour amplification.

RESULTATS

CULTURE CELLULAIRE ET GENERATION DE LIGNEE CELLULAIRE ET CLONE T

Les TEC/NECs sont cultivées dans un milieu Endothelial Cell Growth Medium MV2 (C-22022, PromoCell) supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal, 5 ng/ml de facteur de croissance épidermique, 10 ng/ml de facteur de croissance des fibroblastes (bFGF), 20 ng/ml de facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF Long R3), 0,5 ng/ml de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire 165 (VEGF), 1 µg/ml Acide ascorbique, 0,2 µg/ml Hydrocortisone, 100 U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine.

Les clones de cellules T CD8+ CTL03.1 et N5.14 ont été obtenus comme décrit précédemment^{454,455}. Le N5.14 est spécifique de l'antigène MUC1 porté par un HLA-A2, et CTL03.1 spécifique de HLA-A*0201/Melan-A(26-35) (EAAGIGILTV). Ces LT sont maintenus en milieu de culture Roswell Park Memorial Institute Medium-1640 (RPMI, #31870-025, Gibco) supplémenté avec 2mM de L-Glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et 5 % d'UltraGRO (AventaCell) et 150 UI d'IL-2 (Proleukin, Novartis, Bâle, Suisse).

Les lignées cellulaires cibles utilisées pour les essais de cytotoxicité *in vitro* étaient des lignées cellulaires modifiées. Brièvement, les particules rétrovirales contenant le plasmide NanoLuciférase (NLuc) ont été exprimées dans la lignée cellulaire Lenti-X 293T (plasmide pMX2.1 Nluc). Des surnageants provenant de cellules Lenti-X ont ensuite été ajoutés deux fois par jour pendant 4 jours sur une lignée d'adénocarcinome : ADCA 117 (Biocollection CHU Nantes France). Les cellules transduites ont ensuite été sélectionnées à l'aide de puromycine à raison de 1 µg/ml pendant une semaine. Enfin, elles ont été testées pour l'expression de NLuc en mesurant la luminescence libérée après une incubation de 15 minutes avec une concentration croissante de Digitonine (Promega, Madison, WI, États-Unis ; Cat#G9441). Les ADCA 117 sont cultivées dans un milieu RPMI supplémenté avec 2mM de L-Glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF EUROBIO CSV SVF 00-01).

Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C, maintenu à une atmosphère à 5% de CO₂ et une humidité de 100%. Des tests pour détecter la présence de mycoplasmes dans les cellules sont réalisés régulièrement avec le kit PlasmoTest™ (InvivoGen).

RESULTATS

MIGRATION SPONTANEE

Les TEC/NECs sont ensemencées à 5000 cellules par condition dans une plaque 96 puits et le suivi de la migration des cellules est réalisé pendant 24 heures par mesure de phase en microscopie (IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis, Essen Bioscience). Les analyses des images sont réalisées avec le logiciel ImageJ-win 64⁴⁵⁶, en utilisant les plugins « Tracking “ avec ” Manual Tracking », les paramètres de suivi sélectionnés : intervalle de temps : 60 min, calibration x/y : 1.24µm, calibration z : 0. 2.

SCRATCH ASSAY

Les cellules sont ensemencées à 200 000 cellules dans une plaque à 24 puits en milieu MV2. Après 16 heures, 0,5 mg/ml de mitomycine C (Sigma, M4287) a été ajouté pour arrêter la prolifération des cellules. Six heures plus tard, une blessure est faite dans chaque puits avec une pointe de 100µl sur la longueur du puits. Des images ont été prises avec l'Incucyte S3 toutes les 3 heures, et les analyses ont été faites avec le logiciel ImageJ-win 64.

TUBULOGENESE 2D

Dans une plaque 96 puits froide, 40µl de matrigel (ECM, Corning®) sont déposés et laissés 30 minutes à 37°C pour polymérisation. Les cellules sont ensemencées à 15 000 cellules par puits sur le matrigel polymérisé. La formation de tube est observée en temps réel pendant 6 heures par vidéomicroscopie (Nikon, objectif 4X). Les images à 6 heures sont analysées avec le logiciel ImageJ avec le module “Angiogenesis analyser” développé par Carpentier et al.⁴⁵⁷.

TEST D'ADHESION DES PBMCS

Les ECs ont été cultivées dans des plaques à 24 puits recouvertes de gélatine afin d'obtenir une monocouche cellulaire confluite. Les cellules ont été activées de deux manières différentes, soit en étant exposée la nuit à du LPS 1µg/ml ou pendant 6 heures à un cocktail de cytokines (6nM TNFα et IL1-β). Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) ont été prélevées sur un donneur sain (Etablissement Français du Sang), isolées à l'aide d'un gradient de Ficoll (Eurobio, Cat#CMSMSL01-01). Les PBMCS ont été marqués avec de la calcéïne AM (Life, C3100MP). Le milieu a été éliminé et les HUVECs ont été lavées avec du PBS avant l'ajout de 2 x 10⁶ PBMCS par puits et incubées pendant 1 heure à 37°C. Les cellules non adhérentes ont été éliminées par un lavage délicat 7 fois avec du PBS. Les taux

RESULTATS

d'adhésion cellulaire ont été déterminés par imagerie de cellules vivantes à l'aide de l'appareil IncuCyte (Sartorius). Une dizaine de champs de vue par puits sont choisis au hasard et analysés avec Fiji pour déterminer le nombre de PBMCs adhérents par champ.

CYTOMETRIE EN FLUX

Les cellules sont lavées en PBS puis marquées avec les anticorps indiqués dans le Tableau 2 pendant 30 min à 4°C. Les LT ont été analysées à l'aide d'un cytomètre Canto II (BD Biosciences) tandis que les ECs ont été analysées à l'aide d'un cytomètre Symphony A5 (BD Biosciences). L'acquisition est faite sur le logiciel Diva 8 tandis que l'analyse est réalisée sur Flowjo V10.

Tableau 2 | Anticorps utilisé en cytométrie.

Réactivité (fluorochrome)	Dilution finale	Référence (fournisseur)
CD25 (BV421)	1/100	564033 (BD)
CD31 (Alexa Fluor 488)	1/200	303110 (Biolegend)
VE-cadhérine (PE)	1/50	348506 (Biolegend)
ICAM-1 (APC-Fire 750)	1/200	353122 (Biolegend)
PD-L1 (BV421)	1/100	563738 (BD)
CD34 (488)	pas d'info	303110 (Biolegend)

RT-QPCR

L'ARN est isolé des cellules avec le kit NucleoSpin RNA Plus (Macherey-Nagel) puis la quantification et la validation de la pureté des ARNs obtenus sont dosée par mesure d'absorbance à 260 nm, 280 nm et 230 nm par un NanoDrop (Thermo Scientific). Une transcription inverse est réalisée en utilisant le kit RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (RT) (Thermo Scientific) à partir de 500 ng d'ARN contenus dans 10 µL qui sont alors incubés avec 1 µL de dNTP et 1 µL d'oligonucléotides dT(12-18) pendant 5 min à 65 °C. 4 µL de tampon, 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de RNase OUT (Invitrogen) et 1 µL de Moloney Murine Leukemia Virus-RT sont ajoutés et les échantillons sont incubés pendant 50 min à 37 °C puis 15 min à 70 °C.

RESULTATS

L'ADN complémentaire (ADNc) ainsi généré est utilisé pour des expériences de qPCR ou à envoyer au séquençage. Les expériences de qPCR ont été réalisées à l'aide du Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) et un thermocycleur QuantStudio 3 (Thermo Scientific). Chaque échantillon de réaction a été analysé en duplica et les CT obtenus ont été normalisés sur ceux du gène de ménage RPLP0 (protéine ribosomique, sous-unité P0 de la protéine ribosomique) pour obtenir les $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilisés pour calculer les changements d'expression relatifs

Tableau 3 | Séquences des amorces utilisées en qPCR

Gènes	Primers sens	Primers anti-sens
RPLP0	5'-GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT-3'	5'-GATGACCAGCCCAAAGGAGA-3'
CD274	Qiagen QT00082775	Qiagen QT00082775
ITGA6	5'-AAATACCAAACCAACACAGG-3'	5'-TACTGAATCTGAGAGGGAAC-3'
USF1	5'-GACGCACTATACTTACTTCC-3'	5'-TCACAAAGAATTGACCAGTG-3'
PCGF3	5'-GAGTTCTATCACAAATTGGGC-3'	5'-TTTGTGTTGAACTGTCGTCTG-3'

SEQUENÇAGE 3'RNA-SEQ ET MIRNOME

Le séquençage 3'RNA-seq a été effectué par la plateforme GénoA (SFR Bonamy, Nantes) selon le protocole publié (<https://doi.org/10.21203/rs.3.pex-1336/v1>). Le miRnome a été effectué selon le protocole développé dans l'article de Labbe et al.⁴⁵⁸.

ACTIVATION DES CLONES EN PRESENCE DE LEURS CIBLES

Les clones sont co-cultivés avec des cellules cibles et des TECs ou des NECs pendant 4 heures. Pour évaluer la lyse spécifique, les cellules clone CTL03.1 ont été co-cultivées avec une lignée cellulaire de M6-Nluc (contrôle négatif) et M113-Nluc HLA-A02 en présence de TECs ou de NECs à un ratios lymphocytes T/cellules cibles/EC (20:1:1). La cytotoxicité a ensuite été évaluée en mesurant la luminescence de la nanoluciférase libérée dans les puits de culture.

10 μ L d'échantillon sont déposés en plaque 96 puits à fond blanc (#655083, Greiner bio-one) et complétés par 35 μ L de PBS ou de tampon NanoGlo[®] selon indication. Le substrat de la luciférase, la Coelenterazine-h (Interchim) est ajouté à une concentration finale de 3 μ M. Le signal de luminescence émis lors de la production de coelenteramide par la Nluc est mesuré avec un luminomètre Mithras LB 943 (Berthold, temps d'acquisition = 0,1s).

RESULTATS

PREPARATION DES SEVS

Les surnageants des cultures cellulaires sont d'abord centrifugés à 300 ×g pendant 10 min pour éliminer les cellules en suspension puis à 2 000 ×g pendant 10 min afin d'enlever les débris cellulaires. Ils sont ensuite ultracentrifugés à 10 000 ×g pendant 30 min (ultracentrifugeuse Optima L-80XP (Beckman Coulter) rotor SW-32Ti) pour éliminer les microvésicules. Pour purifier les sEVs, une ultracentrifugation est réalisée à 100 000 ×g pendant deux heures. Les culots sont lavés en PBS filtré à 0,22 µm lors d'une seconde ultracentrifugation à 100 000 ×g puis resuspendus dans 200 µL de PBS filtré.

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE POUR L'IMAGERIE DES EVS

Les culots des EVs purifiées par ultracentrifugation sont repris et fixés dans 200 µL de PBS 2% paraformaldéhyde (#47377, Electron Microscopy Sciences) filtré à 0,22 µm. Les images ont été acquises par le département de microscopie à l'Université de Tours. Les échantillons ont été traités par la plateforme selon le protocole suivant. Des grilles de cuivre recouvertes d'un film de carbone sont effluées pendant une nuit dans le but de les rendre hydrophiles. Une goutte de 10 µL d'échantillon est déposée sur la grille pendant 1 min 30 s avant d'être essuyée rapidement sur papier buvard. Une coloration négative est réalisée avec une goutte d'acétate d'uranyle laissée quelques secondes avant d'être essuyée sur papier buvard. Cette opération est répétée deux fois. La grille est séchée quelques minutes puis imagée au microscope électronique à transmission (MET) JEOL JEM-1400 Plus (120kV). L'acquisition est faite pendant une seconde. L'analyse des résultats a été réalisée avec le logiciel ImageJ et à partir de clichés représentatifs. Cette analyse consiste à observer si les particules analysées ont bien une morphologie attendue de sEVs.

DOSAGE DE PROTEINE

100 µL des sEVs purifiées ont été mélangés avec 100 µL de tampon de lyse radioimmunoprecipitation assay (RIPA) (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 25 mM Tris, pH 7,4) complété par un mélange d'inhibiteurs de protéases (1,04 mM aprotinin, 0,85 µM bestatin, 40 µM E-64, 14 µM leupeptin, 20 µM pepstain A). Le dosage protéique est réalisé par BCA (Bicinchonic acid assay, Interchim) et la densité optique est mesurée par spectrophotométrie à 570 nm.

RESULTATS

WESTERN BLOT

Les échantillons lysés sont dénaturés par ajout de 5% β -Mercaptoéthanol et incubés 5 min à 95°C. 3 μ g de protéines ou à défaut, 35 μ l d'échantillon sont mis à migrer sur gel Bis-Tris 4-20% (SurePAGE, GenScript). La migration est réalisée à 200 V pendant 45 min avec le MESbuffer (GenScript). Les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidene difluoride, Membrane Immobilon-P, Millipore) durant une heure à 100 V dans un tampon Tris-Glycine 10% Méthanol. L'immunodétection des protéines d'intérêt est ensuite réalisée après une étape de saturation d'une heure à température ambiante avec du Tris Buffered Saline 0,1% + 5% lait. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire de souris (Tableau 4) en TBS-T + 5% lait pendant une nuit à 4°C sous agitation. Après lavages en TBS-T, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase de raifort (HRP, Jackson Immuno Research, #115-035-006, concentration finale : 0,2 μ g/ml) pendant une heure à température ambiante. Pour la révélation, le substrat d'ECL (ClarityTM Western ECL Substrate, Biorad) est déposé sur la membrane pendant 5 min à température ambiante. La révélation se fait avec l'imageur ChemiDocMP System (Biorad). Les images sont analysées avec le logiciel Image Lab 5.0 (BIORAD).

Tableau 4 | Anticorps utilisé en Western blot

Réactivité (clone)	Concentration finale	Référence (fournisseur)
CD9 (1021007)	1 μ g/ml	MAB25292 (R&D)
CD63	0,5 μ g/ml	#10628D (Invitrogen)
Anticorps secondaire anti-souris conjugué HRP	Inconnue, dilué au 1/2000 ^{ème}	115-036-072 (Interchim)

ATTUNE

Les EVs sont marquées pendant 30 minutes à 4°C avec un mélange d'anticorps anti-tetraspanins (CD9, CD63 et CD81) ou des isotypes contrôle correspondants conjugué à l'allophycocyanine (APC) et anti-CD31 conjugué à la phycoerythrin (PE). Pour éliminer les agrégats, les anticorps ont été centrifugés à 15 000 \times g pendant 3 minutes avant le marquage. Les EVs ont ensuite été analysés à l'aide d'un cytomètre de flux Attune NXT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

RESULTATS

TRAITEMENT DES CLONES AVEC LES EVS DE TEC/NECS

Les cellules N5.14 sont co-cultivées avec des exosomes dérivés de TEC/NECs pendant 24 heures à une concentration de 15 µg/mL, dans un RPMI Ultragro contenant 50 UI/mL d'IL2. Ils sontensemencés dans une plaque 96 puits coatée sur la nuit avec 0,2 mg/ml d'OKT3, un anti-CD3 pour activer les N5.14 pendant la co-culture. Les exosomes sont incubés dans 200 µL d'ExoQuick-TC pendant 30 minutes à 4 °C. Le mélange est centrifugé à 14 000 rpm pendant 3 minutes et le surnageant est éliminé. Les exosomes ont ensuite été re-suspendus dans un milieu de culture et utilisés pour la co-incubation avec les cellules T CD8. A la fin des 24 heures de coculture, les N5.14 ont été récupérés et marqués avec un anti-CD25 BV421 (BD Horizon,564033) ou (Biolegend, 302630).

TEST STATISTIQUE

Sauf indication contraire, les données sont représentées sous la forme de la moyenne \pm l'écart-type de réplicats biologiques ou avec une représentation de chaque point individuel. La significativité statistique a été déterminée par un test de Mann-whitney. * p-value < 0,05 ; ** p-value < 0,01. Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel Prism 8.0 (GraphPad Software)

RESULTATS

RESULTATS

Pour explorer les différences fonctionnelles et moléculaires entre NECs et TECs dans le CBNPC, j'ai tout d'abord isolé ces cellules puis entrepris une série d'analyses visant à les caractériser *in vitro*.

CARACTERISATION FONCTIONNELLE DES CELLULES ENDOTHELIALES

A partir de biopsies de patients CBNPC fournies par le Service d'oncologie thoracique du CHU de Nantes (avec des prélèvements de tumeur et de tissu distal pour chaque patient), j'ai réussi à isoler et cultiver 7 couples de NEC et TEC. Dans un premier temps, j'ai vérifié la présence de marqueurs endothéliaux (CD31 et vWF) par microscopie confocale (Figure R1A) et par cytométrie en flux (CD31, CD34 et VE-cadhérine) (Figure R1B). Afin de comparer le potentiel d'angiogenèse respectif des TECs et des NECs, les fonctions de migration spontanée de chaque couple (Figure R1C) ainsi que leur capacité de migration après un test de fermeture de blessure (Figure R1D) ont été évaluées. Aucune différence significative n'a été démontrée entre les TECs et les NECs, bien que nous nous attendions à une augmentation des capacités migratoires des TECs comme observé par Sievert et al⁴⁵⁹. Leur capacité à former des réseaux vasculaires sur une matrice en 3D (Figure R1E) a aussi été évaluée et semble indiquer que les TECs présentent une capacité à former des réseaux vasculaires stables diminuée, en comparaison des NECs. Cependant bien que formant un réseau plus fragile, le nombre de cellules de front semble être plus important chez les TECs (Figure R1F) traduisant un meilleur potentiel angiogénique.

Malgré cette différence modeste observée dans les caractéristiques fonctionnelles classiques des TECs face aux NECs, j'ai décidé de m'intéresser au différentiel d'expression transcriptomique global entre ces deux types cellulaires. Nous espérons confirmer les observations qui avaient été faites par nos pairs sur l'expression de certains gènes et potentiellement les approfondir ou les compléter.

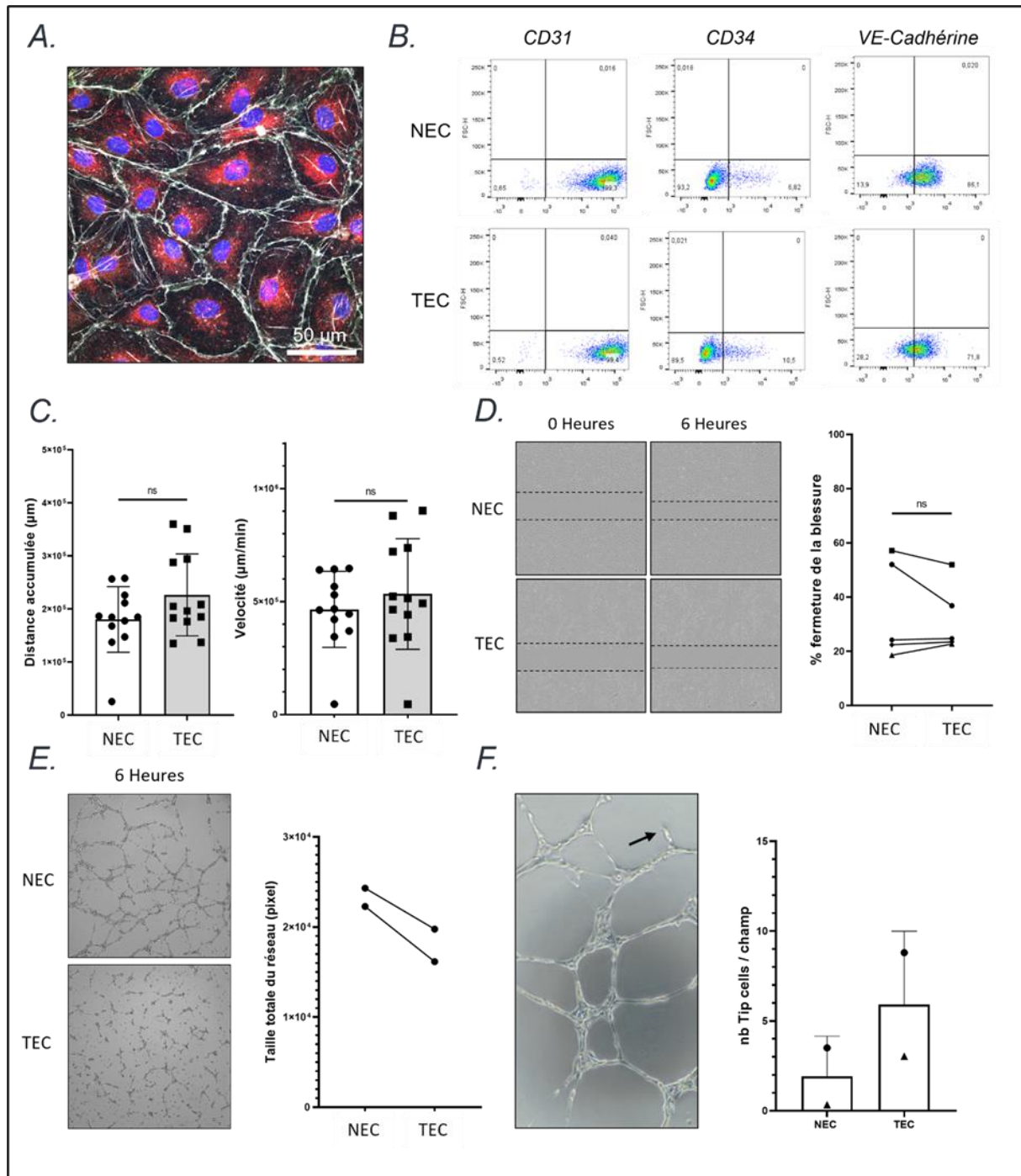


Figure R1 : Caractérisation des NECs et TECs issues de CBNPC. (A) Image des cellules endothéliales normales observée par microscopie confocale par l'intermédiaire d'un marquage CD31 (gris), VonWillebrand Factor ou vWf (rouge) et noyau (bleu). (B) L'expression des marqueurs endothéliaux CD31 et VE-cadhérine ainsi que du marqueur CD34 est mesurée par cytométrie en flux sur les populations en culture de TEC et de NEC. (C) La migration spontanée des TECs/NECs est mesurée par suivi du déplacement d'une cellule par champs dans un puits à faible confluence pendant 24 heures (n=12). (D) La migration cellulaire est mesurée par un test de fermeture d'une blessure sur une cinétique de photographies prises à l'incuCyte toutes les 3 heures pendant 15 heures. Les cellules sont préalablement traitées avec de la mitomycine pour stopper le cycle cellulaire et ainsi mesurer uniquement la capacité de migration des cellules étudiées (n=5). (E) La capacité des cellules à former un réseau vasculaire sur une matrice 3D est mesurée sur ImageJ par analyse de la taille totale du réseau et de sa complexité (n=2). (F) A partir des photos prises (E) les cellules de front (représentées par une flèche) sont identifiées selon leur morphologie et quantifiées avec le logiciel d'analyse d'image Fiji (n=2).

RESULTATS

CARACTERISATION TRANSCRIPTOMIQUE DES CELLULES ENDOTHELIALES

Après extraction des ARNs de plusieurs couples de TEC/NEC issus de nos donneurs, nous avons réalisé un séquençage 3'RNAseq sur les ARNs d'un des couples. Les analyses illustrées par le volcano-plot (Figure R2A) révèlent un ensemble de gènes qui sont soit surexprimés, soit sous-exprimés dans les TECs par rapport aux NECs. Parmi ces gènes, CRYAB se distingue comme le plus fortement surexprimé dans les TECs de ce donneur. Afin de comparer nos résultats avec des données publiées, j'ai examiné l'expression de six gènes d'intérêt fréquemment rapportés comme régulés (CD63, ENG, CD34, ESM1, CCL2, CXCR4). Contrairement aux observations traditionnelles, ESM1 et CD34, habituellement surexprimés dans les TECs, se révèlent ici sous-exprimés, de même pour les gènes codant pour la chimiokine CCL2 et le récepteur de CXCL12, CXCR4. En revanche, l'expression de CD63, connu pour être surexprimé dans les TECs, est confirmée dans notre analyse (Figure R2B).

Nous avons ensuite exploré les signatures transcriptomiques de la transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT) dans les TECs/NECs (Figure R2C). Les TECs affichent une signature mésenchymateuse plus prononcée, tandis que les NECs conservent une signature endothéliale marquée, suggérant une potentielle transition endoMT dans les TECs. Ce processus a été décrit comme impliqué dans la baisse de perméabilité des vaisseaux tumoraux et dans l'augmentation des capacités invasives des cellules tumorales.

En parallèle, j'ai réalisé un miRnome sur les ARNs des sept couples de TECs/NECs de patients atteints de CBNPC. L'analyse des miRNAs entre les TECs et les NECs a révélé une surexpression de 2 miRNA (miR-483-3p et miR-3074-5p) et une sous-expression de trois autres (miR-302a-5p, miR-210-3p et miR-138-5p), dans les TECs (Figure R2D). Le diagramme de Venn montre les gènes cibles communs entre ces miRNA (Figure R2E). Les miRNAs surexprimés ciblent 28 gènes communs tandis que les miRNAs sous-exprimés, bien que n'ayant aucune cible partagée, impactent 67 gènes. Malgré ces différences dans l'expression des miRNA, les analyses qPCR que j'ai réalisées par la suite n'ont pas montré de variations significatives dans l'expression de gènes cibles de ces régulations par miRNA (ITGA6, USF1, PCGF3, CD274) entre les TECs et les NECs (Figure R2F-H).

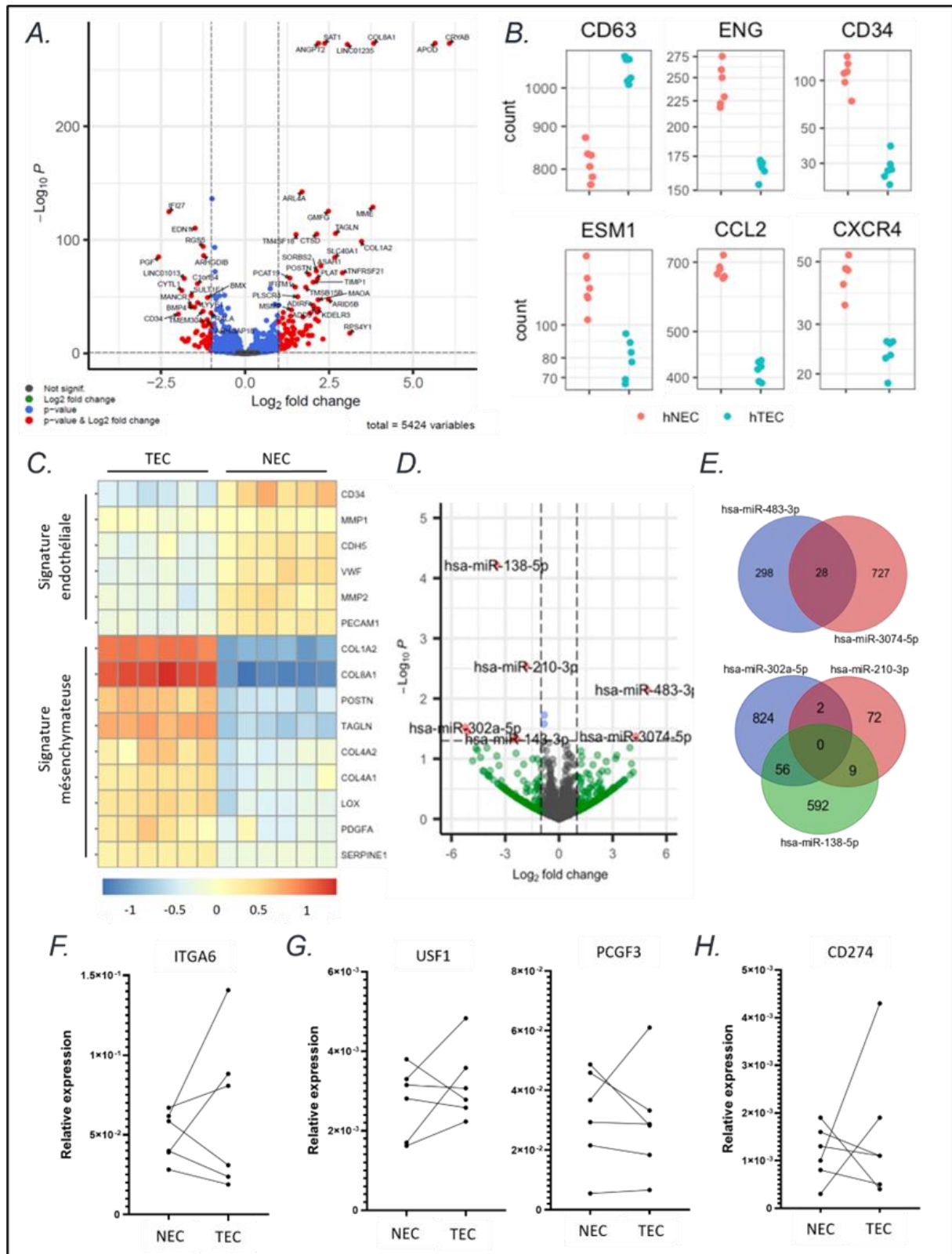


Figure R2 : Différentiel transcriptomique des NECs et TECs issues de CBNPC. (A) VolcanoPlot de la p -value ajustée montrant la différence d'expression des ARNs chez les TECs par rapport au NECs ($p < 0,05$). (B) Expression des marqueurs CD63, ENG, CD34, ESM1, CCL2, et CXCR4 chez les TEC (bleu) et NEC (rouge). (C) Heatmap illustrant les variations d'expression de plusieurs gènes clés dans la transition endothélio-mésenchymateuse entre les TEC et NEC. (D) VolcanoPlot de la p -value ajustée montrant la différence d'expression des miRNAs chez les TECs par rapport au NECs ($p < X$). (E) Diagramme de Venn montrant le nombre de gènes cibles partagés et spécifiques des miRNAs up-régulés et down-régulés dans les TECs. (F) Expression relative des ARNs ITGA6, cible du miR-302a-5p (G) USF1 et PCGF3, cible du miR-210-3p et (H) CD274 cible du miR-138-5p quantifié par qPCR.

RESULTATS

INFLUENCE DES TECs SUR LE RECRUTEMENT DE PBMCS ET SUR L'ACTIVITE DE LT EFFECTEURS

Dans le but d'évaluer les propriétés immunomodulatrices des TECs par rapport aux NECs, nous avons examiné leur capacité à influencer l'adhésion des cellules immunitaires et la cytotoxicité des LT CD8⁺.

J'ai tout d'abord étudié l'aptitude des TECs et des NECs à recruter des PBMCS en mesurant leur capacité d'adhésion sur une monocouche endothéliale (Figure R3A). Après stimulation par du LPS ou par un cocktail de TNF α et IL-1 β , une augmentation de l'adhésion des PBMCS sur les TECs et NECs (n=2) par rapport aux conditions non stimulées a pu être observée. Bien que les mesures moyennes suggèrent une adhésion légèrement supérieure des PBMCS aux TECs comparativement aux NECs, cette différence n'a pas pu être montrée comme statistiquement significative et nécessiterait de nouveaux réplicas pour dégager une véritable tendance.

Afin de préciser les mécanismes moléculaires sous-jacents, nous avons analysé en cytométrie en flux l'expression des protéines d'adhésion clés telles que la VE-cadhérine et ICAM-1 (Figure R3B). En absence de tout stimuli pro-inflammatoires extrinsèques, les NECs semblent exprimer des niveaux plus élevés de VE-cadhérine et d'ICAM-1 par rapport aux TECs. Ce résultat suggère un potentiel d'adhésion supérieur, contradictoire avec les observations faites lors du test précédent qui mesurait l'adhésion des PBMCS. Concernant l'expression de PD-L1 estimée par cytométrie en flux (Figure R3B), son niveau plus élevé sur les NECs par rapport aux TECs pourrait indiquer des différences d'interaction avec les cellules immunitaires effectrices.

Pour évaluer l'impact fonctionnel de ces différences sur la réponse immunitaire anti-tumorale, j'ai mis en place une co-culture des TECs ou des NECs avec un modèle de cellules tumorales développé au laboratoire exprimant la luciférase (N-luc) et présentant un HLA-A0201/Melan-A(26-35) (EAAGIGILTV), auxquelles sont ajoutés des LT CD8⁺ monoclonaux spécifiques de cette présentation CMH/peptide (Figure R3C). La cytotoxicité des clones de LT CD8⁺ a été mesurée en quantifiant la luminescence relarguée par les cellules tumorales lysées (Figure R3D). Les résultats que j'ai obtenus montrent que les ECs semblent potentialiser la capacité des LT CD8⁺ à lyser les cellules tumorales mais les TECs n'altèrent pas de manière significative leur activité par rapport aux NECs.

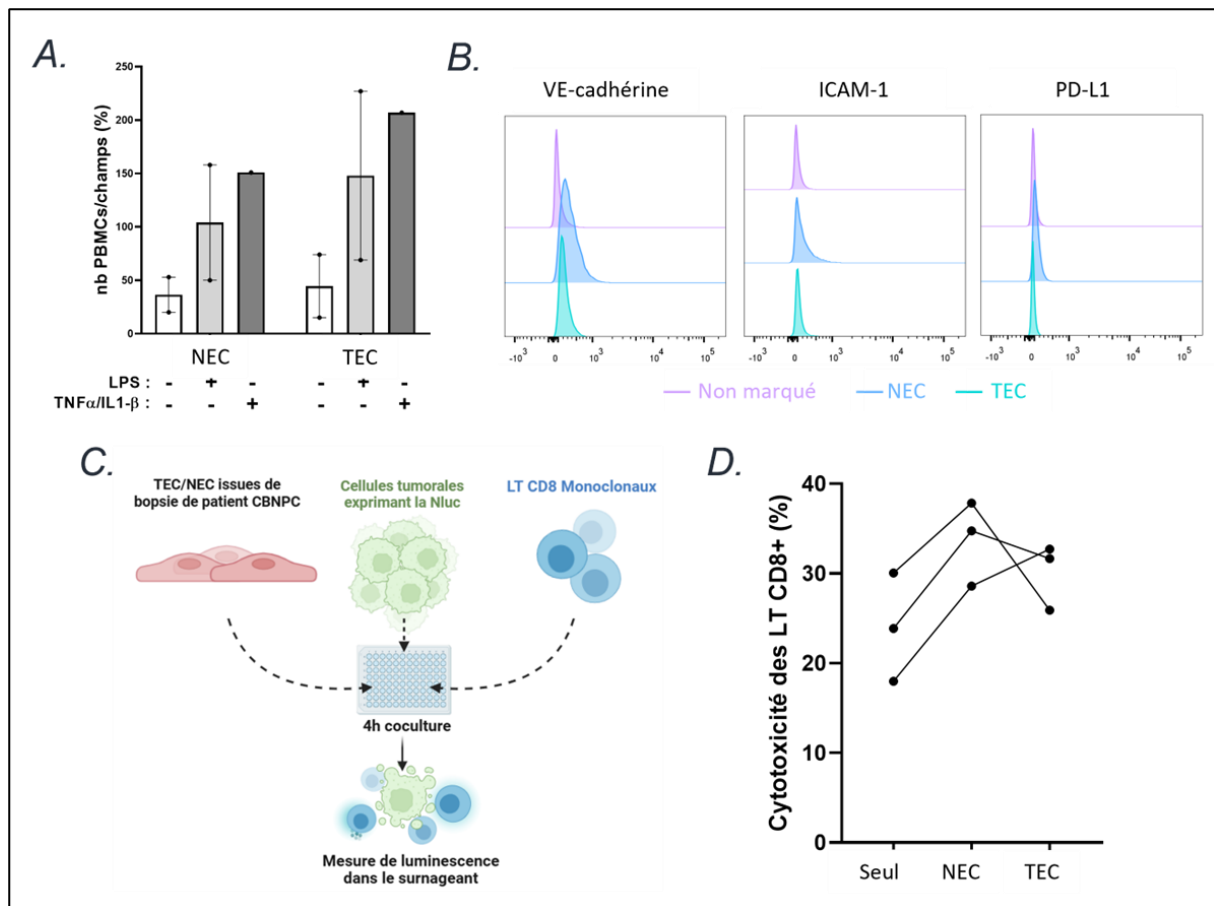


Figure R3 : Capacités immunomodulatrices des NECs et TECs issues de CBNPC. (A) Test d'adhésion de PBMCs sur une monocouche de NEC ou de TEC sans traitement ou ayant été prétraitées sur la nuit avec du LPS ou pendant 6 heures avec un cocktail de cytokines pro-inflammatoires (TNFα & IL-1β). (B) L'expression des protéines d'adhésion VE-cadhérine et ICAM-1 ainsi que du point de contrôle immunitaire PD-L1 est mesurée par cytométrie en flux sur les populations en culture de TEC et de NEC. (C) Les TEC/NECs ont été ensemencées avec les cellules tumorales reconnues par le clone et exprimant la luciférase (NLuc) dans une plaque 96 puits. Les CD8 monoclonaux sont ensuite ajoutés et laissés en coculture pendant 4 heures puis les surnageants sont récupérés et la luminescence émise par la luciférase relarguée est mesurée. (D) Cette luminescence est relative à l'activité cytotoxique des clones face à leur cible en présence de NECs ou de TECs. Le 100% correspond à la condition où les cellules ont été lysées avec un détergent.

En résumé, bien que les TECs et NECs diffèrent dans l'expression de certaines protéines d'adhésion, ces variations n'ont pas entraîné de modulations notables dans l'adhésion cellulaire des PBMCs ni dans l'activité cytotoxique des LT CD8⁺, en tout cas dans les modèles que j'ai utilisés et qui étaient basés sur des cocultures.

L'autre hypothèse que j'ai souhaitée explorer concernait les capacités différentielles des TECs et des NECs à exercer une immunorégulation non par contact, mais par signalisation et plus particulièrement au travers de l'émission de sEVs de contenus spécifiques, susceptibles d'agir dans l'immunorégulation.

RESULTATS

IMPACT DES EVS DE TEC/NECS SUR L'ACTIVITE DE LT EFFECTEURS

Les EVs sont dorénavant considérées comme des acteurs majeurs et souvent sous-estimés de la communication intercellulaire, en particulier dans le contexte tumoral où de nombreux travaux décrivent leur capacité à influencer l'environnement immunitaire. Peu de choses sont en revanche connues sur un tel mode de signalisation dirigé par les ECs en contexte tumoral. Une étude publiée en 2020, met en lumière l'impact des EVs de TECs sur la sécrétion de cytokines par des PBMCs. Le traitement avec ces EVs induit une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires et immunosuppressives⁴⁶⁰ sous-entendant une activité immunorégulatrice des TECs au travers de ce moyen de communication. Afin de caractériser l'impact des EVs issues de NECs et de TECs de CBNPC sur l'activité des LT CD8⁺, j'ai entrepris une série d'expériences qui sont décrites dans la figure R4.

J'ai eu, dans un premier temps à optimiser la production et purification des exosomes endothéliaux en suivant la méthode de référence par ultracentrifugation différentielle⁴⁶¹ (Figure R4A). Cette mise au point technique m'a permis d'obtenir des échantillons enrichis en particules. Pour répondre aux directives de l'ISEV, nous avons confirmé par microscopie électronique que les EVs ainsi purifiées présentaient la taille et la morphologie typiques attendues, sans contamination visible (Figure R4B). Nous avons validé la présence de marqueurs exosomaux les plus couramment utilisés (CD63 et CD9) par western blot (Figure R4C). A noter que nous n'avons pas de contrôle quantitatif standard dans cette expérience, et donc que la comparaison du niveau de marquage entre les TECs et les NECs n'est pas possible.

Pour compléter ces observations, nous avons passé des EVs de TEC/NEC au cytomètre Attune dont la technologie par focalisation acoustique permet d'analyser des événements de petite taille. Les marquages montrent que ces EVs expriment des marqueurs classiques tels que les tétraspanines CD63, CD81 et CD9 mais aussi le marqueur endothélial CD31 (Figure R4D-E) confirmant l'intégrité de l'échantillon et l'origine des EVs.

Nous avons ensuite cherché à savoir si les sEVs de TECs ou de NECs pourraient impacter l'activité des LT CD8⁺. Nous avons choisi d'introduire les sEVs dans un modèle développé au laboratoire et basé sur un clone de LT CD8⁺ (le N5.14) s'activant contre l'antigène MUC-1 porté par un HLA-A2 exprimé par une lignée tumorale du laboratoire⁴⁶². Comme l'illustre le schéma (Figure R4F) nous avons activé nos clones de manière aspécifique par l'intermédiaire

RESULTATS

d'un anticorps anti-CD3 (OKT3), puis nous avons exposé ces clones pendant 24 heures avec des EVs de TECs ou de NECs venant de 4 donneurs différents et un contrôle sans traitement. A la fin du temps de coculture, les clones sont récupérés et analysés par cytométrie en flux sur l'expression du marqueur d'activation CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (Figure R4G).

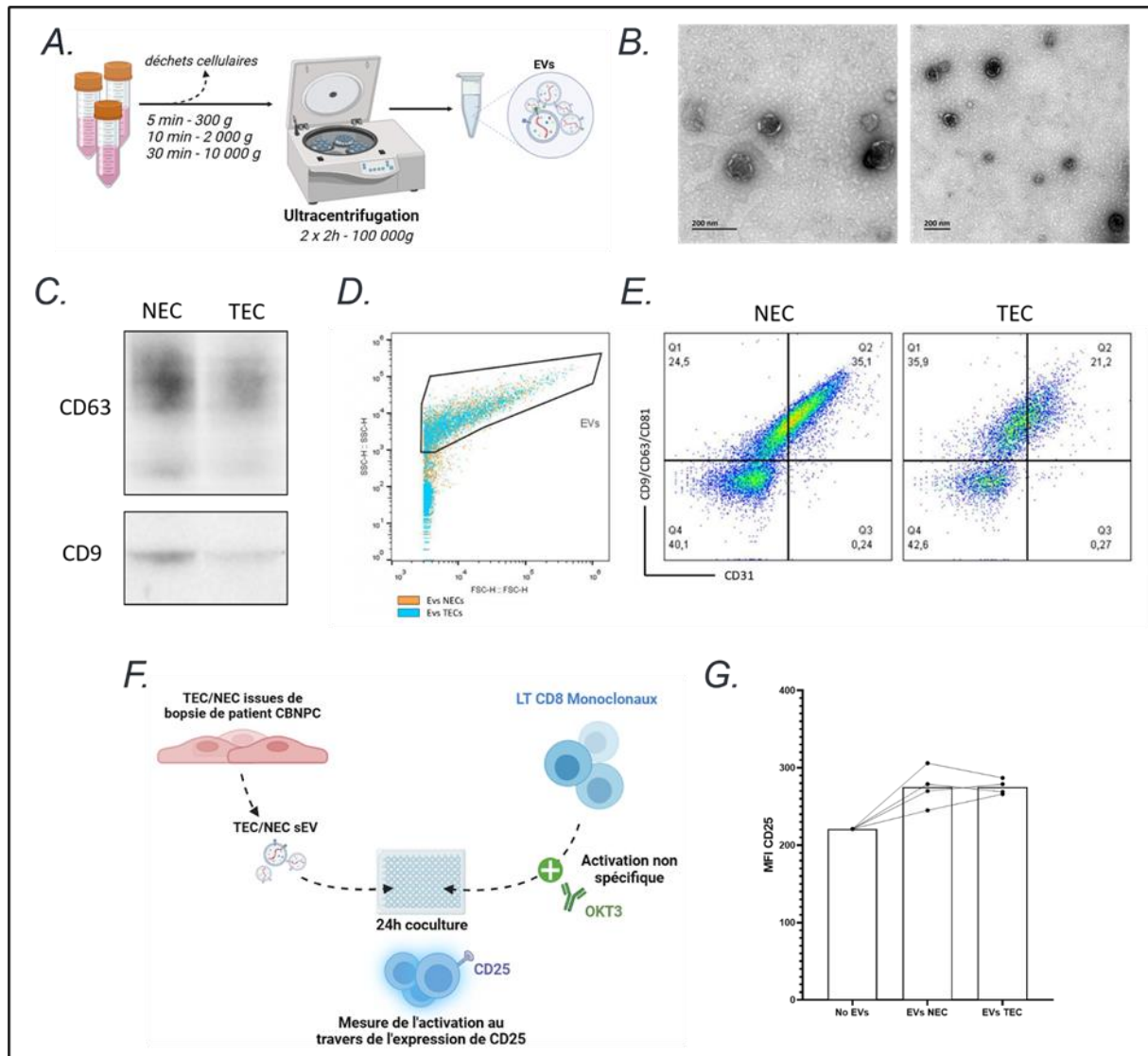


Figure R4 : Impact des EVs de NEC/TECs sur l'activité des lymphocytes T effecteurs. (A) Les EVs de TEC/NECs sont isolées à partir de surnageant de culture après plusieurs cycles de centrifugation classique pour enlever les débris, suivi de deux cycles d'ultracentrifugation. (B) La morphologie de ces EVs est observée par microscopie électronique. (C) La présence des marqueurs spécifiques aux EVs sont confirmés par Western Blot et (D) cytométrie en flux. (E) Les sEVs produits par les TEC/NECs ont été co-cultivés pendant 24 heures avec des LT CD8 monoclonaux activés de manière non spécifique par OKT3. (G) L'expression de CD25, a été mesurée par cytométrie en flux pour évaluer l'effet des sEVs sur l'activation des LT CD8.

Les résultats que j'ai pu obtenir montrent une augmentation modérée de l'expression de CD25 après exposition aux EVs, indiquant une légère tendance à l'augmentation de l'activation des clones dans ce modèle. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les effets des EVs dérivées de NECs et celles dérivées de TECs, suggérant que

RESULTATS

dans ce modèle, les EVs des deux origines exercent un effet similaire sur l'activation des lymphocytes T CD8⁺.

En résumé, les résultats de la première partie de mes travaux de thèse semblent montrer que les TECs isolées de biopsies pulmonaires ne présentent pas de différences phénotypiques significatives en termes de migration par rapport aux NECs. Cependant, elles possèdent un potentiel angiogénique plus marqué, bien que le réseau formé paraisse moins stable. Les TECs isolées présentaient des variations transcriptomiques, notamment au niveau de gènes signature de mécanismes pro-angiogéniques tels que CD105 (endogline/ENG) et immunitaires avec la chimiokine CCL2 et le récepteur CXCR4 qui sont diminués. Malgré tout, ces différences ne semblent pas affecter l'activation des LT CD8, que ce soit par contact direct ou via des EVs produites par les TECs. De plus, bien que des variations d'expression de plusieurs miRNA aient été observées entre TECs et NECs, leur impact fonctionnel reste incertain et des analyses plus approfondies demeurent nécessaires pour évaluer les effets potentiels de ces variations sur davantage de cibles.

DISCUSSION INTERMEDIAIRE

Dans cette section, je discuterai des difficultés rencontrées pour l'étude TECs /NECs et comment j'ai été amenée à réorienter le projet de thèse en cours de route. Cette réflexion préliminaire précédera une analyse globale présentée à la page 191 du manuscrit.

Pour mon étude comparative des TECs et des NECs, je me suis rapidement heurtée à des obstacles techniques et logistiques et ce dès l'isolement et la manipulation des cellules primaires issues de biopsies de CBNPC. Les échantillons dont j'ai pu disposer étaient limités et peu standardisés. Ils présentaient une diversité histologique (adénocarcinome, épidermoïde, neuroendocrinien) qui a restreint la portée de mes analyses. Les ECs, tant tumorales que non tumorales, sont dotées d'une grande plasticité, et au fil des passages en culture, subissent des transformations pouvant altérer leur phénotype initial. Cette plasticité est marquée par la perte de caractéristiques clés comme le vWF et l'acquisition progressive d'un profil fibroblastique. Cette dérive impacte les différences initiales entre les TECs et NECs que nous cherchions à étudier. De même, le temps d'enrichissement pour éliminer les fibroblastes contaminants et obtenir un nombre suffisant de ECs pour nos expériences m'a contraint à utiliser des cellules à des passages élevés, augmentant ainsi le risque de dédifférenciation et d'artefacts liés à la culture prolongée.

Bien que les modèles basés sur l'ex vivo et les cellules primaires soient précieux pour leur proximité de fonctionnement avec les cellules d'origine, ils restent sensibles aux conditions de culture. Les comportements des cellules cultivées *in vitro* peuvent être fortement influencés par des variations dans l'environnement nutritif, l'oxygénation, ou d'autres paramètres de culture. Cette sensibilité augmente la complexité de l'optimisation expérimentale et pose de sérieux défis pour garantir l'authenticité des observations. Cela a sans doute contribué au faible degré de différence entre TECs et NECs au cours des tests fonctionnels, suggérant l'émergence de populations de cellules plus homogènes et moins représentatives des conditions physiopathologiques dans nos cultures.

Par conséquent, j'ai réalisé que nos résultats devaient être interprétés avec prudence, en tenant compte des limitations inhérentes au modèle dont nous disposons. Face à la réserve nécessaire à adopter quant à notre modèle TECs/NECs maintenues en culture sur plusieurs passages et en raison de leur dérive possible, nous avons opté pour un modèle plus

RESULTATS

standard de coculture. Ce modèle associant des HUVEC pour mimer un compartiment vasculaire sain, et des cellules tumorales issues de CBNPC, nous a permis de nous affranchir du délicat maintien d'un phénotype stable qui s'est révélé critique avec des cellules isolées de patients. Nous nous sommes alors focalisés sur les effets de l'interaction des cellules tumorales avec des ECs dont la manipulation est davantage connue et maîtrisée.

MODULATION DU COMPARTIMENT VASCULAIRE PAR LES
CELLULES TUMORALES DE CANCERS PULMONAIRES ET SON
IMPACT SUR LE MICRO-ENVIRONNEMENT IMMUNITAIRE

INTRODUCTION/CONTEXTE

Les ECs constituent des acteurs majeurs dans la physiologie du microenvironnement tumoral. La transformation tumorale des ECs joue un rôle dans la progression des tumeurs, notamment à travers l'angiogenèse et l'échappement immunitaire, bien que leurs mécanismes exacts pour ce dernier point restent à élucider. Nous avons émis l'hypothèse que les cellules tumorales de CBNPC induisent des altérations phénotypiques chez les ECs environnantes au moyen d'une communication entre cellules par contact direct ou par des signaux sécrétés. Ces modifications pourraient influencer les interactions entre les ECs et les acteurs du système immunitaire, comme les LT et les macrophages, en modifiant leur activation et leur différenciation.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons étudié l'effet des contacts directs et indirects des cellules tumorales sur l'activité immunomodulatrice des ECs. Nous avons effectué un séquençage 3'RNAseq sur des HUVECs co-cultivées pendant 48 heures avec des cellules tumorales, triées en fonction du marqueur CD31 ou cocultivées en transwell. Les analyses transcriptomiques ont révélé un profil d'activation endothéliale, caractérisé par la surexpression de gènes pro-inflammatoires, notamment ceux codant pour les intégrines. Ces observations sont plus marquées lorsque les ECs sont mises en contact direct avec les cellules tumorales. Sur le plan fonctionnel, nous avons observé que les HUVECs ayant été en contact avec des cellules tumorales influencent la prolifération des LT CD4+ après activation, ainsi que l'orientation de différenciation des LT naïfs et des monocytes.

Enfin, nous avons utilisé un modèle sphéroïde 3D, intégrant différents types cellulaires (ECs, monocytes, fibroblastes, cellules tumorales), pour caractériser plus finement les profils de différenciation de chacun. Cette approche a permis d'obtenir une vision plus nuancée et détaillée des interactions cellulaires, au-delà des simples analyses de marqueurs membranaires, enrichissant ainsi notre compréhension des mécanismes d'interaction entre les cellules tumorales et l'environnement immunitaire.

En conclusion, nos résultats soutiennent l'idée que les cellules tumorales du CBNPC modifient le phénotype des ECs à proximité et entraînent des changements notables dans leur activité immunomodulatrice. Ces changements affecteraient potentiellement la réponse immunitaire dans le TME. L'utilisation de modèles 3D complexes a permis de caractériser ces

RESULTATS

interactions de manière plus approfondie, soulignant l'importance de telles approches pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la progression tumorale et à l'échappement immunitaire. Ces observations ouvrent des perspectives pour de futures recherches visant à cibler ces interactions dans le cadre de stratégies thérapeutiques anticancéreuses.

ARTICLE

In vitro models to mimic tumor endothelial cell-mediated immune cell reprogramming in lung adenocarcinoma

Morgane Krejbich¹, Judith Fresquet¹, Emilie Navarro¹, Camille Chatelain¹, Virginie Forest², Marine Cotinat¹, Valentin Isen³, Vincent Dochez⁴, David Roulois³, Nicolas Boisgerault¹, Richard Redon², Isabelle Corre¹, Christophe Blanquart¹, Lucas Treppe¹

¹Nantes Université, INSERM UMR 1307, CNRS UMR 6075, Université d'Angers, CRCI2NA, F44000 Nantes, France.

²Nantes Université, CHU Nantes, CNRS, Inserm, l'institut du thorax, F-44000 Nantes, France.

³Honeycomb team, Univ Rennes, UMR S1236, Rennes, France

⁴Service de Gynécologie-Obstétrique - CHU de Nantes

Abstract

Tumor endothelial (TECs) cells play a critical role in regulating immune responses within the tumor microenvironment (TME). However, the mechanisms by which TECs modulate immune cell population remain unclear, particularly in non-small cell lung cancer (NSCLC). Here, we investigated how NSCLC cells modulate normal endothelial cells (NECs) into TECs and the subsequent effects on immune regulation. NECs were cocultured with various NSCLC cell lines, using 2D and 3D coculture models to evaluate TEC-mediated effects on immune cells. We show that direct coculture led to significant transcriptomic, proteomic and kinomic alterations in TECs, especially in pro-inflammatory pathways. We identified a downregulation of the co-stimulatory molecule OX40L in TECs compared to NECs, suggesting impaired T-cell proliferation support. TECs showed a limited effect on CD8+ T-cell activation but affected CD4 T-cells polarizing subsets by supporting Treg and Th22 induction. Moreover, TECs also promoted M2-like macrophages polarization, thereby potentially contributing to the TME immunosuppression. Our state-of-the-art single-cell RNA sequencing of 3D multicellular tumor spheroids (MCTS) revealed distinct TEC subpopulations, including an inflammatory subset not present in 2D NEC cultures but present in 2D TEC and NSCLC human biopsy. Importantly, we also identified within MCTS a perivascular M2-like macrophage subset, predicted to interact with TECs with MIF signaling. In conclusion, TECs in NSCLC tumors play a pivotal role in remodeling the TME immune landscape by promoting immune suppression. This study highlights the complex immunoregulatory functions of TECs within our different in vitro models that mimic aspects of the TME. Our data may provide new insights into potential therapeutic strategies targeting TECs to improve the efficacy of immunotherapy in NSCLC.

Introduction

Responsible for an estimated 1.8 million deaths per year, lung cancer is one of the leading causes of cancer incidence and mortality worldwide, with non-small-cell lung cancers (NSCLC) accounting for 80-85% of cases ¹. Over the past decade, a better understanding of the biology of lung cancer, particularly the composition and activity of the tumor microenvironment (TME), has led to the development of new therapies that have improved survival ². As such, immunotherapy in the form of immune checkpoint inhibitors have revolutionized patient outcome compared to chemotherapy alone ^{3–6}.

These immunotherapies are based on the reversal of the anergy of T lymphocytes that is induced in the TME by tumor cells themselves, heterogeneous immune cells including tumor-associated macrophages (TAM), regulatory T cells (Treg) and Th2/22 cells. However, tumor progression and response to treatment may also be affected by structural cells, including cancer-associated fibroblasts (CAFs), endothelial cells (ECs), and other factors such as extracellular matrix. There is considerable evidence that tumor endothelial cells (TECs) have unique phenotypic and functional traits in comparison to normal endothelial cells (NECs) in terms of metabolism, genetics and transcriptomic profile ⁷. Moreover, a recent set of evidence indicates that TECs display immunoregulatory features that could be therapeutically relevant for cancer patients and their response to immunotherapies ^{8–13}. Current assumptions are that some TECs subsets, in the form of tumor-associated high endothelial venules (HEVs) are gatekeeper for TME infiltrating immune cells and essential for successful antitumor immunity ¹⁴, whereas other TECs act as semi-professional antigen presenting cells (APC) to activate or inhibit effector cells ¹⁵ and model tertiary lymphoid structures in the tumor ¹⁶. The difficulty in studying TECs holds in the fact that they are highly heterogeneous and plastic by nature and the lack of relevant models to study their immunoregulatory characteristics. In this study we established various models to unravel how tumor cells could remodel NECs into TECs, and how their remodeling could impact the immune system. Various approaches including single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) and functional assays are employed to reach this aim.

Materials & methods

HUVEC isolation

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were freshly isolated from umbilical cords obtained from multiple donors from the CHU Maternity, Nantes. Informed consent was obtained from all subjects. The blood from umbilical cord is rinsed with PBS and sterile gauze and 10 ml of the 0,2% collagenase type I in 0,9% NaCl + 2 mM CaCl₂ + 2X P/S, PBS and M199 solution is added in the vein and the up side clamped with a sterile clip. The umbilical cord is incubated 13 min at 37 degrees. After incubation, the umbilical cords are unclipped and the collagenase collected. The vein is rinsed with M199 medium and the cells are centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes. The cells are resuspended into a M199 medium with 2X P/S and grown on a gelatin coated T75 flask in a 37 degrees incubator with 5% of CO₂.

Cell culture, Coculture and CD31 sorting.

HUVECs were cultured in Endothelial Cell Growth Medium 2 (EGM2) media (22011B, Promocell) supplemented with 2% fetal calf serum (FCS), 5 ng/ml epidermal growth factor (EGF), 10 ng/ml basic fibroblast growth factor, 20 ng/ml Insulin-like Growth Factor (Long R3 IGF), 0.5 ng/ml VEGF 165, 1µg/ml ascorbic acid, 22.3 µg/ml heparin, and 0.2 µg/ml hydrocortisone from the Supplement Mix (C-39216) in flasks coated with 0.1% gelatin (Sigma; Lot#SLCF9893). Cells were used between passages 2-7. NSCLC cell lines, A549, H1755 and H1975 were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco (Invitrogen)) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine (Gibco (Invitrogen)), 10% FBS (Corning), and cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. All cells were tested each week to prevent mycoplasma contaminations using Plasmotest™ (Invivogen).

We conducted our coculture according to the protocol suggested by Njock and his team 17. The day before coculture HUVECs and NSCLC cell lines were rinsed with D-PBS and placed in EGM2 without growth factor (EGM2 SF) but completed with 0.5% FBS exofree (extracellular vesicles depleted) and 5 ng/ml human Fibroblast Growth Factor (bFGF) (HY-P7004, Med Chem Express) overnight. The next day, HUVECs were seeded in EGM2 for 6 hours, then tumor cells were added to plates with adherent HUVECs in a 1:1 ratio in EGM2 SF, 0.5% FBS exofree and 5 ng/ml human bFGF. After 48 hours, monoculture (HUVEC alone) or coculture (HUVEC+A549/ HUVEC+H1755/ HUVEC+H1975) are detached with TryPLE Select (1X) (Gibco™,12563029)

RESULTATS

and HUVEC were positively selected for CD31 by magnetic cell sorting (MACS) using LS separation columns (Miltenyi Biotech, 130-042-401). Following the manufacturer's instructions, a positive staining of HUVEC using the CD31 MicroBead Kit (Miltenyi Biotech, 130-091-935) was performed. Cells were passed sequentially over two separation columns to reach higher purity. EGM2 was used for the final elution step from the column.

Monocyte and Lymphocyte T-Cell Purification

Peripheral Blood Mononuclear cells (PBMCs) were collected from healthy donors (Etablissement Français du Sang, ethics agreement CPDL-PLER-20** **), isolated using Ficoll gradient (Eurobio, Cat#CMSMSL01-01). Polyclonal CD8+ T cells were selected using EasySep Human CD8+ T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies; 17953). Blood monocytes were isolated through negative magnetic sorting (EasySep Human Monocyte Enrichment Kit, StemCell)

Myeloid cell differentiation

Macrophages were differentiated from monocytes over 4 days, seeded in a 12-well plate at 1.10^6 cells in 1 mL of RPMI supplemented as described. At the seeding day and the day after, 200 U/mL of GM-CSF (Miltenyi) was added to differentiate M1-like macrophages or 5000 U/mL of M-CSF (Miltenyi) for M2-like macrophages. After 4 days, macrophages were harvested for experiments.

RNA isolation

After CD31 sorting, total RNA from HUVECs was extracted using the miRNeasy Micro Kit (Qiagen; 217084) according to the manufacturer's instruction, and RNA integrity and profiles were measured before sequencing using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) for total RNA (RNA nanochips).

Reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

One microgram of RNA was reverse transcribed using Revert Aid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific), and the RT product was used for expression analysis using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) on a QuantStudio3 system (Applied). Targets of interest were amplified using premade primer: PECAM (QT00081172), ICAM (QT00074900), VCAM (QT00018347), PD-L1 (QT00082775), TNFSF4 (QT00028658).

RESULTATS

Gene expression was normalized based on the expression of the housekeeping gene encoding the Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (RPLP0).

3'RNA-seq digital gene expression and analysis

Gene analysis was performed thanks to the GenoBird platform by 3'RNA-sequencing profiling using a NovaSeq 6000 (Illumina). The quality of raw sequence reads was assessed by FastQC. Adapter sequences were trimmed off the raw sequence reads using Cutadapt. Reads were aligned to the human (hg38) genome using BWA. All obtained data have been uploaded on GEO Omnibus site (GSE247526). Bioinformatic analysis to compare gene expression signature and gene set enrichment analysis was carried out using the DESeq2 and pathfindR packages. An adjusted p-value <0.05 was considered statistically significant.

MCTS formation and scRNA-seq

MCTS were formed by mixing A549, normal primary HUVECs, normal primary human lung fibroblast, and PBMC-derived monocytes at a defined ratio of 2:1:1:1, with a total of 20.000 cells per MCTS. Cells were mixed and loaded in a low adherence plate, and cells pelleted by centrifugation. The EGM2 medium was used to culture the MCTS.

After 5 days of culture, MCTS were collected, rinsed with PBS and dissociated with TrypLE. The single cell suspension was then resuspended in a 0.04% BSA and viability assessed. 33.000 cells were used to generate single cell droplet libraries with Chromium NEXT GEM Single Cell 3' Reagent kit v3.1, 10X Chromium Single Cell Controller (10X Genomics, Pleasanton, CA, USA). Library size was determined by Agilent TapeStation assays and the concentration by Qubit Flex (Invitrogen). Libraries were pooled and sequenced on NovaSeq 6000 Sequencing System (Illumina), providing a read depth of >20,000 read pairs per cell according to manufacturer's instructions.

scRNA-seq bioinformatic analysis

Gene expression matrices were generated using Cell Ranger (10X Genomics, version 2.1.1) using the GRCh38 build of the human reference genome, and further processed using RStudio (version 2023.12.1+402). We used the following quality control steps: genes expressed by <10 cells were not considered, cells expressing <350 genes (low quality) or >10.000 genes, or >10% of unique molecular identifiers (UMIs) derived from the mitochondrial genome were

RESULTATS

removed. 279 doublets were detected and removed using the DobleFinder package. Doublets represent ~0.5% of filtered cells and did not form any specific cluster nor were overrepresented in a particular sample. Visualization, clustering, marker gene identification and gene set enrichment analysis of the remaining cell data was performed using the SeuratV5 package. Prior to SCENIC analysis, gene expression matrix was exported to python compatible file using ScopeLoomR. Then, after 10 iterations of pySCENIC pipeline, results were aggregated in custom python pipeline. Using only matrices resulting from the aggregation, the integration of regulons data was analyzed in Seurat and R. Copy number variations (CNV) were estimated using the inferCNV R package (version 1.5.0). For this analysis, we first performed the analysis without reference populations to visualize chromosomal alterations across all cell types. After identifying cluster with similar CNV, and matching these results with cluster gene signatures, we rerun inferCNV with the immune cell, ECs and fibroblasts as reference cells. Analysis was performed using the following parameters: cut-off 0.1, denoise = T, min_cells_per_gene = 10, HMM = F, cluster_by_groups = F. CellChat was performed using default parameters 18 on the full CellChat database by predicting interactions between the endothelial and myeloid compartments. A meta-analysis for commonly upregulated gene sets between HUVEC monocultures and NSCLC or MDA-MB-231 cocultures 17 was performed using the BIOMEX software 19.

Protein Tyrosine Kinase (PTK) and Serine Threonine Kinase (STK) kinome assay

After NSCLC-HUVECs isolation, cell pellets are collected and lysed with a M-PER™ reagent (Thermo Scientific, 78501) containing protease and phosphatase inhibitors (Thermo Scientific, 87785). Lysates were dosed using BCA to make sure that we had enough protein quantity for all our experimental conditions and 3.35µg and 1µg of protein samples were loaded on the PTK and STK PamChip arrays, respectively (PamGene). Everything was processed using the manufacturer's recommendations and using the PamStation 12. The array allows the tracking of the phosphorylation of 196 peptides for the PTK and of 144 peptides for the STK, where the kinase activities are predicted, and further checked for quality filtering. The data were analyzed by PamGene and the pathways identified with the EnRichr website.

RESULTATS

Secretome proteomic analysis

Digestions and LC-MS/MS analyses were performed at the Prot'ICO proteomics facility. NSCLC cell lines were incubated 72 hours in RPMI with 10%SVFd and 1% PS. Supernatants were washed away with 1X PBS and replaced by RPMI without SVF and allowed to condition this new medium for 24 hours. Cells were counted for subsequent normalization, and media (~6 mL) were collected and centrifuged 5 min at 300g and concentrated on an amicon spin reverse 5 kDa/2mL membrane filtration device. Proteins were denatured in 0.1% Rapigest SF™ acid-labile detergent (Waters®), 5 mM DTT and 50 mM ammonium bicarbonate, at 95°C for 30 min (200 µL final). Thiol residues were thus chemically reduced and subsequently cooled down to RT then protected by alkylation in 20 mM MMTS (Sigma Aldrich®) for 10 min at 37°C. 5µg of trypsin (ABSciex) per sample were added and incubated at 37°C overnight. Peptides were then cleared by centrifugation, desalted on C18 sep-pack reverse phase microcolumns as described in the “Stage-tips” procedure and peptides were eluted in Acetonitrile (ACN)²³. Eluates were dried in a vacuum centrifuge concentrator (Thermo), resuspended in 25 µL of 10% ACN and 0.1% Formic Acid (FA). Eluate flow was electrosprayed into a timsTOF Pro 2 mass spectrometer (also from Bruker®) for the 60 min duration of the hydrophobicity gradient ranging from 99% of solvent A (0.1% FA in milliQ-grade H₂O) to 40% of solvent B (80% ACN and 0.1% FA in mQ-H₂O). The mass spectrometer acquired data throughout the elution process and operated in data-independent analysis mode (DIA) with PASEF-enabled method using the TIMS-Control v.3.1.4 software (Bruker®). Samples were injected in batch replicate order to circumvent possible technical biases.

LC-MS/MS data analysis: The raw data were extracted, normalized and analyzed using Spectronaut software v. 18.6.231227.55695 (Biognosys®) in Direct-DIA mode, which modeled elution behavior, mobility and MS/MS events based on the Uniprot/Swissprot sequence 2022 database of human proteins. Protein identification false discovery rate (FDR) was restricted to 1% maximum, with match between runs (MBR) option enabled and inter-injection data normalization.

RESULTATS

Flow cytometry

To characterize Endothelial cell after sorting:

Cells were stained in suspension for 30 min at 4°C with anti-CD31-AlexaFluor 488 (Biolegend, 303110), anti-CD274-PE (BD, 557924), anti-CD252-PE (Biolegend, 326308), anti-CD54-APC-Fire 750 (Biolegend, 353122), anti-CD106-APC (Biolegend, 305810). Cells were washed twice with PBS, processed by flow cytometry on a 5 laser, 32 detector BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer (BD Bioscience) (Acquisition software: Diva 8) and analyzed with the FlowJo VX software. Median fluorescence intensities measured in flow cytometry experiments are normalized on the monoculture conditions and are displayed as ratios of median fluorescence intensities (RMFI) ± standard error of the mean (SEM).

To characterize macrophage populations after 5 days cocultured with sorted HUVECs:

After washing in Phosphate buffered saline (PBS), the cells were incubated 20 min with 1:500 Zombie UV™ Fixable Viability dye (Biolegend) in PBS. They were washed with PBS-0.1% Bovine Serum Albumine (BSA, Sigma-Aldrich) and fixed with PBS-4% paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Sciences) for 10 min, washed and stored at 4°C.

Cells were incubated in 50 µL of Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences) supplemented with 1.25 µg of human BD Fc Block (BD Biosciences). After 10 min, appropriate concentrations of specific antibodies were added for 30 min at 4°C with 1µg/ml anti-CD31-AlexaFluor 488 (Biolegend, 303110), 1:800 anti-CD45-BUV805 (BD Biosciences), 1:200 anti-CD163-BV711 (BD Biosciences), 1:400 anti-HLA-DR-PE Vio770 (Miltenyi), 1µg/ml anti-CD16-BUV737 (BD Biosciences) and 1:100 anti-CD14-APC Vio770 (Miltenyi). After three washes in PBS-0.1%BSA, stained cells were acquired on a 5 laser, 32 detector BD FACSymphony™ A5 Cell Analyzer (BD Bioscience). The BD FACSDiva 8.0 software (BD Biosciences) was used for data acquisition and analyzed with the FlowJo VX software.

Confocal Microscopy

Cocultures were seeded into 24-well plates on coverslips for 48 hours and then fixed in PBS-4% PFA during 20 minutes at room temperature (RT). PBS-2%Triton-1%BSA was used to permeabilize the cells for 30min at RT. Primary antibodies anti-CD31-488 (Biolegend, 303110) anti-vWF (Abcam, ab6994), CD163-594 (Biolegend, 364304), CD45-647 (Biolegend, 304018)

RESULTATS

were incubated with the cells overnight at 4°C, and secondary antibodies AlexaFluor 594 (Cell Signalling Technology, 8889S) were incubated for 1 hour at RT with Hoechst 33342 (Sigma, 14533) and anti-Phalloidin-647 (Invitrogen, A30107). Pictures were taken with a Nikon A1rHD LFOV confocal microscope, with a 60x oil immersion objective (Nikon Instruments). The images were processed and analyzed using the ImageJ software.

After formation, MCTS spheroids were collected in PBS and permeabilized in PBS Triton 2%. After primary and secondary antibody incubations, MCTS were rinsed and immobilized on a IBIDI 8p with Cell-Tak (Corning). Finally, MCTS are transparized using RapiClear (SunjinLab, Nikon) 1.47 before image acquisition.

ELISA assay

Cytokine production was quantified from cocultured supernatants 24 hours after exposing LTs to HUVECs. TNF- α secretion was measured according to the manufacturer's instructions using uncoated TNF- α ELISA kits (Invitrogen, 88-7346-88) and absorbance values were read at 450/570nm using Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific) and concentrations were calculated according to the manufacturer's instructions. IL-10 secretion was measured according to the manufacturer's instructions using uncoated IL-10 ELISA kits (Biolegend, 430604) and absorbance values were read at 450/570nm using Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific). IL-10 concentrations were calculated according to the manufacturer's instructions.

Chemokine detection by multiplex assay

The supernatants of cocultures were collected after 5 days of coculture between sorted HUVEC and naïve CD4+ T Lymphocytes. Cytokines such as IL-5, IL-13, IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IFN- γ , TNF- α (TNFSF2), IL-17A, IL-17F, IL-4, IL-22 were quantified using the LEGENDplex™ Human T Helper Cytokine Panels Version 2 (BioLegend) according to the manufacturer's recommendations.

Leukocytes Adhesion assay

After CD31 sorting, HUVEC were grown in 24-well plates coated with gelatin to obtain a confluent cell monolayer during 6 or 24 hours. Over this period, the activated monoculture control is exposed to cytokine cocktail (6nM TNF- α and IL1- β). PBMCs were obtained as

RESULTATS

described above and labelled with calcein AM (Life, C3100MP). Medium was removed and HUVECs were washed with PBS before the addition of 2.0×10^6 and incubation for 1 hour at 37°C. Non-adherent cells were removed by delicate washing 7 times with PBS. Cellular adhesion rates were determined by live cell imaging using the IncuCyte (Sartorius). Around ten fields-of-view per well are randomly chosen and analyzed with Fiji 20 to determine the number of adherent leukocytes per field of view.

CFSE

Polyclonal/naïve CD4 T cells, and naive CD8 T cells were purified by Ficoll gradient from peripheral PBMCs of healthy volunteers and stained with CellTrace CFSE (ThermoFischer Scientific) at $1\mu\text{M}$ as per the manufacturer's instructions. CFSE stained cells are then cocultured with NECs (HUVECs) or NSCLC-TECs (NSCLC-cocultured HUVECs) for 5 days. Thereafter, cells from the coculture are harvested with TryPLE and stained before being analyzed by flow cytometry.

Leukocyte and monocyte chemotaxis

PBMCs isolated from the peripheral blood of healthy donors are placed in an $8\mu\text{m}$ transwell insert and coculture media from monoculture of NECs or NSCLC-TECs is placed in the lower chamber. After 3 hours of incubation, cells that have performed transmigration are collected, centrifuged, and transferred to a conical 96 well plate.

Spontaneous EC migration assay

After CD31+ sorting, a 96-well plate is coated with gelatin 0.1%, and $5 \cdot 10^3$ cells per condition are seeded in the wells. The 96-well plate was put in the Incucyte S3 (Sartorius) for live imaging. Phase images were acquired for every experiment. Five images of each well were taken every hour during 24 hours in order to be able to track the cells in a movie. On ImageJ-win 64, using the plugins « Tracking » with « Manual Tracking », the tracking parameters were selected: time interval: 60 min, x/y calibration: $1.24\mu\text{m}$, z calibration: 0. 2 cells per image are tracked for 24 hours. Using analysis on Incucyte, the confluence per well was taken to measure the proliferation of our cells.

RESULTATS

Scratch wound healing assay

Confluent HUVEC monolayers were pretreated for 24 hours with 1µg/ml Mitomycin C to block proliferation. A scratch wound has been made using a 200µl tip. After scratch, cells are washed with PBS and then incubated in supplemented EGM2 in the Incucyte incubator. Photographs were taken every 3 hours for 15 hours and analyzed between T0 and T6. Migration was measured with Fiji and expressed as percentage of wound closure (gap area at T0 minus gap area at T6 in percentage of gap area at T0).

Quantification and Statistical Analysis

Data represent mean ± SEM between biological replicates. Statistical significance was calculated using non-parametric Wilcoxon test or Kruskal-Wallis depending on the comparison. *p<0.05; **p<0.01; ***<p0.001. Statistical analyses were conducted using GraphPad PRISM.

Results

Coculture with NSCLC cells lead to profound transcriptomic EC alterations

To unravel how cancer cells impinge on normal endothelial cells (NECs) behavior we adapted a recent model of 2D coculture [17]. For this purpose, we selected three NSCLC cell lines (namely A549, H1755, H1975) that encompass the mutational diversity and aggressiveness traits of NSCLC (Figure 1A) and cocultured them directly with a well-established primary cultured model of normal ECs (HUVECs: human umbilical vein ECs) (Figure 1A). Hereafter, HUVEC monoculture is referred to as control normal ECs (NECs), and NSCLC cell-cocultured HUVECs as tumor-like ECs (A549-TECs, H1755-TECs, H1975-TECs). Immunostaining for endothelial markers (vWF and CD31) revealed the spatial organization of HUVEC cocultures as surrounded by tumor cells (Figure 1B). After 48 hours of contact with NSCLC cells, NECs/TECs were enriched using magnetic beads coupled with CD31 antibodies. As expected, flow cytometry analysis of purified cells showed an enrichment for CD31, ranging from 89.9 to 95.8% of CD31+ cells (Figure 1C), while PECAM1 (the gene encoding for CD31), was not detected in NSCLC by real-time qPCR analysis (Supplementary Figure S1A). Hence, this highlights the purity of the HUVECs purified after coculture with NSCLC cell lines.

We then carried out an unbiased transcriptomics analysis to screen for global changes induced in NECs and TECs. Principal component (PCA) and hierarchical clustering analysis of the highly variable genes revealed that NECs and TECs grouped into 3 distinct clusters (Figures 1D-E). Compared to H1975 and A549 that had a profound impact on the endothelial transcriptomic signature, H1755 minimally affected HUVECs as 4402, 1298 and 137 significantly deregulated genes (adjusted p-value < 0.05) were observed, respectively (Supplementary Fig S1B). Interestingly, H1975- and A549-TECs had 676 commonly deregulated genes, and only 83 genes were in common between the 3 cocultures (Supplementary Fig S1C). Suggesting that difference mediated by NSCLC/EC cocultures could be attributed to distinct genomic alteration profiles. Notably, the impact mediated by NSCLC onto ECs seems to rely on direct cell-cell contacts as indirect coculture (by mean of inserts) did not show any significantly deregulated genes (adjusted p-value < 0.05) and PCA showed that most differences were mediated by the HUVEC donors and not our experimental conditions (Supplementary Fig S1D-E). Gene set enrichment analysis (GSEA) was then performed to identify key upregulated

RESULTATS

pathways in TECs compared to NECs. Among the 60 significantly upregulated pathways induced upon direct NSCLC cocultures, one third (21 gene sets) suggested a role in EC activation and pro-inflammatory signaling such as the prostaglandin synthesis, TNF- α and complement pathways, IL-22 signaling and leukocyte cell adhesion. On the other hand, gene sets involved in cell cycle, proliferation, EC migration, pseudopodia formation and angiogenesis were downregulated (Figure 1F). When comparing each H1975-, A549 or H1755-TECs to the NECs by GSEA we confirmed unbiased PCA and hierarchical clustering indicating a minimal impact of the H1755-NSCLC cell line on ECs (Figure 1F; Supplementary Fig S1F). Thereafter, to maximize the relevance of our findings, we then performed a transcriptomic meta-analysis with RNA-sequencing dataset of HUVECs cocultured with the MDA-MB-231 breast cancer cell line (hereafter coined as MDA_MB-TECs 17). Our meta-analysis revealed congruent deregulated gene signatures between MDA_MB-TECs and NSCLC-TECs as compared to NECs. Indeed, gene sets related to MHC protein complex, prostaglandin signaling, cell-cell (leukocyte) adhesion and TNF signaling were upregulated, while cell proliferation and migration was again downregulated (Figure 1G). Collectively our data indicate that the pro-inflammatory phenotype acquired by ECs upon coculture is probably not a unique feature of NSCLC but could also be generalized to other cancer entities.

RESULTATS

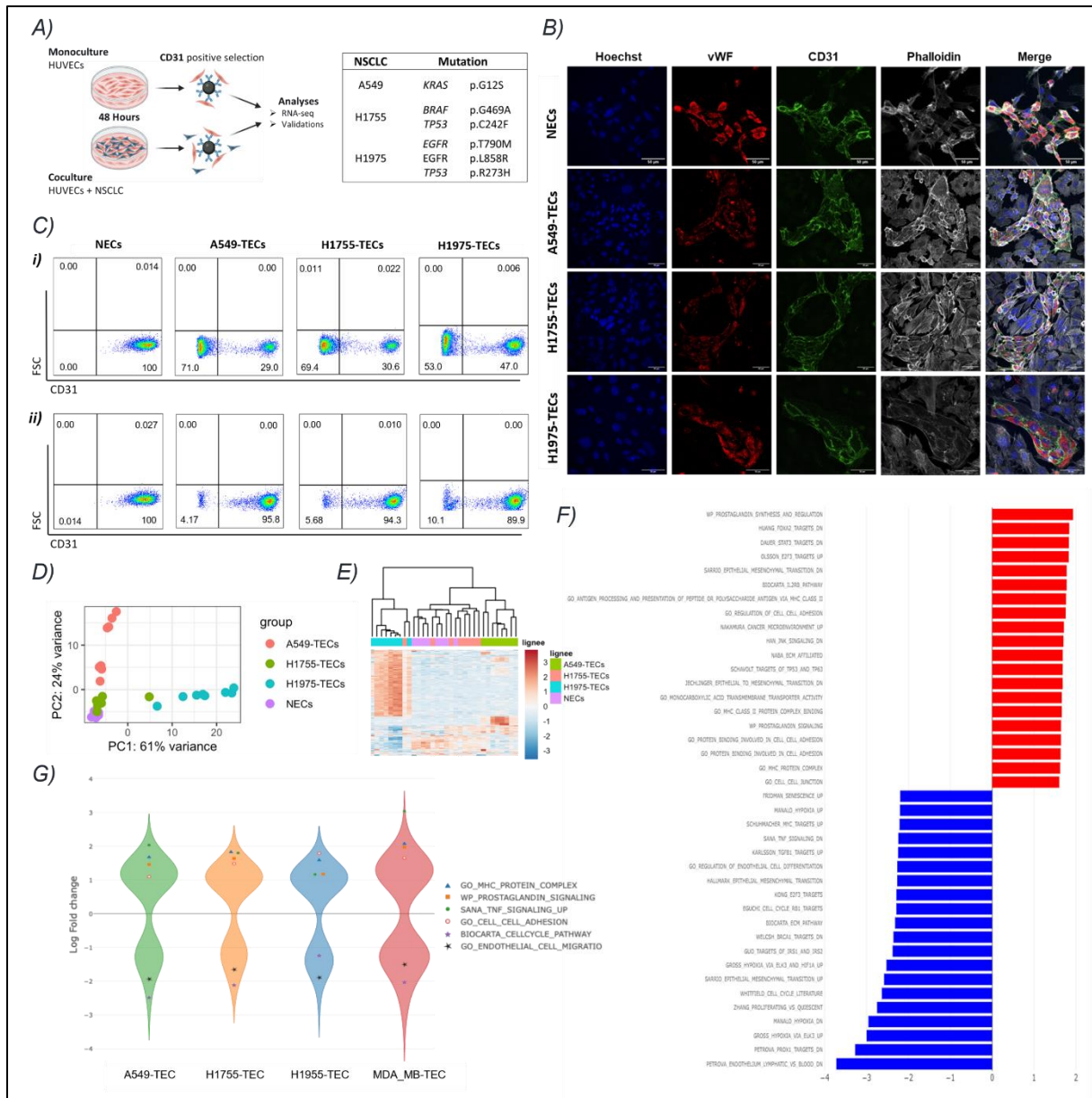


Figure 1. A) Schematic of the 2D in vitro coculture system where human endothelial cells (HUVECs) were cocultured with/without non small cell lung cancer (NSCLC) cell lines during 48h. Thereafter, ECs were isolated using anti-CD31 antibody-coated magnetic beads and 3'RNA-seq was performed. B) Immunostaining for EC-specific markers (vWF in red and CD31 in green) revealed the spatial organization of HUVECs in cocultures. Scale bar : 50 μ m C) Flow cytometric analysis of different cocultured cells stained for CD31 before (i) and after (ii) CD31-sorting to verify population enrichment. D) Principal component analysis considering the top 100 highly-variable genes. Samples segregate into 3 major groups with H1755-TECs being more similar to NECs as compared to the other NSCLC-TECs. n=8 per group. E) Correlation heatmap of the top 350 highly variable genes in NECs and NSCLC-TECs. F) Gene set enrichment analysis in all NSCLC-TECs versus NECs. Pathways enriched in NSCLC-TECs appear in red. p-value p<0.05. G) Violin plot showing results of a meta-analysis between the different NSCLC-TECs and HUVECs cocultured similarly with the breast cancer MDA-MB-231 cell line. Congruent up/downregulated gene sets were observed among the datasets.

Coculture with NSCLC cells altered EC proliferation and migration

We first investigated the proliferation defect of cocultured HUVECs as suggested by GSEA. Immunostaining of CD31 with the proliferation marker KI67 indeed showed a much lower fraction of double positive CD31+KI67+ cells in our cocultures compared to the monoculture condition (Supplementary Figure S2A). However, when NSCLC-TECs were purified and placed back in culture no significant reduction in cell proliferation was observed, suggesting that the proliferation blockade could be partly mediated by contact inhibition in the NSCLC cocultures (Supplementary Figure S2B). Seemingly, the reduced migration outlined by GSEA was not validated as NECs/TECs displayed similar migration and angiogenesis capacities in spontaneous, scratch wound and tubulogenesis assays (Supplementary Figure S2C-E). Altogether our data suggest that the diminished proliferation and migration phenotype harbored by NSCLC-TECs in cocultures is rapidly lost when ECs are removed from this setting.

Coculture with NSCLC cells lead to a pro-inflammatory and endothelial activation state

Differential expression analysis and GSEA revealed a marked pro-inflammatory and activation phenotype in all coculture conditions with the expression of multiple cytokines (CCL26, CXCL10, IL16, IL18), and adhesion molecules meant to attract and retain leukocytes (ICAM1, VCAM1, SELE, CD99) (Figure 2A). We first confirmed by qPCR and flow cytometry the heightened expression of the two major adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in NSCLC-TECs (Figure 2B-D). We hypothesized that increased expression of intercellular adhesion molecules by TECs could stimulate the attraction and binding of leukocytes onto the EC surface. Purified NSCLC-TECs were allowed to form a confluent monolayer for 6 and 24 hours, and peripheral blood monocytes (PBMCs) derived from healthy donors were isolated and placed onto NECs/TECs. Interestingly, while there was a trend to increase leukocyte adhesion at 6 hours for the A549-TECs (that expressed the higher level of ICAM-1 and VCAM-1) (Figure 2A-D, Supplementary Figure S3A), this effect was lost after 24 hours of culture. Moreover, at 24 hours the leukocyte adhesion onto H1975-TECs appeared reduced compared to NECs (Figure 2E). As TECs display an altered cytokine profile upon NSCLC coculture, we exposed PBMCs to NSCLC-TEC or NEC secretomes and measured the immune cell chemotaxis with a transwell migration assay. Compared to NEC secretome we observed a trend in increased transmigration of CD3+CD4+ and CD3+CD8+ for all NSCLC-TEC secretomes, with significant

RESULTATS

results for H1755- and H1975-TECs (Figure 2F). There was no impact on the CD14⁺ myeloid chemotaxis (Supplementary Figure S3B).

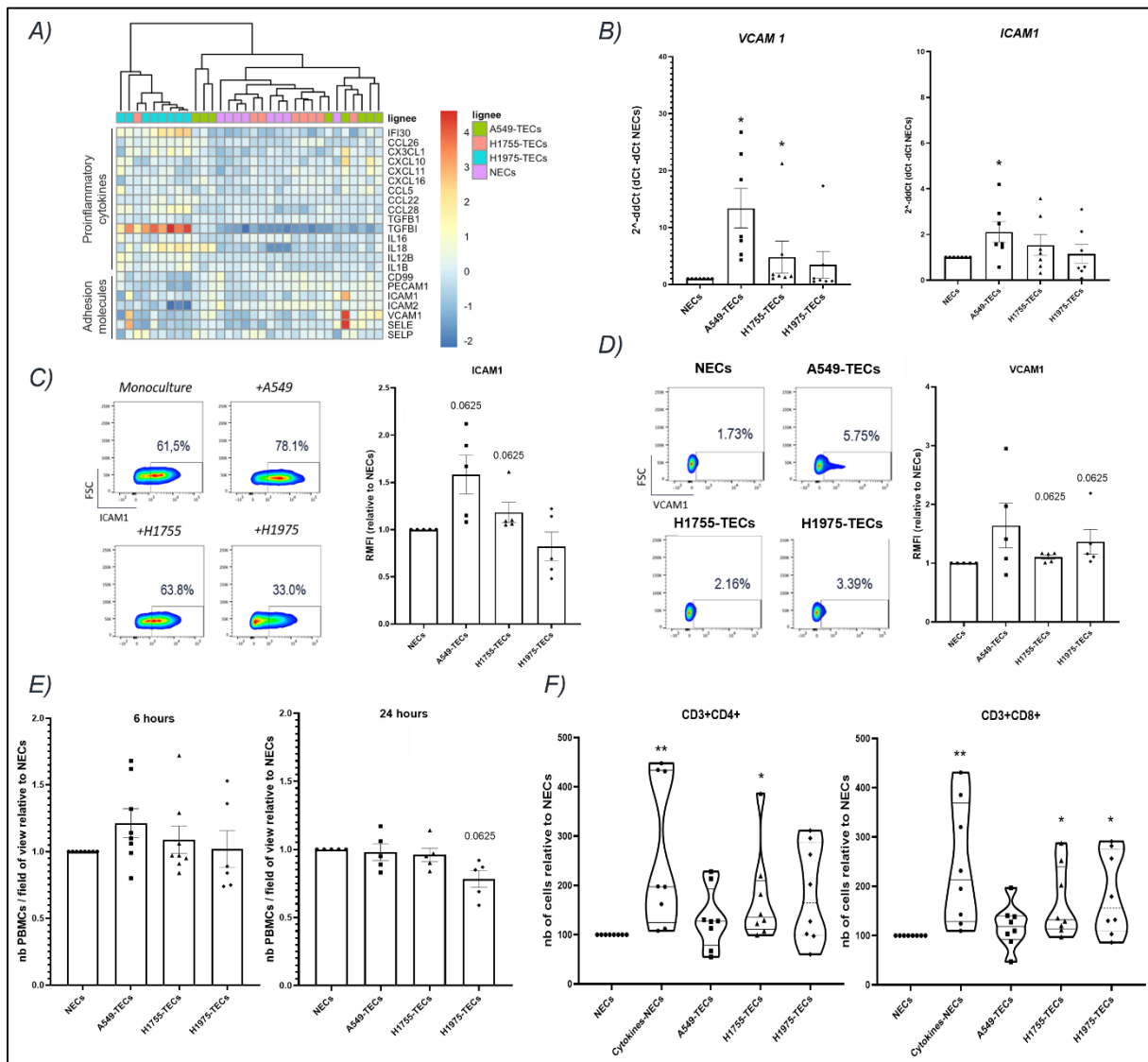


Figure 2. A) Correlation heatmap analysis for genes involved in pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules involved in leukocyte recruitment. Expression analysis for VCAM1 and ICAM1 by B) RT-qPCR and C-D) flow cytometry analysis in NECs/NSCLC-TECs. E) NECs and NSCLC-TECs were cultured at confluency for 6h or 24h after coculture and leukocyte adhesion assessed. F) Chemotaxis experiment for CD3⁺CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes attracted by the coculture medium from NECs alone or NSCLC-TECs. Data are mean \pm SEM, $n > 5$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Wilcoxon test compared to NECs.

NSCLC TECs have limited impact on CD8 T cell activation

Having shown that NSCLC-TECs could promote CD3⁺ T cell recruitment, we sought to characterize their impact on lymphocyte activation and polarization. Indeed, in several tumor

RESULTATS

entities including NSCLC, the TME has been shown to induce CD8⁺ T cell exhaustion, which is the main target of immunotherapies 21. After exposing HUVECs or not to NSCLC, NECs/TECs were subsequently cocultured with polyclonal activated CD8⁺ T cells for 24 hours. In that condition, our flow cytometry analysis did not show significant variation of the late/middle T cell activation marker CD25 in CD3⁺CD8⁺ T cells, and only minimal changes in the secretion of TNF α , as measured by ELISA (Supplementary Figures S3C-D).

NSCLC TECs mediate the polarization of protumor CD4 T cell subsets

The immunosuppression of the TME is also partly imposed by (but not limited to) pro-tumor CD4⁺ Treg and Th2 polarization 22 (Figure 3A). This polarization can be achieved via various cytokines produced by cancer cells (eg. TGF β), but also by direct contact with co-stimulatory molecules expressed on (semi)-professional APC such as ECs 23. One of these molecules is OX40L (encoded by TNFSF4), which was previously described to be constitutively expressed by ECs 24 but never assessed yet in a context of cancer. We first confirmed by qPCR and flow cytometry the reduced expression of OX40L (encoded by TNFSF4) in NSCLC-TECs as compared to NECs (Figure 3B-D). Of note, TNFSF4 expression appeared relatively stable in HUVECs over 72 hours after EC purification (data not shown). OX40-OX40L interaction is described to i) abolish the suppressive activity of FOXP3⁺ Tregs, ii) prevent the induction of Tregs from effector T-cells, and iii) induce the proliferation of memory and effector T lymphocytes 25. OX40/OX40L thus appears as an important immunoregulatory signal, with OX40L expression tightly regulated by several actors including kinases of the PI3K, Src family in mast cell and dendritic cells 26,27. To unravel how the OX40L could be regulated in ECs, we performed a kinome assay to screen for 144 serine/threonine kinase (STK) and 196 protein tyrosine kinases (PTK) in TECs compared to NECs. After quality check filtering of the phosphorylated phosphosites and VSN normalization, an upstream kinase analysis algorithm was used to predict differential kinase activity in TECs compared to NECs. Mirroring the results obtained by RNA-sequencing (Figure 1D-E), phylogenetic coral trees showed that A549- and H1975-TECs presented similar modifications in their kinome profile while H1755-TECs have limited effect size compared to NECs (Figure 3E; Supplementary Figure 3E-F). Moreover, the majority of significantly deregulated predicted kinases appeared downregulated in A549- and H1975-TECs, with common kinases belonging to the Src kinase family (LYN, FYN, HCK) (Figure 3E). In immune cells LYN and FYN were previously reported to tightly control OX40-OX40L signaling,

RESULTATS

with the NF κ B pathway that is directly implicated in the OX40L transcriptional expression 27–29. As the NF κ B heterodimers NFKB1 and RELA (encoding p50 and p65, respectively) were downregulated in H1975-TECs (Supplementary Figure 3G) our data suggest that the downregulation of LYN, FYN kinases and the NF κ B signaling could explain the reduced OX40L expression in A549- and H1975-TECs.

Following the same strategy as for CD8⁺ T cells, we scrutinized the impact of NECs/TECs on polyclonal or naïve-activated CD4⁺ T cells (Figure 3A). When cocultured with NSCLC-TECs, flow cytometry analysis of CFSE-labelled polyclonal CD4⁺ T cells showed a significantly diminished proliferation with A549- and H1975-TECs (Figure 3F). Conversely, naïve CD4⁺ T cells proliferation was higher when cultured with H1755-TECs compared to NECs (Supplementary Figure S4A). The amount of TNF- α was quantified by ELISA in CD4⁺ T cell/EC coculture and showed a 1.8-fold change elevation when H1975-TECs were used compared to NECs (Figure 3G). Besides being secreted by activated T cells, TNF- α is described to act on Treg polarization. As such the fraction of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg was higher with A549- and H1975-TECs for polyclonal CD4⁺ T cells but not affected in naïve CD4⁺ T cells (Figure 3H; Supplementary Figure S4B). Seemingly, there was a tendency for increased IL-10 secretion in cocultures with polyclonal CD4⁺ T cells and A549- or H1975-TECs (IL-10 being a cytokine secreted by Treg) (Figure 3I). Using the LegendPlex technology we then performed a thorough investigation of the cytokines produced by CD4⁺ Treg and T helpers in the cocultures of naïve CD4⁺ T cells with ECs. Notably, in monoculture upon TNF α /IL-1 β stimulation, naïve CD4⁺ T cells seem to polarize in Th2 (IL5⁺, IL13⁺, IL2⁻) and Th17 (IFNG⁺, IL22⁺) (Figure 3J; Supplementary Figure S4C). Our coculture results indicate that A549-TECs could induce the secretion of IL-2 and IL-5, secreted by Th1 and Th2 respectively (Figure 3J). On the other hand, H1975-TECs only fostered IL-22 secretion, with low IL-17 levels suggesting a Th22 polarization (Figure 3J) 30,31. Notably, IL-4, IL-13 and IFN γ showed minimal variation (Supplementary Figure S4C), and IL-9, IL-10 and IL-17A were undetectable. A combination of various polarization factors is described to mediate a specific CD4⁺ subtype. For instance, IL-6 and TNF- α (without TGF β) that stimulate the differentiation of Th22 32, are upregulated in H1975-TECs (Figure 3G; Supplementary Figure S4D-E). Hence, collectively our data point toward a Th22-polarizing effect of H1975-TECs, and a mixed Th1/Th2 signature with A549-TECs.

RESULTATS

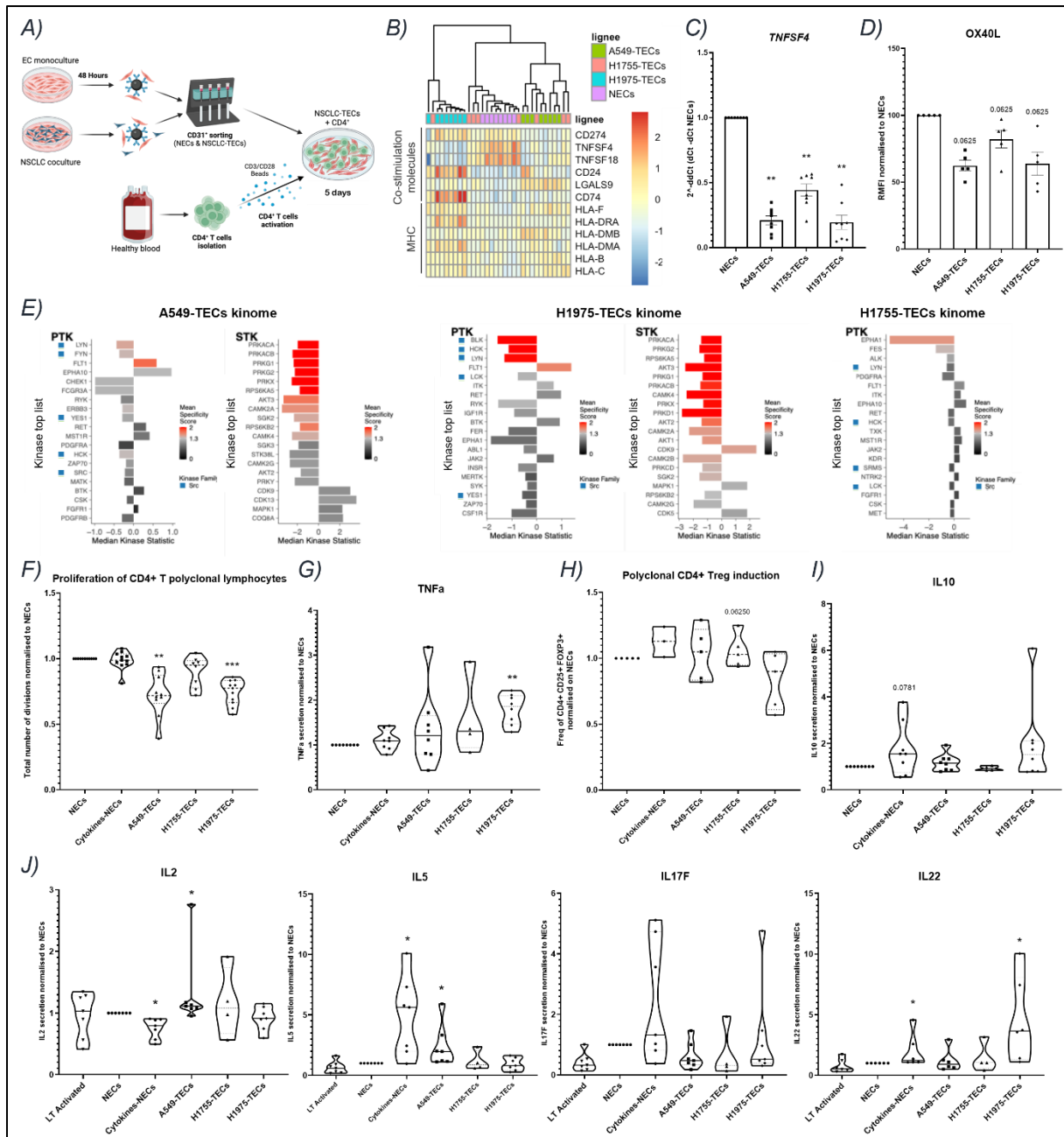


Figure 3. A) Schematic representation of the 5 days coculture between CD4+ T cells and NECs or NSCLC-TECs. B) Correlation heatmap analysis for genes involved in costimulation molecules and major histocompatibility complexes. Expression analysis for OX40-L (encoded by TNFSF4) by C) RT-qPCR and D) flow cytometry analysis in NEC/NSCLC-TECs. E) Kinome analysis of protein tyrosine kinase (PTK) serine/threonine kinase (STK) differentially regulated in NECs and NSCLC-TECs. A negative median kinase statistic means a downregulated kinase compared to NECs, and a specificity score in red is statistically significant. F) Proliferation of polyclonal CD4+ T cells in cocultures with NECs or NSCLC-TECs and assessed with CFSE by flow cytometry. G) TNF α secretion is dosed by ELISA in the coculture supernatant from polyclonal CD4+ T cells with NECs or NSCLC-TECs. H) Fraction of CD4+CD25+FOXP3+ Treg in the polyclonal CD4+ T cells/HUVEC cocultures. I) Cytokine secretion detected by Legendplex in naïve CD4 T cells/HUVEC cocultures. Data are mean \pm SEM, $n > 4$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Wilcoxon test compared to NECs.

NSCLC-TECs mediate the polarization of anti-tumor M2-like macrophages

The NSCLC immune TME is mostly composed of myeloid cells including monocyte-derived macrophages, that have pivotal functions in tumor immunity 33. To unravel the impact of ECs during this process we cocultured NSCLC-TECs and NECs with monocytes isolated from healthy peripheral blood (Figure 4A). After 5 days of culture, confocal microscopy analysis of monocyte/NEC cocultures revealed that CD45⁺CD163⁺ monocytes appear enriched in areas of close contact with NECs (Figure 4B). We then further analyzed by flow cytometry monocyte/NEC or TEC cocultures, and particularly the CD31-CD45⁺ cell fraction for accepted pro-tumor M2-like (CD163, CD16) and anti-tumor M1-like macrophage markers (HLA-DR). Cocultures between NECs/TECs and monocytes had limited impact on the monocyte polarization. Nonetheless, we observed a propensity toward an increased expression of CD163 and HLA-DR with A549- and H1975-TECs, respectively (Figure 4C; Supplementary Figure 4F).

Previous studies from our lab showed that thoracic cancer cell lines could mediate the M2-like polarization of monocytes in 2D and 3D cocultures, involving tumor-secreted cues including the M-CSF/CSF1 34–36. Interestingly, mass spectrometry analysis demonstrated a higher expression of CSF1 in A549 secretome compared to those of H1755 and H1975 (Figure 4D). Hence, to combine the impact of NSCLC on monocyte polarization, we directly tri-cultured in 2D the A549 NSCLC cell line with ECs (HUVECs) and monocytes for 5 days (Figure 4A). From now on, to simplify reading we will dub the 2D A549/HUVECs/monocyte triculture as AHM. We then screened by flow cytometry the AHM triculture by gating on the CD45⁺ immune population that was well defined on TSNE representations (Figure 4E). First, when monocytes were cultured with A549 we reproduced the heightened CD163 expression (and CD16, although not significant) as seen with other thoracic cancer cell lines 34,36. Second, the addition of ECs in the AHM triculture did not alter the increased expression of CD163, even when using a higher ratio of ECs in the triculture, but the levels of CD16 were boosted. Third, the addition of ECs was however able to induce the expression of the M1-like marker HLA-DR, but a greater EC ratio did not impose more variation in this marker (Figure 4F). As such, our data suggest that ECs could favor the emergence of a pro-tumor M2-like phenotype whilst minimally affecting the M1-like phenotype.

RESULTATS

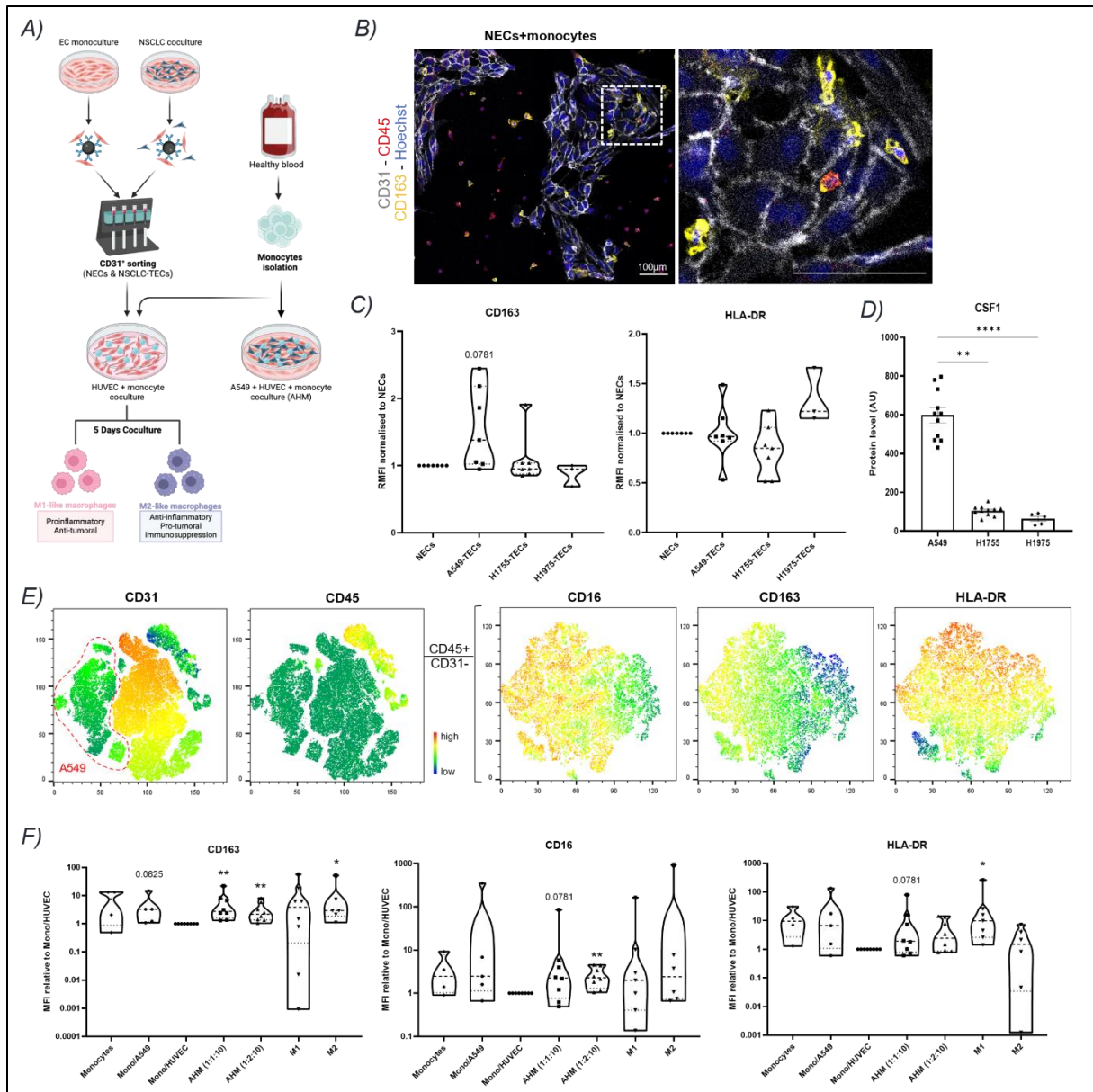


Figure 4: A) Schematic representation of the 5-day coculture between PBMC-derived monocytes and NECs or NSCLC-TECs. B) Confocal analysis of the coculture between healthy HUVECs (NECs) and monocytes, and stained for the endothelial marker CD31, the leukocyte marker CD45, and the M2-like macrophage marker CD163. Scale bar: 100µm. C) Flow cytometry analysis of several polarization markers after the coculture between monocytes and NECs or NSCLC-TECs. HLA-DR is a M1-like marker. D) Mass spectrometry proteomic analysis of the secretome of NSCLC cell lines for CSF1. E) tSNE representations and F) mean of fluorescence (MFI) of flow cytometry of the AHM triculture with A549, HUVEC and monocytes. The right panels are gated on the CD45⁺CD31⁻ population to study macrophage polarization for M2-like (CD16 and CD163) and M1-like (HLA-DR) markers. Data are mean ± SEM, n > 4, *p < 0.05, **p < 0.01, Wilcoxon test compared to Mono/HUVEC.

A multicellular tumor spheroid (MCTS) 3D model to mimic the lung TME

In the past decade, new culture systems have emerged, accounting for the study of 3D environment and that appear more similar to in vivo setting as compared to classical 2D monocultures 37,38. Hence, in order to complexify our coculture systems, we modeled the TME with 3D MCTS. MCTS were obtained by spontaneous cell aggregation over 5 days with a defined ratio (2:1:1:1) of A549, HUVECs, PBMC-derived monocytes isolated from the peripheral blood of healthy donors, and primary healthy lung fibroblasts (Figure 5A). As previously published by others 39, we showed that the use of fibroblast was necessary for MCTS condensation and formation, probably by secreting important components of the extracellular matrix (ECM) (data not shown). Confocal microscopy imaging revealed an elaborated cellular organization with FAP+ fibroblasts forming a network in the center of MCTS, embedding clusters of CD31+ ECs and CD45+ monocytes where those cells appeared to form privileged contacts (Figure 5B). To further unravel this complexity, MCTS were dissociated into a highly viable (>85%) single cell suspension, subsequently analyzed by single cell RNA-sequencing (scRNA-seq). After quality filtering and integration (Supplementary Figure 5), we obtained 52.206 high-quality cells that clustered into 6 distinct clusters, annotated on the basis of their top-50 marker genes (Figure 5C-D; Supplementary Figures 6A-B). Cancer cells were identified by the expression of epithelial cell markers and genetic alterations as outlined by inferring somatic large-scale chromosomal copy number alterations with inferCNV (Supplementary Figure 6C). This step was necessary to formally distinguish cancer cells and fibroblasts that share similar features. The 31.878 cancer cells fall into 5 subclusters with specific transcriptomic signatures such as a proliferative subcluster, cholesterol and fatty acid homeostasis, and EMT/inflammatory signaling (Supplementary Figure 7). Using Transcription Single-Cell Regulatory Network Inference and Clustering (SCENIC), we could detect enriched activity of CEBP and c-JUN-driven regulons and transcription factor expression, congruent with the proliferative capacities of cancer cells (Supplementary Figure 8). 3435

Although healthy fibroblasts were used, among the 19.389 fibroblasts 18% expressed the cancer-associated fibroblast (CAF) marker FAP and were shared across all samples while normal fibroblasts displayed heterogeneity between donors 40 (Supplementary Figures 9A-B). Heterogeneous phenotypes were identified thanks to gene signatures from breast cancer

RESULTATS

scRNA-seq data 41 including immunosuppressive S1_ECM_myCAF and S1_TGFb_myCAF with few immunoactivatory S1-detox-iCAF (Supplementary Figure 9C).

With respect to ECs isolated from MCTS (coined MCTS-ECs), although derived from large vessel (namely the umbilical vein), they express high level of canonical capillary marker genes (CD36, CA4), while venous EC markers (ACKR1, VCAM1, EDN1) were lowly expressed and did not represent per se EC cluster markers (data not shown). Thus, suggesting that HUVECs are reprogrammed in capillary-like ECs within MCTS. The 505 cells obtained post filtering segregated into 4 distinct subclusters (Figure 5E). A first subset of hypoxic MCTS-ECs expressed the hypoxic marker CA9 and the prostaglandin-degrading HPGD that was closely associated with capillary aerocytes in human lungs 42. Probably linked to the hypoxic response, the hypoxic EC cluster also expressed established proliferation markers (TOP2A, MKI67, BIRC5, CEP55) and pathways related to ECM remodeling. A second MCTS-EC subcluster, coined angiogenic MCTS-ECs expressed genes involved in angiogenesis (KDR, FLT1, TIE1, KIT), with tip-like markers (INSR, ANGPT2, ANGPTL2) and ECM remodeling (COL4A1, COL4A2, COL18A1), as described previously 9. Of note, the proliferative MCTS-EC subcluster also express some of angiogenic markers, probably suggesting a stalk-like phenotype. A third MCTS-EC subcluster had a mixed intermediary phenotype with a poorly defined signature. It was thus coined as intermediary. Finally, the fourth MCTS-EC subcluster displayed a marked pro-inflammatory signature with genes encoding for cytokines (CXCL1, CXCL2, CXCL8), NFkB pathway (CCN2), leukocyte adhesion molecule (ICAM1), endothelial-to-mesenchymal transition (SERPINE1), and endoplasmic reticulum stress-response (HSP90B1/GP96, HSPA5/BIP, PDIA4, SELENOK/S/M, DNAJC, SERP1, HERP, HYOU1). GSEA further highlighted the implication of the UPR, autophagy and mTORC1 signaling in the inflammatory/UPR MCTS-ECs, as recently characterized in mouse TECs 11,12. We then sought to unravel the relevance of those MCTS-EC phenotypes by determining their similarities across models. While the proliferative and angiogenic MCTS-ECs were found in scRNA-seq datasets of 2D monoculture of normal HUVECs 43, the inflammatory/UPR MCTS-EC subcluster was absent in early 2D culture of HUVECs (Supplementary Figure 10A). Conversely, the latter subcluster was expressed in freshly-isolated ECs from NSCLC human biopsies and appeared similar to ECs with immunomodulatory functions such as lymphatic and postcapillary venule ECs (Figure 5G). Similarly, the inflammatory/UPR MCTS-EC subcluster was found similar to a cluster expressing a

RESULTATS

mesenchymal/EndMT signature found in 2D culture of TECs from NSCLC biopsies 9 (Supplementary Figure 10B).

We then further phenotyped the immune cells of MCTS clusters, originating from PBMC-derived circulating monocytes. Subclustering analysis revealed a formidable heterogeneity with 434 cells that cluster into 5 subclusters. Notably, probably due to contamination inherent to the monocyte isolation, 2 clusters of natural killer (NK) cells were identified, expressing CD96, IL32, CD70 and RELB (Figure 5H). They were labeled as NK, and NK proliferative by interrogating reference-based atlas 44. Those lymphoid clusters will not be further analyzed in this study. Emphasizing on macrophage diversity during differentiation and activation processes in the TME, 3 heterogeneous cluster of myeloid cells were identified on the basis of canonical markers (LYZ, CD86, CD14, CD68) (Figure 5I). Although a continuum exists within these subsets, we detected i) a perivascular M2-like macrophage characterized by CD163 and the accepted markers LYVE1 and FOLR2 45; ii) a M2-like phenotype with high expression of M2-like markers but no expression of LYVE1 and FOLR2 ; and iii) a population of M1-like macrophage expressing low levels of the aforementioned markers (Figure 5I). Interestingly, the M2-like fraction represents 77% of the myeloid compartment, mirroring our previous observations in NSCLC and mesothelioma MCTS that most of the monocyte-derived macrophages adopt an M2-like phenotype 35,36. Given that CD45+ were found in the close vicinity of ECs within MCTS (Figures 5B), we predicted ligand-receptor interactions between MCTS-immune and ECs with CellChat to identify therapeutically-relevant targets. Notably, the angiogenic MCTS-EC subcluster was predicted to perform most interactions (both incoming and outgoing), with the highest weight (Figures 5J; Supplementary Figure 10C). Interestingly, the MIF pathway was the pathway showing the most significant interactions in the perivascular M2-like cluster (Figure 5K). MIF was identified as a ligand of both CXCR2 and CXCR4, that are major regulators of inflammatory cell recruitment 46 (Figure 5L; Supplementary Figure 10D). Moreover, another receptor of MIF is CD74, and involved in TNF- α -dependent lung inflammation 47. Our mass spectrometry proteomic analysis confirmed the expression of MIF in several NSCLC cell lines including the A549 (Supplementary Figure 10E). Hence, MCTS appear as a relevant model to mimic some aspects of cell-cell communications that could occur in the TME.

RESULTATS

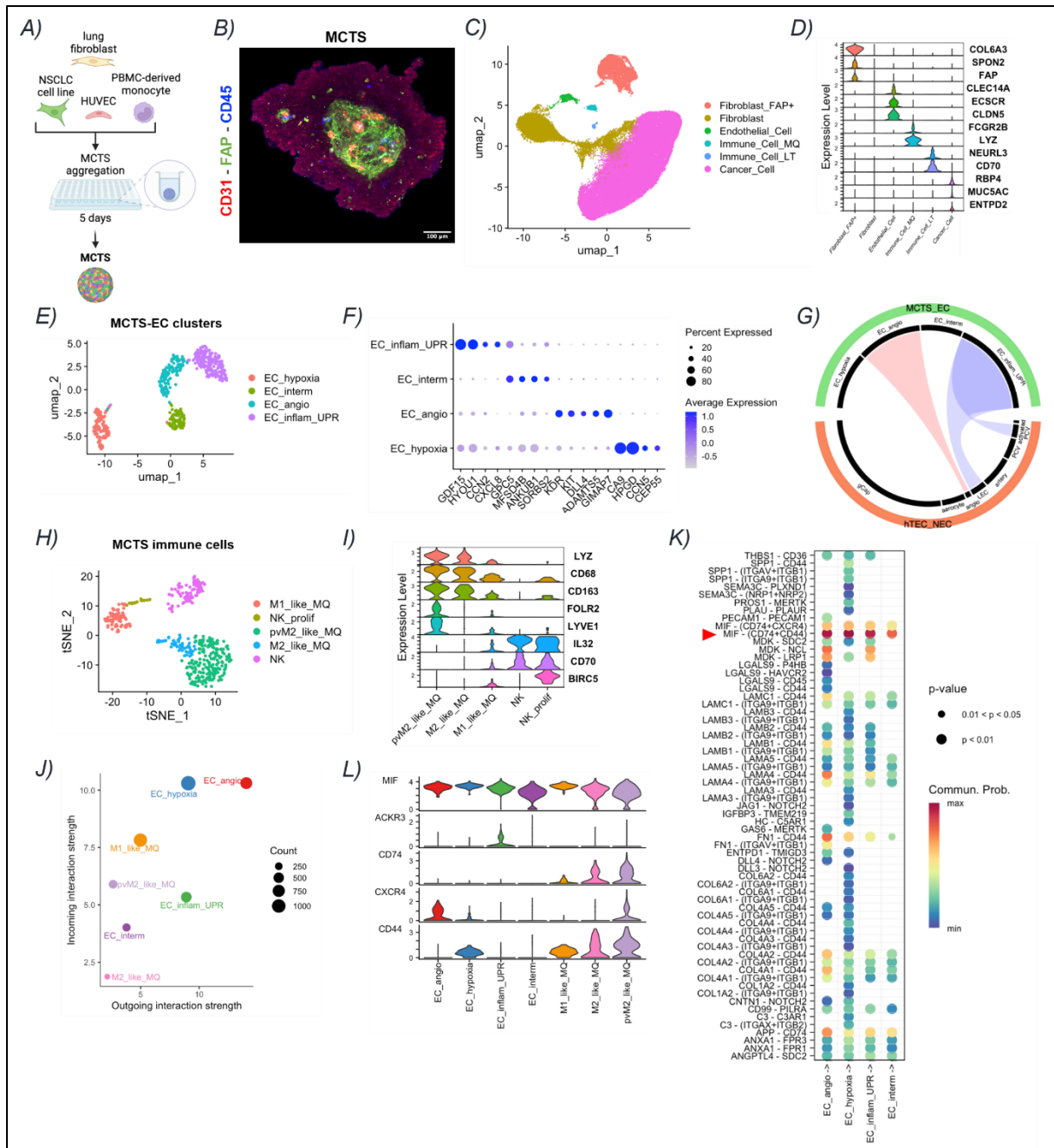


Figure 5. A) Schematic representation of the multicellular tumor spheroid (MCTS) formation during 5 days. B) Confocal imaging of MCTS for the cancer-associated fibroblast (CAF) marker FAP, the leukocyte marker CD45 and the endothelial CD31. Scale bar, 100µm. C) uMAP representation of each cell type composing the MCTS and detected after scRNA-sequencing (n=4). D) Dot plot of the key marker genes for each cell type in the MCTS. Subclustering analysis of the MCTS-ECs visualized by E) tSNE with F) dotplot depicting key marker genes. We annotated proliferative, angiogenic and inflammatory EC subsets. G) Circleplot showing the similarities between MCTS-EC subsets and ECs freshly isolated from NSCLC human biopsies. Subclustering analysis of the MCTS immune compartment visualized by H) tSNE with I) dotplot depicting key marker genes. J) Ligand-receptor predicted the interactions between MCTS-EC and the myeloid compartment present within MCTS. Depicted is the interaction weight, a thicker line means more interactions predicted between the two cell clusters. K) Heatmap of the top predicted pathways involved between the perivascular M2-like macrophage (pvM2-like) and the MCTS-EC clusters. The most significant pathway relates to the MIF (macrophage migration inhibitory factor).

RESULTATS

Discussion

The aim of our study was to model the TME and analyze the impact of ECs on various immune populations, in order to better dissect their immunoregulation function. We showed that coculturing ECs with various NSCLC cell lines induced profound alterations at the transcriptomic, proteomic and kinomic levels with the induction of pro-inflammatory pathways, reflecting their activation state. Interestingly, the pro-inflammatory phenotype appears mainly driven by direct cell contact as indirect coculture with inserts had minimal effect. Besides, this feature does not appear restricted to the NSCLC entity, as our meta-analysis revealed a similar transcriptomic signature in breast cancer cell cocultured-ECs. Despite a limited impact of NSCLC-TECs on CD8 T lymphocyte proliferation and activation, we showed that CD4 T cells were polarized into different subsets (Treg, Th22 and Th1/Th2) when cocultured with NSCLC-TECs. We also discovered that NECs and NSCLC-TECs could enhance the expression of M2-like markers. For the first time, we brought to light that OX40L could play a role in the immunoregulatory function of TECs, where it appears downregulated as compared to NECs.

In the seek to improve our 2D coculture system, we scrutinized at the single cell resolution, 3D MCTS encompassing tumor cells, ECs, fibroblasts and monocyte-derived macrophages. We showed that cell heterogeneity was much more complex than 2D cultures, with several cell phenotypes identified. Particularly, 3 subclusters of MCTS-ECs were distinguished, among which the inflammatory subcluster that was absent from standard 2D culture but present in freshly-isolated ECs from NSCLC biopsies. Finally, we uncovered various macrophage polarization states within NSCLC-MCTS, with a perivascular M2-like subset that has particular therapeutic importance with regard to its interaction with the vascular compartment.

Our results on OX40L raise several outstanding questions and promising future perspectives. OX40L/gp34 belongs to the TNF family and is identified as the ligand for the costimulatory receptor OX40. Importantly, the use of an anti-OX40 agonist antibody has been shown to enhance T lymphocyte-mediated antitumor immunity and inhibit Treg induction in several cancer models, thereby promoting tumor regression and ameliorating patient survival 48,49. Moreover, OX40L has been identified to be expressed in ECs (HUVECs) where it can act as a co-stimulation signal for T cell recruitment and proliferation 24,50,51. Here we show that OX40L expression was blunted in A549- or H1975-TECs, and their coculture with polyclonal

RESULTATS

CD4 T cell inhibits their proliferation following activation, while increasing Treg proportion. We hypothesize that inhibition of CD4 T cell proliferation results from the failure of the proliferative support signal normally provided by OX40/OX40L at the time of T cell activation. Indeed, this hypothesis is reinforced by the fact that no difference in proliferation was observed in naive T cells, which only express OX40 very late after activation 52. An important interrogation holds in deciphering the signaling leading to reduced OX40L expression in some NSCLC-TECs compared to NECs. In various immune cell types, the OX40/OX40L signaling appears regulated by the NF κ B pathway 27–29. Moreover, in HUVECs the OX40 binding results in c-Jun and c-Fos induction (10477563) that closely interact with the NF κ B p65 subunit, thereby mutually activating their binding to DNA motifs 53. Here, we show that the expression of the Lyn and Fyn kinases (involved in NF κ B pathway regulation 29) is reduced in A549- or H1975-TECs, and might be implicated in the OX40L diminution but this hypothesis needs be further tested. Noteworthy, given the role of the OX40/OX40L interaction in the establishment of an effector memory response 25, it will be relevant to examine effector (CD45RA-CCR7-) and central (CD45RA-CCR7+) memory T cell markers after activation upon coculture with NSCLC-TECs.

The characterization of IL-22 Th22 cells is relatively recent and initially defined as cells specializing in tissue repair processes. Intra-tumor IL22-producing Th22 cells, which proportion is increased in tumor tissues, is associated with poor prognosis in several cancer types 54–56. Here we show that naive CD4 T cells cocultured with H1975-TECs fostered IL-22 secretion, while producing low IL-17 levels and thus suggesting a Th22 polarization 30,31. However, the effect of A549-TECs appears less clear compared to the control condition stimulated with TNF α /IL-1 β where naïve CD4+ T cells polarize in Th2. Indeed, although IL-5 secretion was induced upon coculture with A549-TECs, there was only a tendency toward heightened IL-13, and the IL-2 (a Th1 marker) was also induced. We hypothesize that this incomplete Th2 signature might relate to the coculture duration and would require later end point analysis. A mass spectrometry proteomic characterization of NSCLC-TECs secretome may also identify polarization mediators eventually involved in this mixed Th2 phenotype. Placing our results back in the context of the TME, we thus hypothesize that TECs may contribute to the polarization of Th2 and Th22 cells, hence participating in tumor immunosuppression. Following on from this project, it would be interesting to deepen our

RESULTATS

understanding of the underlying mechanisms involved in the interaction between ECs and Th2/Th22 in normal and tumor contexts.

In NSCLC, as it is the case for many other cancer entities, TAMs represent the major immune cell type, accounting for more than one third of tumor-infiltrating immune cells 33. Macrophages display high intrinsic plasticity and adaptability based on epigenetic regulation and various cues emanating from the TME. Beyond the canonical M1/M2 macrophage phenotype dichotomy, scRN-seq emphasized macrophage diversity in cancers (30979687). As such, macrophages exist along a phenotypic continuum and are not easily characterized by individual markers 57,58. As shown by our lab and others, monocytes differentiate toward M2-like macrophages when cultured in 3D with tumor cells 34–36. Here, we show by scRNA-seq a much more in-depth resolution of this macrophage continuum with several intermediate phenotypes. In 2D, when cultured with ECs, macrophages seem to express high levels of CD163 when located nearby ECs. Seemingly, in MCTS CD45+ monocytes appeared to form privileged contact with MCTS-ECs. These observations are consistent with the results from Njock et al. which indicate that treatment with extracellular vesicles produced by HUVECs during coculture with MDA-MB-231 induced polarization towards an M2 phenotype 17. Finally, our MCTS data identify the presence of LYVE1+ FOLR2+ perivascular M2-like macrophages described to have therapeutic relevance by influencing treatment resistance, angiogenesis, EC-leukocyte interactions and patient survival 59–62. Although protein validations will be required to firmly establish their true nature it will be interesting to determine whether the presence of ECs alone suffices to induce M2-like perivascular traits or whether it requires other signals from the TME.

We acknowledge limitations of our study. First, we restrained our 2D and 3D coculture systems to a single EC type with the HUVEC, but ECs from other vascular beds may show different responses to the contact with tumor cells. For instance, we and others 9 showed that normal aeryocyte and general capillaries appear downregulated in NSCLC tumors. As such tumor cells or the TME may have a particular detrimental effect on this EC type. Second, in our study we determined the effect of NECs/TECs on the tumor immune compartment, as well as how tumor cells could influence ECs during this process. In fact, cellular communication within the TME is not unidirectional, and lymphocytes, macrophages or fibroblasts also have impacts on ECs 63,64. Third, several targets and cell-cell predictions will require to be

RESULTATS

thoroughly validated and visualized using high dimension in situ imaging. Fourth, the 2D cocultures and MCTS cannot be seen as ideal models to mimic the TME. Rather they are means to study specific cell type/phenotype in which this culture model appears similar to the in situ condition. Nevertheless, adding flow to the MCTS with microfluidic device could certainly increase EC heterogeneity with artery/vein specification.

Notwithstanding these limitations, we believe our various culture models allow to better delineate the precise function of TECs within the TME, and how they could modulate tumor immunity. In the future, the MCTS could represent an added-value as a platform for drug screening and to dissect in-depth aspects of immune related EC functions.

Acknowledgments

We thank Eric Letouze, Marie Denoulet and Jennifer Derrien for valuable discussion on the bioinformatic analysis.

References

1. Thandra, K.C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J.S., and Barsouk, A. (2021). Epidemiology of lung cancer. *Contemp Oncol (Pozn)* 25, 45–52. <https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829>.
2. Howlader, N., Forjaz, G., Mooradian, M.J., Meza, R., Kong, C.Y., Cronin, K.A., Mariotto, A.B., Lowy, D.R., and Feuer, E.J. (2020). The Effect of Advances in Lung-Cancer Treatment on Population Mortality. *N Engl J Med* 383, 640–649. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1916623>.
3. Paz-Ares, L., Ciuleanu, T.-E., Cobo, M., Schenker, M., Zurawski, B., Menezes, J., Richardet, E., Bennouna, J., Felip, E., Juan-Vidal, O., et al. (2021). First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 22, 198–211. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30641-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30641-0).
4. Herbst, R.S., Giaccone, G., de Marinis, F., Reinmuth, N., Vergnenegre, A., Barrios, C.H., Morise, M., Felip, E., Andric, Z., Geater, S., et al. (2020). Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med* 383, 1328–1339. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1917346>.
5. Sezer, A., Kilickap, S., Gümüş, M., Bondarenko, I., Özgüroğlu, M., Gogishvili, M., Turk, H.M., Cicin, I., Bentsion, D., Gladkov, O., et al. (2021). Cemiplimab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 of at least 50%: a multicentre, open-label, global, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet* 397, 592–604. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00228-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00228-2).
6. Matsumoto, K., Shiroyama, T., Tamiya, M., Minami, T., Kinehara, Y., Tamiya, A., Suga, Y., Kuge, T., Mori, M., Suzuki, H., et al. (2024). Real-world outcomes of nivolumab plus ipilimumab and pembrolizumab with platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: a multicenter retrospective comparative study. *Cancer Immunol Immunother* 73, 4. <https://doi.org/10.1007/s00262-023-03583-4>.

RESULTATS

7. Amersfoort, J., Eelen, G., and Carmeliet, P. (2022). Immunomodulation by endothelial cells - partnering up with the immune system? *Nat Rev Immunol* 22, 576–588. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00694-4>.
8. Geldhof, V., de Rooij, L.P.M.H., Sokol, L., Amersfoort, J., De Schepper, M., Rohlenova, K., Hoste, G., Vanderstichele, A., Delsupehe, A.-M., Isnaldi, E., et al. (2022). Single cell atlas identifies lipid-processing and immunomodulatory endothelial cells in healthy and malignant breast. *Nat Commun* 13, 5511. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33052-y>.
9. Goveia, J., Rohlenova, K., Taverna, F., Treps, L., Conradi, L.-C., Pircher, A., Geldhof, V., de Rooij, L.P.M.H., Kalucka, J., Sokol, L., et al. (2020). An Integrated Gene Expression Landscape Profiling Approach to Identify Lung Tumor Endothelial Cell Heterogeneity and Angiogenic Candidates. *Cancer Cell* 37, 21-36.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.12.001>.
10. Lambrechts, D., Wauters, E., Boeckx, B., Aibar, S., Nittner, D., Burton, O., Bassez, A., Decaluwé, H., Pircher, A., Van den Eynde, K., et al. (2018). Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. *Nat Med* 24, 1277–1289. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0096-5>.
11. Verhoeven, J., Jacobs, K.A., Rizzollo, F., Lodi, F., Hua, Y., Poźniak, J., Narayanan Srinivasan, A., Houbaert, D., Shankar, G., More, S., et al. (2023). Tumor endothelial cell autophagy is a key vascular-immune checkpoint in melanoma. *EMBO Mol Med* 15, e18028. <https://doi.org/10.15252/emmm.202318028>.
12. Houbaert, D., Nikolakopoulos, A.P., Jacobs, K.A., Meçe, O., Roels, J., Shankar, G., Agrawal, M., More, S., Ganne, M., Rillaerts, K., et al. (2024). An autophagy program that promotes T cell egress from the lymph node controls responses to immune checkpoint blockade. *Cell Rep* 43, 114020. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114020>.
13. Asrir, A., Tardiveau, C., Coudert, J., Laffont, R., Blanchard, L., Bellard, E., Veerman, K., Bettini, S., Lafouresse, F., Vina, E., et al. (2022). Tumor-associated high endothelial venules mediate lymphocyte entry into tumors and predict response to PD-1 plus CTLA-4 combination immunotherapy. *Cancer Cell* 40, 318-334.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.01.002>.
14. Blanchard, L., and Girard, J.-P. (2021). High endothelial venules (HEVs) in immunity, inflammation and cancer. *Angiogenesis* 24, 719–753. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09792-8>.
15. Kambayashi, T., and Laufer, T.M. (2014). Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol* 14, 719–730. <https://doi.org/10.1038/nri3754>.
16. Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J., and Fridman, W.H. (2019). Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 19, 307–325. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0144-6>.
17. Njock, M.-S., O’Grady, T., Nivelles, O., Lion, M., Jacques, S., Cambier, M., Herkenne, S., Muller, F., Christian, A., Remacle, C., et al. (2022). Endothelial extracellular vesicles promote tumour growth by tumour-associated macrophage reprogramming. *J Extracell Vesicles* 11, e12228. <https://doi.org/10.1002/jev2.12228>.
18. Jin, S., Guerrero-Juarez, C.F., Zhang, L., Chang, I., Ramos, R., Kuan, C.-H., Myung, P., Plikus, M.V., and Nie, Q. (2021). Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. *Nat Commun* 12, 1088. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21246-9>.
19. Taverna, F., Goveia, J., Karakach, T.K., Khan, S., Rohlenova, K., Treps, L., Subramanian, A., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Eelen, G., et al. (2020). BIOMEX: an interactive workflow for (single

RESULTATS

- cell) omics data interpretation and visualization. *Nucleic Acids Res* 48, W385–W394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa332>.
20. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
21. Frafjord, A., Buer, L., Hammarström, C., Aamodt, H., Woldbæk, P.R., Brustugun, O.T., Helland, Å., Øynebråten, I., and Corthay, A. (2021). The Immune Landscape of Human Primary Lung Tumors Is Th2 Skewed. *Front Immunol* 12, 764596. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.764596>.
22. Nagl, L., Horvath, L., Pircher, A., and Wolf, D. (2020). Tumor Endothelial Cells (TECs) as Potential Immune Directors of the Tumor Microenvironment - New Findings and Future Perspectives. *Front Cell Dev Biol* 8, 766. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00766>.
23. Mestas, J., Crampton, S.P., Hori, T., and Hughes, C.C.W. (2005). Endothelial cell co-stimulation through OX40 augments and prolongs T cell cytokine synthesis by stabilization of cytokine mRNA. *Int Immunol* 17, 737–747. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh255>.
24. Soroosh, P., Ine, S., Sugamura, K., and Ishii, N. (2007). Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4⁺ T cells. *J Immunol* 179, 5014–5023. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5014>.
25. Sibilano, R., Frossi, B., Suzuki, R., D’Inca, F., Gri, G., Piconese, S., Colombo, M.P., Rivera, J., and Pucillo, C.E. (2012). Modulation of FcεRI-dependent mast cell response by OX40L via Fyn, PI3K, and RhoA. *J Allergy Clin Immunol* 130, 751–760.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.032>.
26. Arima, K., Watanabe, N., Hanabuchi, S., Chang, M., Sun, S.-C., and Liu, Y.-J. (2010). Distinct signal codes generate dendritic cell functional plasticity. *Sci Signal* 3, ra4. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000567>.
27. Toubiana, J., Rossi, A.-L., Belaidouni, N., Grimaldi, D., Pene, F., Chafey, P., Comba, B., Camoin, L., Bismuth, G., Claessens, Y.-E., et al. (2015). Src-family-tyrosine kinase Lyn is critical for TLR2-mediated NF-κB activation through the PI 3-kinase signaling pathway. *Innate Immun* 21, 685–697. <https://doi.org/10.1177/1753425915586075>.
28. Hohashi, N., Hayashi, T., Fusaki, N., Takeuchi, M., Higurashi, M., Okamoto, T., Semba, K., and Yamamoto, T. (1995). The protein tyrosine kinase Fyn activates transcription from the HIV promoter via activation of NF kappa B-like DNA-binding proteins. *Int Immunol* 7, 1851–1859. <https://doi.org/10.1093/intimm/7.11.1851>.
29. Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 10, 864–871. <https://doi.org/10.1038/ni.1770>.
30. Rutz, S., Eidschenk, C., and Ouyang, W. (2013). IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol Rev* 252, 116–132. <https://doi.org/10.1111/imr.12027>.
31. Basu, R., O’Quinn, D.B., Silberger, D.J., Schoeb, T.R., Fouser, L., Ouyang, W., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2012). Th22 cells are an important source of IL-22 for host protection against enteropathogenic bacteria. *Immunity* 37, 1061–1075. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.024>.
32. Sorin, M., Rezanejad, M., Karimi, E., Fiset, B., Desharnais, L., Perus, L.J.M., Milette, S., Yu, M.W., Maritan, S.M., Doré, S., et al. (2023). Single-cell spatial landscapes of the lung tumour immune microenvironment. *Nature* 614, 548–554. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05672-3>.

RESULTATS

33. Chatelain, C., Berland, L., Grard, M., Jouand, N., Fresquet, J., Nader, J., Hirigoyen, U., Petithomme, T., Combredet, C., Pons-Tostivint, E., et al. (2024). Interplay between oncolytic measles virus, macrophages and cancer cells induces a proinflammatory tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 13, 2377830. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2024.2377830>.
34. Blondy, T., d'Almeida, S.M., Briolay, T., Tabiasco, J., Meiller, C., Chéné, A.-L., Cellerin, L., Deshayes, S., Delneste, Y., Fonteneau, J.-F., et al. (2020). Involvement of the M-CSF/IL-34/CSF-1R pathway in malignant pleural mesothelioma. *J Immunother Cancer* 8, e000182. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000182>.
35. Hulo, P., Deshayes, S., Fresquet, J., Chéné, A.-L., Blandin, S., Boisgerault, N., Fonteneau, J.-F., Treps, L., Denis, M.G., Bennouna, J., et al. (2024). Use of non-small cell lung cancer multicellular tumor spheroids to study the impact of chemotherapy. *Respir Res* 25, 156. <https://doi.org/10.1186/s12931-024-02791-5>.
36. Abbott, A. (2003). Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 424, 870–872. <https://doi.org/10.1038/424870a>.
37. Velazquez, O.C., Snyder, R., Liu, Z.-J., Fairman, R.M., and Herlyn, M. (2002). Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks. *FASEB J* 16, 1316–1318. <https://doi.org/10.1096/fj.01-1011fje>.
38. De Moor, L., Merovci, I., Baetens, S., Verstraeten, J., Kowalska, P., Krysko, D.V., De Vos, W.H., and Declercq, H. (2018). High-throughput fabrication of vascularized spheroids for bioprinting. *Biofabrication* 10, 035009. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aac7e6>.
39. Fitzgerald, A.A., and Weiner, L.M. (2020). The role of fibroblast activation protein in health and malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 39, 783–803. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09909-3>.
40. Kieffer, Y., Hocine, H.R., Gentric, G., Pelon, F., Bernard, C., Bourachot, B., Lameiras, S., Albergante, L., Bonneau, C., Guyard, A., et al. (2020). Single-Cell Analysis Reveals Fibroblast Clusters Linked to Immunotherapy Resistance in Cancer. *Cancer Discov* 10, 1330–1351. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1384>.
41. Benadjaoud, M.A., Soysouvanh, F., Tarlet, G., Paget, V., Buard, V., Santos de Andrade, H., Morilla, I., Dos Santos, M., Bertho, A., l'Homme, B., et al. (2022). Deciphering the Dynamic Molecular Program of Radiation-Induced Endothelial Senescence. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 112, 975–985. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2021.11.019>.
42. Hao, Y., Hao, S., Andersen-Nissen, E., Mauck, W.M., Zheng, S., Butler, A., Lee, M.J., Wilk, A.J., Darby, C., Zager, M., et al. (2021). Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 184, 3573–3587.e29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.048>.
43. Bahri, M., Anstee, J.E., Opzoomer, J.W., and Arnold, J.N. (2023). Perivascular tumor-associated macrophages and their role in cancer progression. *Essays Biochem*, EBC20220242. <https://doi.org/10.1042/EBC20220242>.
44. Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zernecke, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., et al. (2007). MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 13, 587–596. <https://doi.org/10.1038/nm1567>.
45. Cao, L., Wang, X., Liu, X., Meng, W., Guo, W., Duan, C., Liang, X., Kang, L., Lv, P., Lin, Q., et al. (2023). Tumor Necrosis Factor α -Dependent Lung Inflammation Promotes the Progression of Lung Adenocarcinoma Originating From Alveolar Type II Cells by Upregulating MIF-CD74. *Lab Invest* 103, 100034. <https://doi.org/10.1016/j.labinv.2022.100034>.

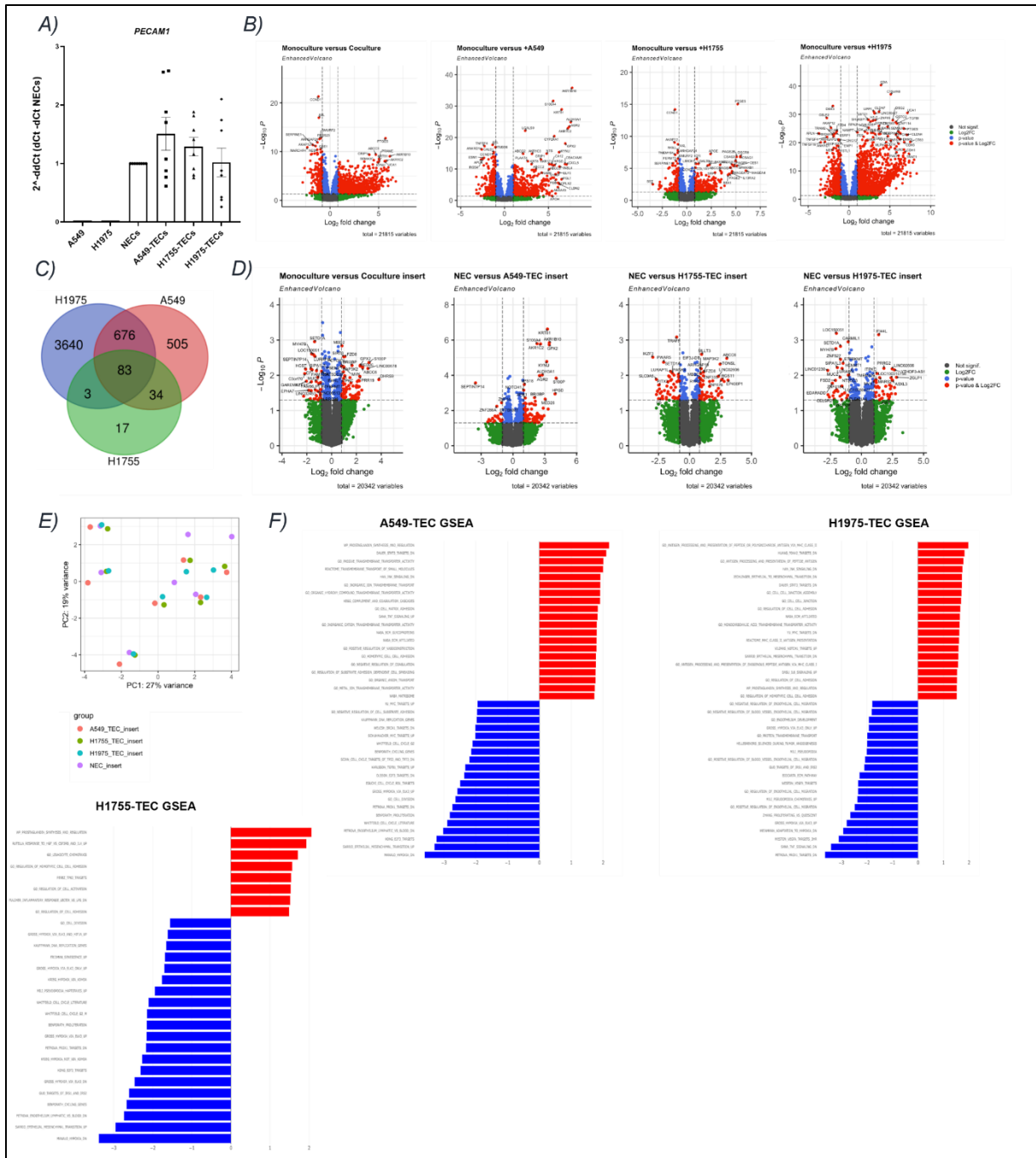
RESULTATS

46. Linch, S.N., McNamara, M.J., and Redmond, W.L. (2015). OX40 Agonists and Combination Immunotherapy: Putting the Pedal to the Metal. *Front Oncol* 5, 34. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00034>.
47. Weinberg, A.D., Rivera, M.M., Prell, R., Morris, A., Ramstad, T., Vetto, J.T., Urba, W.J., Alvord, G., Bunce, C., and Shields, J. (2000). Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. *J Immunol* 164, 2160–2169. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.2160>.
48. Imura, A., Hori, T., Imada, K., Ishikawa, T., Tanaka, Y., Maeda, M., Imamura, S., and Uchiyama, T. (1996). The human OX40/gp34 system directly mediates adhesion of activated T cells to vascular endothelial cells. *J Exp Med* 183, 2185–2195. <https://doi.org/10.1084/jem.183.5.2185>.
49. Kotani, A., Hori, T., Matsumura, Y., and Uchiyama, T. (2002). Signaling of gp34 (OX40 ligand) induces vascular endothelial cells to produce a CC chemokine RANTES/CCL5. *Immunol Lett* 84, 1–7. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(02\)00082-2](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(02)00082-2).
50. Croft, M., So, T., Duan, W., and Soroosh, P. (2009). The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol Rev* 229, 173–191. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00766.x>.
51. Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol* 12, 695–708. <https://doi.org/10.1038/ni.2065>.
52. Niccolai, E., Taddei, A., Ricci, F., Rolla, S., D’Elios, M.M., Benaglio, M., Bechi, P., Bencini, L., Ringressi, M.N., Pini, A., et al. (2016). Intra-tumoral IFN- γ -producing Th22 cells correlate with TNM staging and the worst outcomes in pancreatic cancer. *Clin Sci (Lond)* 130, 247–258. <https://doi.org/10.1042/CS20150437>.
53. Zeng, H., Liu, Z., Wang, Z., Zhou, Q., Qi, Y., Chen, Y., Chen, L., Zhang, P., Wang, J., Chang, Y., et al. (2020). Intratumoral IL22-producing cells define immunoevasive subtype muscle-invasive bladder cancer with poor prognosis and superior nivolumab responses. *Int J Cancer* 146, 542–552. <https://doi.org/10.1002/ijc.32715>.
54. McCuaig, S., Barras, D., Mann, E.H., Friedrich, M., Bullers, S.J., Janney, A., Garner, L.C., Domingo, E., Koelzer, V.H., Delorenzi, M., et al. (2020). The Interleukin 22 Pathway Interacts with Mutant KRAS to Promote Poor Prognosis in Colon Cancer. *Clin Cancer Res* 26, 4313–4325. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1086>.
55. Ma, R.-Y., Black, A., and Qian, B.-Z. (2022). Macrophage diversity in cancer revisited in the era of single-cell omics. *Trends Immunol* 43, 546–563. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.04.008>.
56. Goswami, S., Anandhan, S., Raychaudhuri, D., and Sharma, P. (2023). Myeloid cell-targeted therapies for solid tumours. *Nat Rev Immunol* 23, 106–120. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00737-w>.
57. Karam, M., Janbon, H., Malkinson, G., and Brunet, I. (2022). Heterogeneity and developmental dynamics of LYVE-1 perivascular macrophages distribution in the mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 42, 1797–1812. <https://doi.org/10.1177/0271678X221101643>.
58. Xiang, C., Zhang, M., Shang, Z., Chen, S., Zhao, J., Ding, B., Jiang, D., Zhu, Q., Teng, H., Zhu, L., et al. (2023). Single-cell profiling reveals the trajectory of FOLR2-expressing tumor-associated macrophages to regulatory T cells in the progression of lung adenocarcinoma. *Cell Death Dis* 14, 493. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06021-6>.
59. Nalio Ramos, R., Missolo-Koussou, Y., Gerber-Ferder, Y., Bromley, C.P., Bugatti, M., Núñez, N.G., Tosello Boari, J., Richer, W., Menger, L., Denizeau, J., et al. (2022). Tissue-resident FOLR2+

RESULTATS

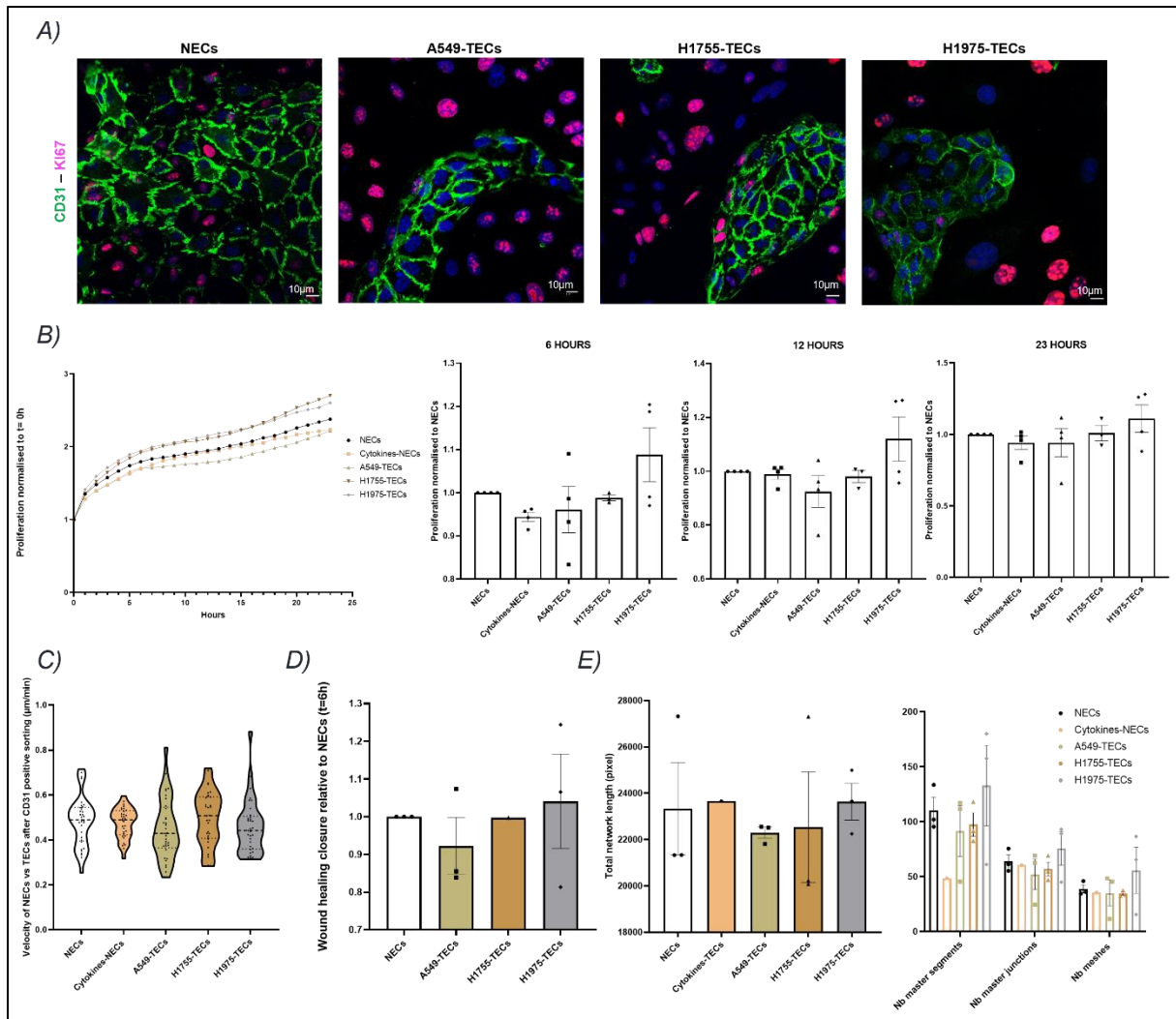
- macrophages associate with CD8+ T cell infiltration in human breast cancer. *Cell* 185, 1189-1207.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.02.021>.
60. Lewis, C.E., Harney, A.S., and Pollard, J.W. (2016). The Multifaceted Role of Perivascular Macrophages in Tumors. *Cancer Cell* 30, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.017>.
61. Cai, G.-L., Yang, Z.-X., Guo, D.-Y., Hu, C.-B., Yan, M.-L., and Yan, J. (2021). Macrophages enhance lipopolysaccharide induced apoptosis via Ang1 and NF- κ B pathways in human umbilical vein endothelial cells. *Sci Rep* 11, 2918. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82531-7>.
62. Fan, Y., Hao, Y., Gao, D., Li, G., and Zhang, Z. (2021). Phenotype and function of macrophage polarization in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rat model. *Physiol Res* 70, 213–226. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934456>.

Supplementary figures



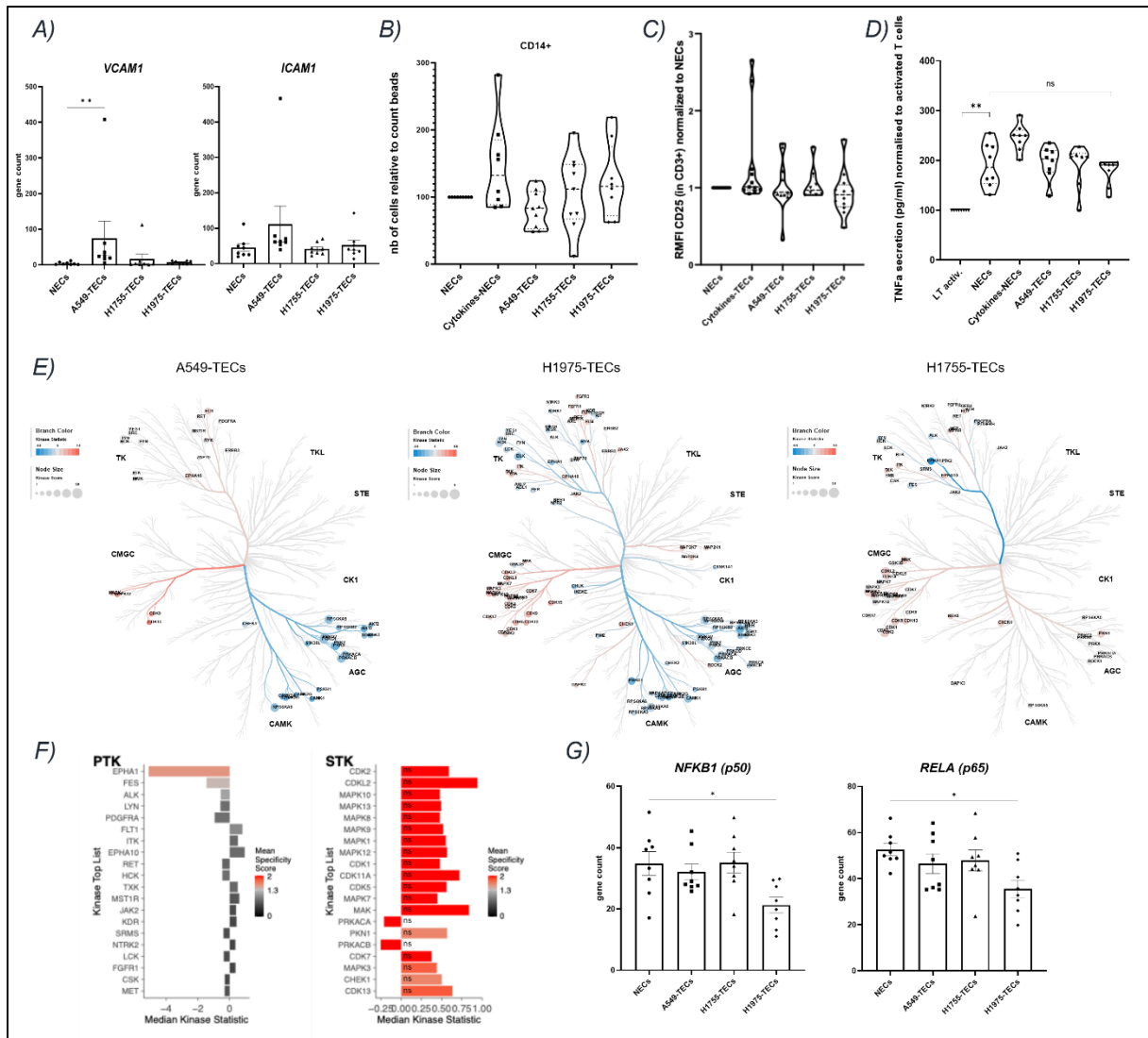
Supplementary Figure 1: A) RT-qPCR analysis of NSCLC cell lines and NSCLC-TECs after enrichment for the endothelial marker PECAM1. B) Volcano plots depicting differential analysis between each individual NSCLC direct coculture relative to the HUIVEC monoculture (adjusted p-value $p < 0.05$). C) Venn diagrams indicating congruent deregulated genes between each coculture versus monoculture (adjusted p-value $p < 0.05$). D) Volcano plots depicting differential analysis for the indirect cocultures system. E) PCA showing the distribution of each sample in the indirect coculture assay. Clustering appear mediated by the different HUIVEC donors and not by experimental conditions. F) Gene set enrichment analysis in each individual NSCLC-TECs versus NECs. Pathways enriched in each NSCLC-TECs appear in red. p-value $p < 0.05$

RESULTATS

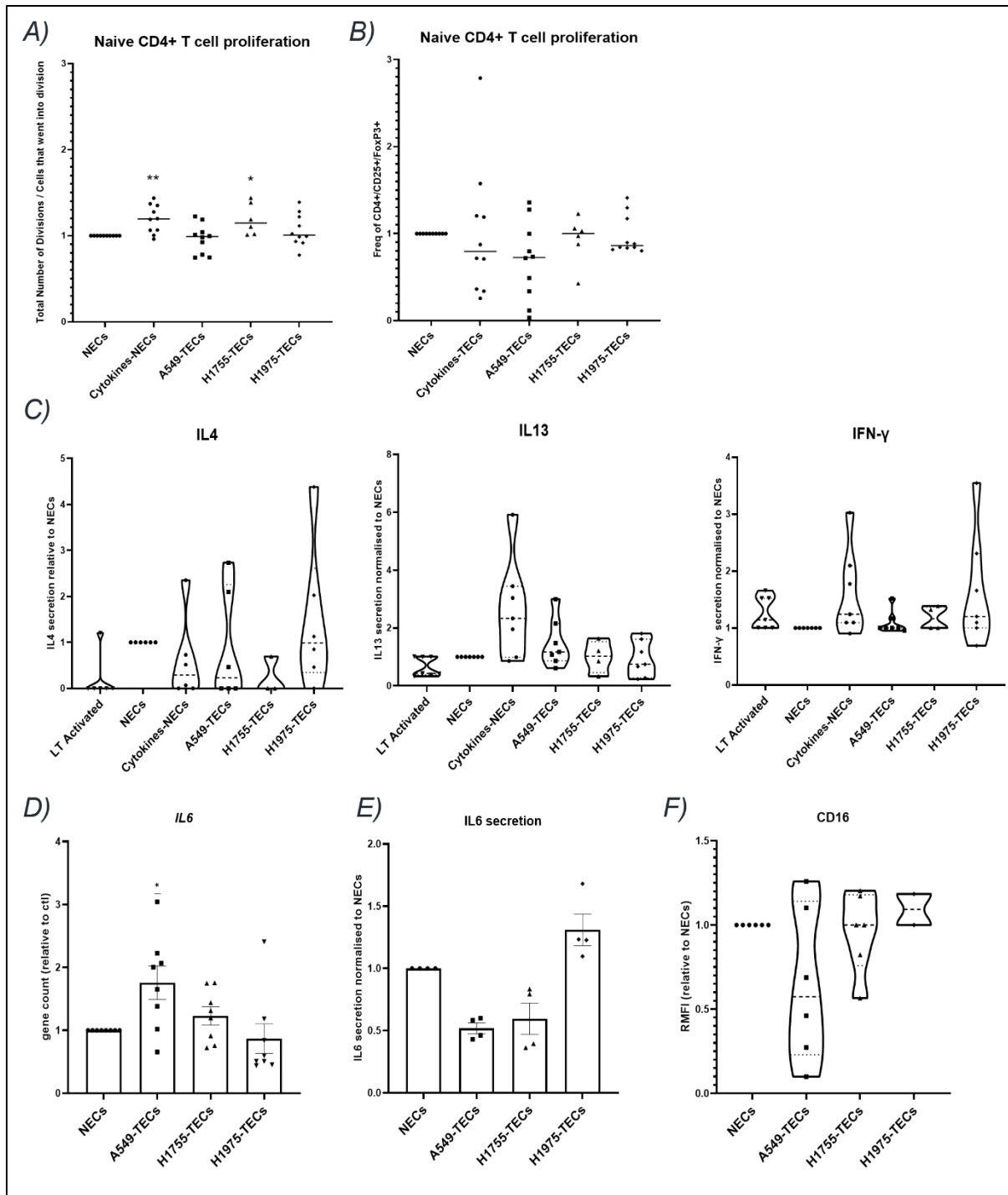


Supplementary Figure 2: A) Confocal microscopy of NECs and NSCLC-TECs cocultures, stained for the endothelial CD31 and the proliferation marker KI67. NECs and NSCLC-TECs were enriched with CD31 after cocultures and screened for various functions upon culture. B) Proliferation, normalised to t = 0h in function of time and at different times (t = 6h, 12h and 23h) normalised to monoculture. C) Velocity, in μm/min and normalized to monoculture. D) Scratch wound closure, and E) 2D tubulogenesis assay. Data are mean ± SEM, n > 3, Wilcoxon test compared to NECs.

RESULTATS

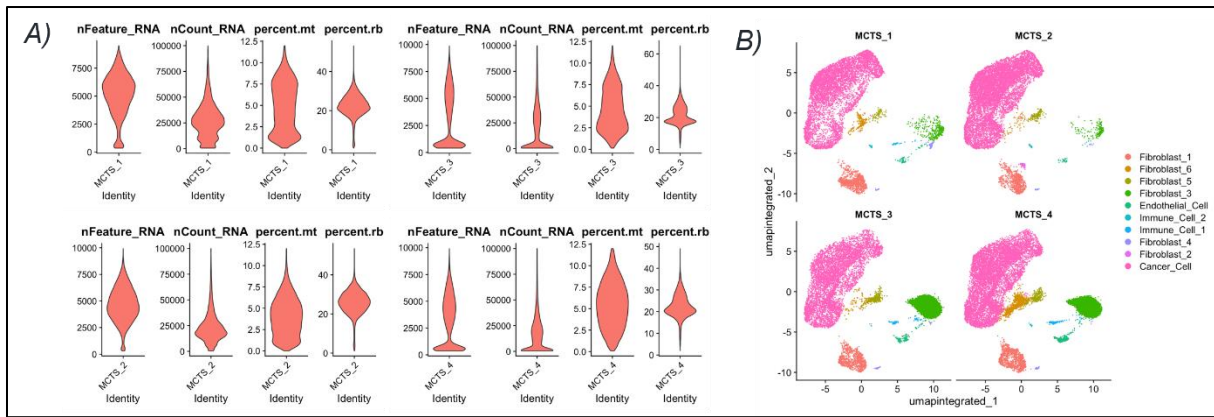


Supplementary Figure 3: A) Gene count expression from the 3'RNA-seq for *VCAM1* and *ICAM1* in NECs and NSCLC-TECs. B) Chemotaxis experiment for CD3+CD4+/CD14+ monocyte attracted by the coculture medium from NECs alone or NSCLC+TECs. C) Flow cytometry analysis for CD25 and D) TNFα ELISA secretion in polyclonal activated CD8+ T cells cocultured with NEC/NSCLC-TEC. E-F) Kinome analysis of protein tyrosine (PTK) serine/threonine kinase (STK) differentially regulated in analysis in NECs and NSCLC-TECs. E) Coral trees of the kinase differentially regulated in NSCLC-TECs compared to NECs. Kinase statistic represent the expression of the kinase compared to control (red is upregulated, blue downregulated). The diameter of the dots is proportional to its significance. F) Bar plots of the deregulated kinases in H1755-TECs. Note that all STK are not statistically significant. G) Gene count expression from the 3'RNA-seq for *NFKB1* and *RELA* in NECs and NSCLC-TECs. Data are mean ± SEM, n > 8, *p < 0.05, **p < 0.01, Kruskal-Wallis test, and Wilcoxon test compared to NECs.

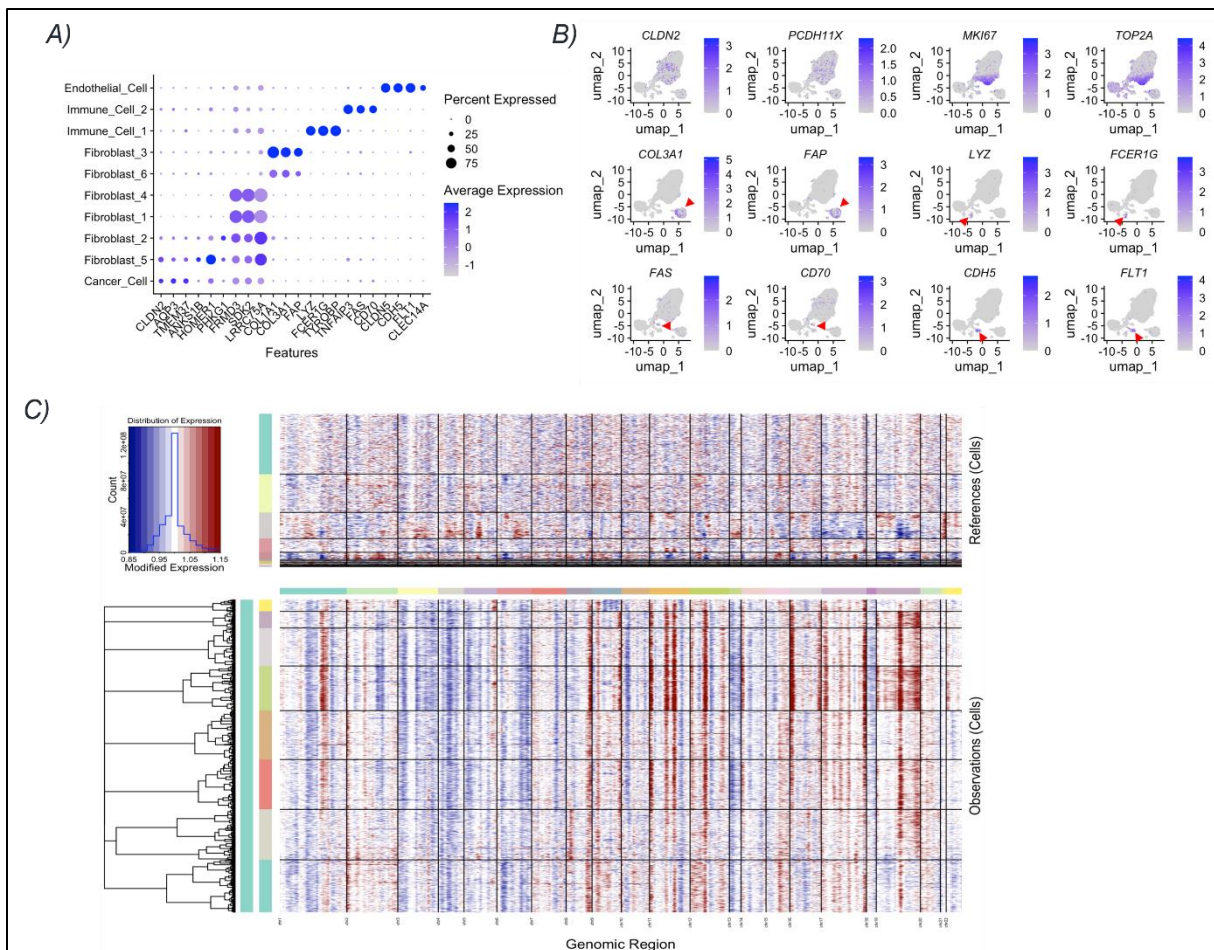


Supplementary Figure 4: A) Proliferation of and B) Treg polarization of naive CD4+ T cells in cocultures with NECs or NSCLC-TECs and assessed with CFSE by flow cytometry. C) Cytokine secretion detected by Legendplex in naive CD4 T cells/HUVEC cocultures. D) Gene count expression from the 3'RNA-seq for IL6 and E) IL-6 secretion by LegendPlex in NECs and NSCLC-TECs. F) Flow cytometry analysis for the M2-like polarization markers CD16 after the coculture between monocytes and NECs or NSCLC-TECs. Data are mean \pm SEM, $n > 4$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Wilcoxon test compared to NECs.

RESULTATS

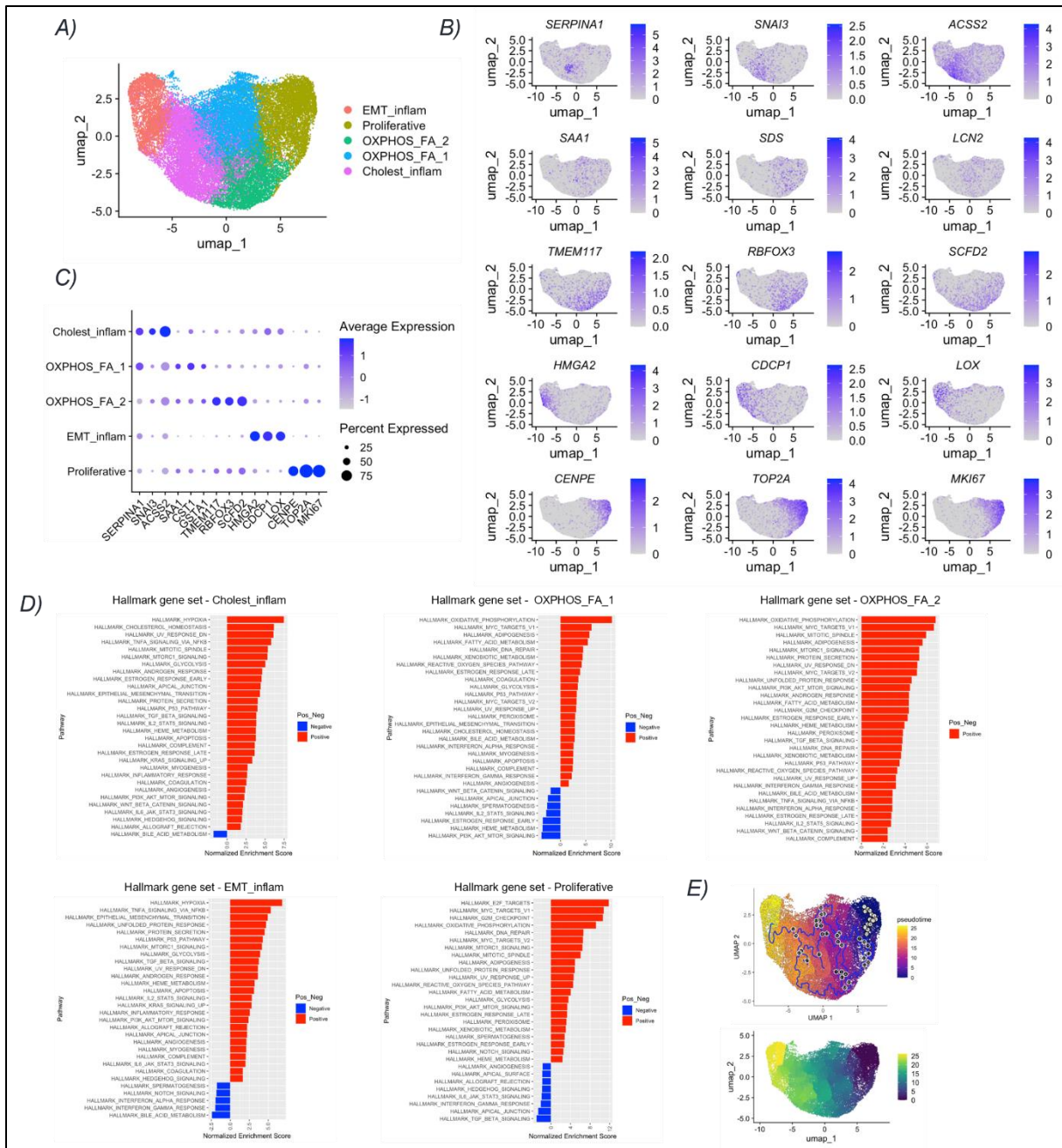


Supplementary Figure 5: A) Violin plots of the quality control matrix with the number of Features, count and percentage of mitochondrial (mt) and ribosomal (Rb) genes. B) uMAP depicting cell clustering across all samples.



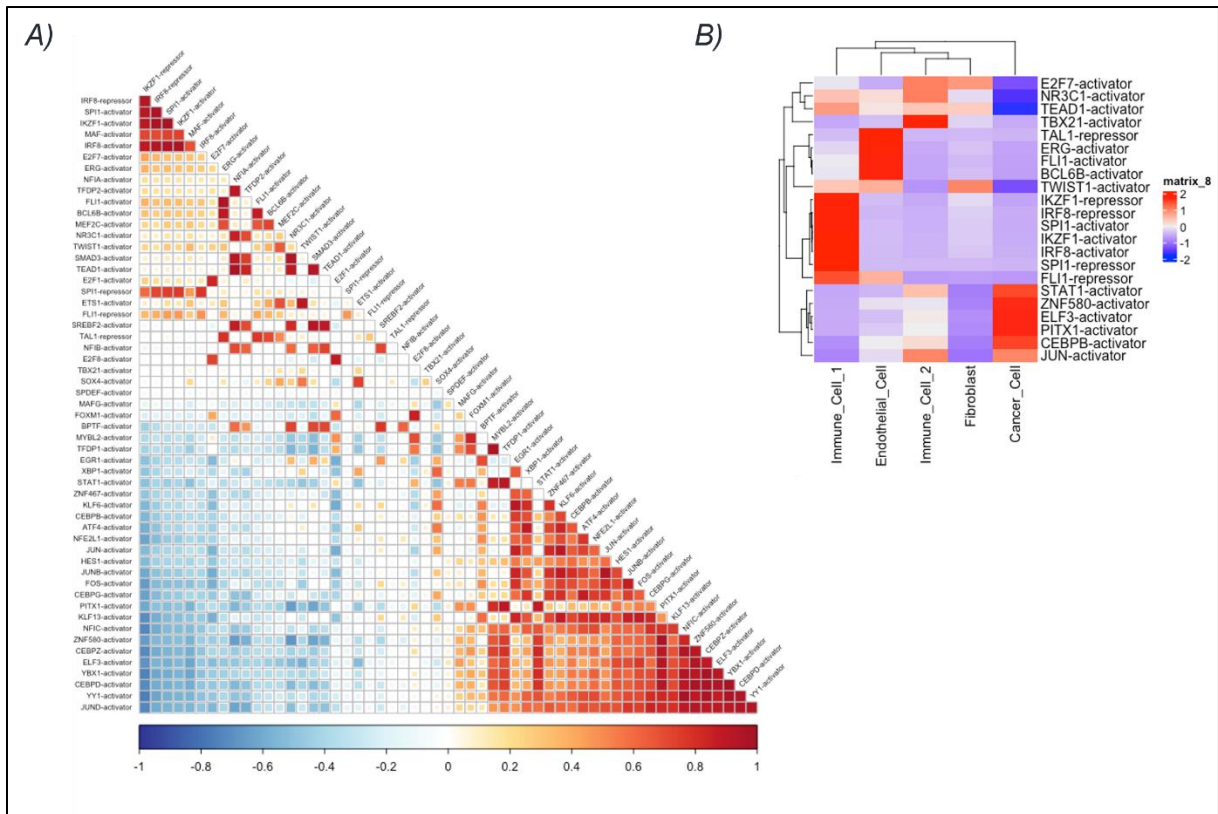
Supplementary Figure 6: A) Dotplot showing key marker genes for the different MCTS clusters before merging the clusters belong to the same cell type. B) uMAP representation of canonical marker genes. C) Heatmap representing the chromosomal abnormalities in cells from the scRNA-seq of MCTS, as inferred by inferCNV. Reference cells at the top are endothelial, fibroblast and immune cells clusters, while the cancer cells are presented in the heatmap at the bottom and show several CNV (red, gain; blue, loss).

RESULTATS

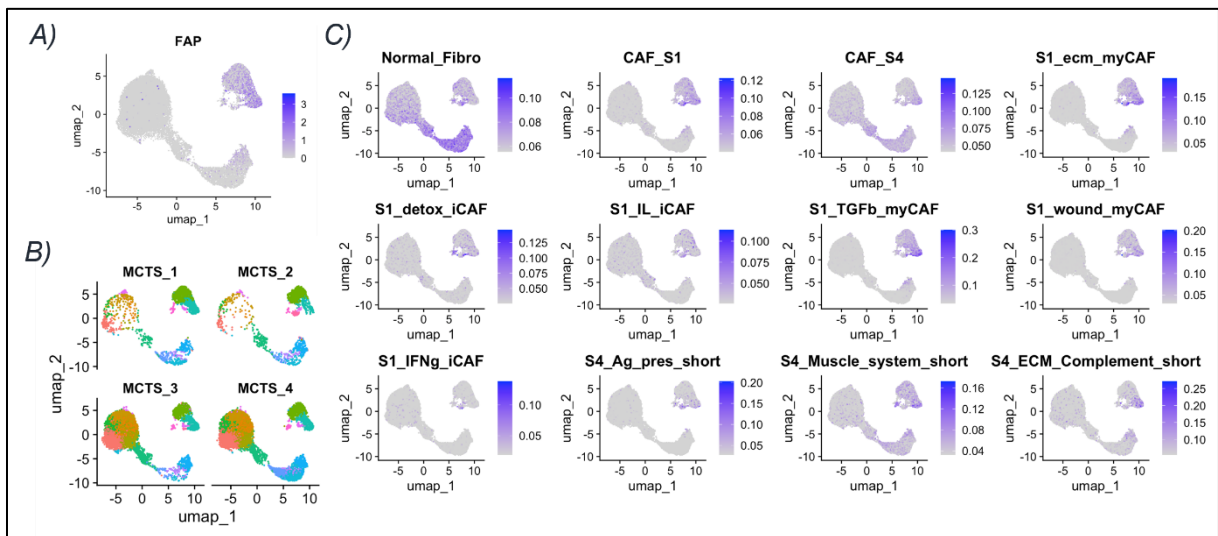


Supplementary Figure 7: A) uMAP representation of the cancer cell subsets present within MCTS. B) uMAP representation and C) dot plot of the marker genes for each cancer cell subcluster. D) Gene set enrichment analysis for each cancer cell subcluster according to the Hallmark gene set. E) Trajectory analysis (top) and pseudotime uMAP representation of the cancer cell subset using Monocle.

RESULTATS

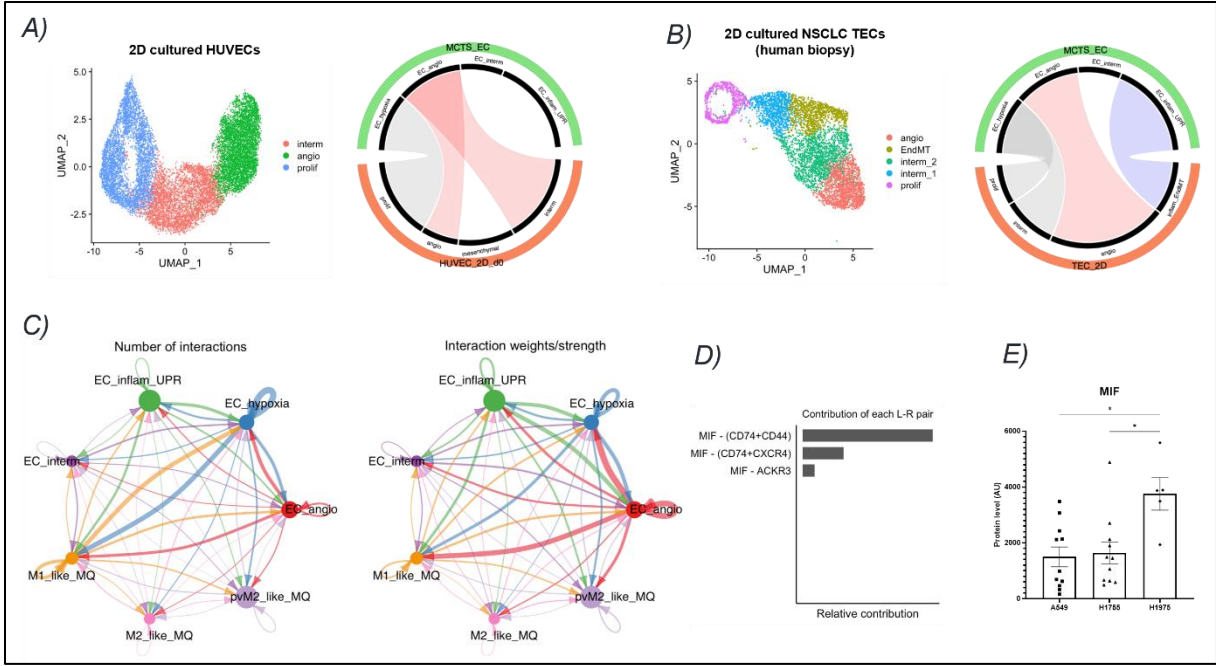


Supplementary Figure 8: A) Correlation plot depicting co-regulated transcription factors. B) Heatmap of the most specific regulons per cell type.



Supplementary Figure 9: A) Feature plot showing the expression of the cancer-associated fibroblast (CAF) marker FAP across all cell type clusters from the MCTS. B) uMAP showing the fibroblast cluster with C) marker gene signatures for the major CAF subtypes identified previously⁴⁰.

RESULTATS



Supplementary Figure 10: Gene set enrichment analysis of the top marker genes from the inflammatory MCTS-EC cluster. Circleplots showing the similarities between MCTS-EC subsets and 2D cultured A) normal HUVECs, and B) TECs isolated from NSCLC human biopsies. The inflammatory MCTS-EC cluster was absent in 2D HUVECs, but present in 2D cultured TECs from patients however associated with mesenchymal features rather than inflammation. C) Chord diagrams showing the number and interaction weight between each considered clusters. D) Contribution of each ligand-receptor pair to the MIF signaling pathway. E) Mass spectrometry proteomic analysis of the secretome of NSCLC cell lines for MIF.

RESULTATS

DISCUSSION INTERMEDIAIRE

Comme pour la partie résultat précédente, je souhaite aborder, en complément de la discussion générale (page 191), un point que nous n'avons pas discuté dans l'article mais qu'il me semble important de mentionner.

Il concerne le modèle de coculture 2D entre HUVEC et cellules tumorales. Nous avons pu observer, dans la condition H1975-TEC en particulier, des variations plus importantes que ce soit dans la transcriptomique ou dans les tests fonctionnels par rapport aux autres conditions. Nous avons pu observer, dans la condition H1975-TEC en particulier, une fraction plus importante de cellules CD31- de l'ordre de 10%. Or nous avons observé en qPCR une augmentation, bien que non significative, de l'expression des ARNs du gène *CD274* codant pour PD-L1. Afin de mieux comprendre ce biais expérimental nous avons alors regardé les niveaux d'expression de *EPCAM* et de la *CDH1* (E-cadhérine), marqueurs épithéliaux, dans les H1975-TECs et nous avons observé qu'ils étaient up-régulés à la fois dans le modèle de coculture direct et indirect basé sur l'utilisation de transwell (avec lesquels les cellules ne pouvaient effectuer de transmigration). Ces observations nous ont permis de montrer que l'expression de EpCAM et PD-L1 ne semblent pas provenir ou de manière très faible d'une contamination tumorale.

Nous avons alors émis l'hypothèse que les cellules tumorales pourraient transmettre des ARNs aux ECs par l'intermédiaire de l'endocytose des corps apoptotiques tumoraux ou chargés dans les EVs. Cette transmission d'ARNs fonctionnels a été montrée dans plusieurs études avec l'aide de protéines rapportrices comme la GFP ou la Gluc dont les ARNs étaient présents dans les cellules productrices d'EVs et la protéine produite dans les ECs receveuses^{463,464}. En associant ces suppositions à ceux de l'article, où nous montrons que les cellules tumorales induisent des modifications par contact direct, ces observations apportent une valeur ajoutée au modèle de coculture en soulèvent l'hypothèse intrigante d'une transmission d'ARNs tumoraux. Conjointement, nos travaux ont enrichi notre compréhension des mécanismes d'interactions entre les cellules tumorales, les ECs et les cellules du système immunitaire. Cependant, il reste à approfondir les voies et mécanismes cellulaires exacts impliqués dans l'influence des ECs sur l'activité immunitaire tumorale qui seront débattus plus en détail dans la partie suivante.

DISCUSSION



DISCUSSION

REMISE EN CONTEXTE DES PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

Dans le cancer du poumon, l'efficacité des immunothérapies est souvent mise en échec par l'apparition de divers mécanismes de résistance aux traitements. Il devient impératif de pouvoir dépasser les obstacles thérapeutiques en explorant de nouvelles cibles. A ce titre, les cellules endothéliales tumorales (TECs) suscitent un intérêt croissant, comme actrices principales dans l'angiogenèse et parce qu'elles agissent dans un cadre plus large d'interactions et d'échanges biologiques qui conditionnent la progression tumorale. Leurs contributions, qui ne se limitent pas à la seule fonction vasculaire en font des cibles thérapeutiques prometteuses dans le domaine des traitements anticancéreux.

A l'instar de plusieurs types cellulaires présents dans le TME, les TECs sont influencées par les signaux environnants et peuvent participer à l'immunosuppression. Toutefois, l'identification des mécanismes moléculaires responsables de phénotypes des ECs pathologiques reste difficile et la littérature qui les entoure se révèle parfois contradictoire. Ainsi, caractériser les ajustements phénotypiques des ECs en réponse aux variations du microenvironnement tumoral représente une direction de recherche prometteuse pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Dans cette optique, il est important de mettre en place des modèles d'étude pertinents s'appuyant sur les dernières avancées techniques pour étudier les dynamiques et les communications cellulaires.

L'objectif de ma thèse était de mieux comprendre la variabilité observée des TECs dans le CBNPC et d'explorer les relations qu'elles entretiennent avec les cellules immunitaires, afin d'établir leurs rôles dans la progression et l'immunomodulation du cancer. Dans cette discussion, je reviendrai sur les principaux résultats que j'ai pu obtenir, en analysant les limitations techniques et conceptuelles rencontrées et en exposant les perspectives du projet à court et moyen terme.

Mes travaux de thèse ont dans un premier temps permis d'analyser les différences existant entre les ECs provenant de tissus sains ou de tissus tumoraux de CBNPC tout en révélant les difficultés de mise en œuvre d'une étude sur des cellules primaires préparées à partir de biopsies de patients. Dans un second temps, face aux difficultés du modèle ex-vivo, j'ai développé des modèles alternatifs qui m'ont permis de mettre en évidence l'implication

DISCUSSION

du contact entre cellules tumorales et ECs pour l'induction d'un nouveau phénotype endothélial.

J'ai pu montrer que le phénotype des ECs activées est caractérisé par la surexpression d'ARNm et de molécules pro-inflammatoires (intégrines, cytokines et prostaglandines) et que cette modification phénotypique impacte la prolifération des LT CD4 polyclonaux après activation mais pas celle des LT naïfs. En revanche, les ECs semblent influencer la polarisation de ces LT naïfs et celle des monocytes en différentes sous-populations de macrophages exprimant des marqueurs plutôt de type M2-like. Je me suis également intéressée aux devenir des ECs et des monocytes dans un modèle de sphéroïde 3D multicellulaire (MCTS). Ce dernier nous a permis de souligner l'importance de développer un modèle plus complet et complexe que le modèle 2D pour observer un panel plus large de phénotypes cellulaires. Dans cette section, j'analyserai nos résultats à la lumière des découvertes récentes et des études-clés disponibles dans la littérature.

ÉTUDE DES CELLULES ENDOTHELIALES : TISSUS SAINS VS TUMORAUX

Nous avons exploré l'hypothèse selon laquelle les TECs, influencées par le TME, possèdent un transcriptome et un protéome distincts des NECs. Cette divergence pourrait jouer un rôle central dans la modulation de la réponse immunitaire antitumorale. Mes recherches se sont concentrées sur l'impact des TECs sur l'infiltrat immunitaire et leur potentiel à induire l'anergie ou l'activation des LT anti-tumoraux, en explorant à la fois les interactions directes et la communication via des petites vésicules extracellulaires (sEVs).

Pour ce faire, nous avons établi une collaboration avec le CHU de Nantes pour obtenir des biopsies de patients atteints de CBNPC pour lesquels du tissu sain adjacent avait également été prélevé, afin d'en isoler les ECs. Après le processus d'isolement qui s'est révélé difficile à standardiser, une validation fonctionnelle m'a permis de mettre en évidence que la taille totale du réseau formé par les TECs semble inférieure à celui de leur homologue NECs. Ces observations concordent avec les travaux de Sievert et al.⁴⁰⁷ chez la souris qui montrent que les TECs isolées de tumeurs ectopiques de lignées de mélanome (B16) forment des réseaux avec moins de ramifications par rapport aux NECs⁴⁵⁹. Ces résultats sont à nuancer car leurs auteurs ont comparé des TECs issues de mélanome aux NECs de cœur, dont les différences organotypiques peuvent certainement influencer la migration endothéliale⁴⁶⁵. En revanche, bien que les TECs montrent une capacité réduite à former des réseaux dans notre étude, elles présentent une proportion plus élevée de cellules de front ("tip cells"), généralement associée à une activité angiogénique accrue par rapport aux NECs. Ces résultats semblent indiquer une plus grande activité angiogénique des TECs par rapport aux NECs mais qui s'accompagne d'un réseau désorganisé et inachevé. La présence accrue de tip cells dans nos analyses font écho aux travaux de Goveia et al.⁵⁷, qui ont identifié des sous-populations transcriptomiques enrichies dans la fraction TECs, dont les tip cell (H8), les immatures (H9) et les activated postcapillary veinule (H10)⁴⁶⁶. Ces résultats soulèvent des préoccupations quant aux biais potentiels liés aux techniques d'isolement, qui pourraient favoriser la sélection de certaines sous-populations davantage adaptable en culture.

L'analyse comparative NEC/TEC a aussi révélé que les TECs adoptent un profil plutôt mésenchymateux par rapport aux NECs rejoignant les observations faites sur les TECs de prostate⁴⁶⁷. Ces analyses transcriptomiques sont appuyées par la morphologie des cellules

DISCUSSION

observées en microscopie à contraste de phase et par leur capacité réduite à former un réseau stable, caractéristique des cellules engagées dans un processus d'EndoMT. Cependant, les TECs n'affichent pas une augmentation de la migration, suggérant une EndoMT partielle. Il a d'ailleurs été montré que l'angiogenèse impliquait ce type d'EndoMT avec des cellules de front qui n'ont plus de polarité apico-basale et qui dégradent la matrice extracellulaire⁴⁶⁸. Des études ont aussi souligné le rôle crucial de la matrice extracellulaire dans l'induction de l'EndoMT. Dans des expériences *in vitro*, une élévation significative de l'expression de l' α -SMA, un marqueur de la transition EndoMT, a été observée lorsque les ECs étaient cultivées sur une matrice enrichie en fibronectine. En revanche, aucune augmentation n'a été constatée sur des matrices de collagène ou de gélatine^{469,470}. Cependant, le degré de plasticité des ECs, influencé par le contexte tissulaire et le support sur lequel elles sont cultivées, semble moduler leur aptitude à subir cette transition. Par exemple, des disparités dans la réponse au TGF- β 2 ont été documentées, indiquant que les ECs provenant de divers sites anatomiques peuvent répondre de manière hétérogène au processus d'EndoMT *in vitro*⁴⁷¹. Que ce soit des TECs issues de CBNPC⁴⁶⁶, ou bien des HUVECs cultivées pendant 7 jours⁴⁷² sur un support plastique en 2D, des analyses par scRNA-seq montrent bien l'émergence de phénotypes avec une signature d'EndoMT. Ces observations révèlent la complexité du phénotype des TECs, en particulier en lien avec l'influence de leur microenvironnement. Elles invitent à rester prudent sur l'interprétation des données obtenues à partir des cultures de TECs isolées de biopsies. En effet, étant donné que les méthodes d'isolement employées risquent de favoriser la sélection de sous-populations de TECs potentiellement minoritaires, cela pourrait occulter d'autres sous-types dotés de caractéristiques distinctes.

À notre connaissance, aucune analyse du miRnome des TECs et NECs n'a été réalisée jusqu'à présent, faisant de notre étude une recherche pionnière dans ce domaine. J'ai pu identifier une surexpression de deux miRNAs (miR-483-3p et miR-3074-5p) et une sous-expression de trois autres (miR-302a-5p, miR-210-3p et miR-138-5p). Les miRNAs surexprimés partagent 28 cibles communes, principalement impliquées dans les processus de dégradation des ARN et le métabolisme des acides gras. En revanche, les miRNAs sous-exprimés ne présentent aucune cible partagée, bien que 67 gènes soient ciblés par au moins deux miRNAs dans le groupe. Ces gènes sont associés à diverses voies biologiques liées à la glycosylation. Il convient cependant de considérer à nouveau ces résultats avec prudence, étant donné que

DISCUSSION

seul un nombre restreint de gènes a été analysé pour chacune de ces voies. Des travaux conduits par Chen et al.⁴⁷³ indiquent que le miR-302a-5p est diminué dans les tissus de NSCLC et que son augmentation est associée à une réduction de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules tumorales⁴⁷⁴. L'ARNm de l'intégrine $\alpha 6$ (ITGA6) est une cible du miR-302a-5p avec des propriétés de suppresseur tumoral. Dans leur étude de 2023, Kim et al. établissent que les TECs expriment des niveaux élevés d'ITGA6, qui seraient liés à l'angiogenèse dans le carcinome hépatocellulaire⁴⁷⁵. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'augmentation d'ITGA6 dans les TECs pourrait résulter de la réduction de l'expression du miR-302a-5p. Pour vérifier cette théorie, nous avons réalisé une qPCR de l'*ITGA6* sur six couples de TECs/NECs, mais nos résultats ont révélé des variations hétérogènes dans l'expression de cette cible. Ces disparités pourraient provenir de la présence de sous-types particuliers (CBNPC neuroendocrinien et épidermoïde) à partir desquels ont été isolées les TECs et NECs. De même, nous n'avons pas pu valider les données de la littérature au regard des cibles présumées du miR-210-3p, *USF1* et *PCGF3*. Pourtant une corrélation pourrait être établie entre la diminution du miR-210-3p et une surexpression de sa cible *USF1*, ou de la surexpression du miR-483-3p. En effet, le miR-483-3p dont l'expression est régulée par le complexe β -caténine/*USF1*⁴⁷⁶ est considéré comme un oncogène car il induit une résistance à l'apoptose en ciblant le facteur pro-apoptotique *PUMA*⁴⁷⁷. Si l'augmentation d'*USF1* avait été confirmée, nous aurions sans doute approfondi les implications de cette interaction chez les TECs. Concernant le miR-138-5p, il a été décrit comme influençant le processus angiogénique et potentiellement l'EndoMT en ciblant les ARNs des gènes tels que *VEGF*, *MMP-9* et *NOS3*. De plus, il a été identifié comme un régulateur de PD-L1 dans le contexte du CBNPC où il influencerait les interactions entre les cellules tumorales et le TME⁴⁷⁸. Cependant dans le cas de nos expériences, l'expression du gène *CD274* codant pour PD-L1 ne semble pas diminuer dans nos TECs par rapport aux NECs.

Par la suite, nous avons voulu déterminer le potentiel immunomodulateur des TECs en comparaison de celui des NECs, au regard des résultats des analyses transcriptomiques. Dans un premier temps, nous avons examiné la capacité des TECs à induire l'adhésion des PBMCs par rapport aux NECs. Ce point est particulièrement étudié dans la littérature scientifique, étant donné que les TECs constituent la première barrière à la migration des cellules immunitaires vers la tumeur. Nos résultats révèlent que, en condition basale ou après

DISCUSSION

stimulation avec du LPS ou un mélange de cytokines telles que TNF α et IL-1 β , les TECs semblent promouvoir une adhésion des PBMCs qui serait supérieure à celle des NECs. Cette observation est surprenante, surtout à la lumière des données transcriptomiques antérieures et en raison des études préexistantes qui décrivent les TECs dans le TME comme étant en état d'anergie⁴⁷⁹. En parallèle, j'ai analysé l'expression des molécules d'adhésion à la surface des TECs et des NECs dans des conditions basales. J'ai ainsi confirmé une baisse de l'expression de la VE-cadhérine, ce qui est en accord avec la réduction des ARNm associés à *CDH5*. Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée concernant l'expression des protéines ICAM-1 et VCAM-1. Pour compléter nos observations, des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'effet des cytokines pro-inflammatoires sur l'expression de ces protéines d'adhésion par les TECs.

Il est envisageable que les mécanismes d'adhésion puissent impliquer des voies alternatives moins bien caractérisées que celles traditionnellement étudiées. Il est effectivement reconnu que, bien que de nombreux facteurs facilitant les interactions entre leucocytes et endothélium aient été identifiés, il existe également des inhibiteurs endogènes de l'adhésion leucocytaire. Notamment, dans les tissus cérébraux et pulmonaires, la molécule dérivée de l'endothélium 'locus-1 endothélial développemental' (Del-1), a été caractérisée comme un agent anti-adhésif, susceptible de perturber les liaisons entre les leucocytes et l'endothélium qui dépendent des intégrines LFA-1 et ICAM-1⁴⁸⁰. Une étude antérieure a démontré qu'une déficience en Del-1 au niveau endothélial entraînait une augmentation de l'adhésion des leucocytes qui était dépendante de LFA-1, tant *in vitro* qu'*in vivo*⁴⁸⁰. Cependant, dans le cadre de notre étude, nous n'avons observé aucune variation significative de l'expression de Del-1 au cours de l'analyse 3'RNAseq. En revanche, des études *in vitro* ont révélé que l'interaction entre la protéine Esm1 et la molécule d'adhésion LFA-1 peut entraver l'adhésion des leucocytes en inhibant leur liaison à ICAM-1⁴⁸¹. Étant donné que les niveaux transcriptomiques d'Esm1 sont réduits dans les TECs, cela pourrait être une des pistes parmi d'autres expliquant l'augmentation observée de l'adhésion des PBMCs. Ainsi, il serait pertinent d'explorer d'autres mécanismes par lesquels les TECs stimulées pourraient faciliter l'adhésion, malgré l'absence d'expression des molécules d'adhésion classiques.

Nous avons ensuite exploré l'expression de PD-L1, une cible de choix des immunothérapies. L'expression de PD-L1 par les ECs a suscité un intérêt croissant dans le

DISCUSSION

domaine de l'immunologie tumorale et les maladies auto-immunes, en raison de son implication dans la modulation des réponses immunitaires. PD-L1 et PD-L2, les ligands connus de la voie de signalisation PD-1, sont exprimés de manière variable selon les sources endothéliales et les espèces. Par exemple, des études sur des cultures primaires de ECs de cerveau humain ont révélé que ces cellules expriment des niveaux faibles voire indétectables de PD-L1 au repos qui se trouvent augmentés en réponse à des stimuli pro-inflammatoire⁴⁸². De manière générale, l'expression de PD-L2 est plus restreinte que celle de PD-L1 mais peut également être augmentée en fonction des conditions environnementales. La régulation de PD-L1 sur les ECs semblent être influencée par des facteurs du TME comme l'hypoxie et l'inflammation⁴⁸³. L'importance de cette régulation dans les ECs, en particulier dans un contexte tumoral, est essentielle pour mieux comprendre comment les ECs influencent les cellules immunitaires dans le TME⁴⁸⁴. Ainsi, dans un modèle d'implantation de tumeur mélanome B16 chez la souris, les TECs expriment des molécules de costimulation, le CMH de classe II, et PD-L1, suggérant qu'il s'agit de cellules présentatrices d'antigène avec une activité suppressive⁴⁸⁵. D'autres études ont démontré que l'expression de PD-L1 sur les TECs est associée à une diminution de l'infiltration des LT CD8⁺ et à une augmentation des Treg FOXP3⁺ et de leur capacité inhibitrice au sein des tumeurs, créant une « barrière immunosuppressive » qui favorise la progression tumorale^{424,486}. En ce qui concerne notre étude, bien que nos résultats semblent montrer une très légère diminution des niveaux protéiques de PD-L1 dans les TECs, aucune variation au niveau de l'ARNm n'a été détectée. Nous avons alors cherché à déterminer si cette baisse de PD-L1 sur les TECs avait un impact sur l'activité des LT CD8⁺. Pour cela, j'ai co-cultivé des clones T CD8⁺ en présence de leurs cellules tumorales cibles exprimant la luciférase (N-luc), relarguée suite à la mort cellulaire, et ajouté à la coculture des TEC ou des NEC. Les résultats obtenus montrent que les TECs n'altèrent pas de manière significative la capacité des LT CD8⁺ à lyser les cellules tumorales par rapport aux NECs. Motz et al., ont montré dans leur étude parue en 2014 que les TECs provenant d'échantillons d'adénocarcinomes du sein, du côlon, du rein, de la vessie, de la prostate ou de l'ovaire humains expriment plus fortement la molécule immunosuppressive FASL que les NECs⁴⁸⁷ ce qui n'est pas le cas dans nos TECs issues de CBNPC.

Cette situation soulève la question de savoir si l'absence d'expression de FASL dans nos échantillons est attribuable à la nature spécifique du cancer pulmonaire. Alternativement,

DISCUSSION

il est possible que nos cellules TECs en culture aient perdu l'expression de FASL, une protéine dont l'induction semble être influencée par le contexte environnemental. Dans la mesure où les ECs sont capables de détecter et de répondre à leur environnement, la large gamme de signaux d'un organe à l'autre est suffisante pour générer une forte hétérogénéité phénotypique. Lorsqu'elles sont isolées de leur environnement tissulaire natif et mises en cultures *in vitro*, il est vraisemblable qu'elles perdent leurs liaisons avec des signaux essentiels et subissent une dérive phénotypique. Par ailleurs, des études ont démontré que l'extraction des cellules de leur organe d'origine et leur culture *ex vivo* entraîne une perte des mécanismes de régulation épigénétique, conditionnant l'expression différentielle des gènes^{488,489}. Par exemple, les HEV isolées des amygdales humaines perdent de multiples marqueurs spécifiques aux tissus après seulement 2 jours de culture⁴⁸⁹. En conséquence, les études portant sur les ECs en culture sont rapidement limitées par l'important changement de leur microenvironnement.

Récemment, plusieurs études ont révélé que les exosomes (ou petites EVs) dérivés des cellules tumorales influencent fortement le TME. En revanche, le rôle des exosomes d'origine endothéliale dans l'immunité et la progression tumorale demeure peu exploré. Dans la dernière phase de mon étude, j'ai cherché à déterminer si les EVs produites par les TECs issues de CBNPC pouvaient affecter le comportement des LT effecteurs antitumoraux. Après avoir validé la méthode de purification des EVs et dans les conditions de mon modèle, j'ai observé que le traitement par EVs semble augmenter l'activité des LT CD8⁺ sans différence notable entre les EVs provenant de TECs ou de NECs. Cette absence d'effet nous a surpris, surtout en tenant compte de l'étude de Lopatina et al., ayant montré un effet du traitement des EVs de TECs sur les PMBCs⁴⁶⁰. Ici encore, la différence d'impact sur les cellules immunitaires pourrait s'expliquer par une origine tumorale différente. Une étude récente a montré que les EVs de TECs isolées de carcinomes épidermoïdes peuvent favoriser l'immunosuppression via l'induction de TGF- β 1, IL-10, et l'expansion des cellules Treg⁴⁶⁰. D'autres ont également observé que les EVs de TECs enrichies en mTOR soutiennent l'immunosuppression tumorale et favorisent les métastases⁴⁹⁰. Pour finir, une étude italienne a montré que les EVs isolées de TECs, tout en favorisant la croissance tumorale par l'induction de l'expression de PD-L1 dans les cellules myéloïdes, n'affectaient pas les LT naïfs⁴⁹¹. Il serait donc pertinent, dans le cadre

DISCUSSION

de notre étude, d'examiner l'impact des EVs sur d'autres populations immunitaires que les LT ou encore sur les cellules tumorales elles-mêmes.

Malgré ces résultats et les pistes potentielles que nous aurions pu développer, nous avons décidé de mettre fin à ce projet au début de ma troisième année de thèse et après discussion avec les membres de mon comité de suivi individuel. En effet, et comme abordé dans la discussion intermédiaire des résultats, le principal frein de l'étude a émergé dès l'étape de préparation des TECs à partir des biopsies de tumeurs, avec le constat d'une dérive des cellules cultivées. Cette dérive est rapidement apparue comme susceptible de limiter la pertinence des analyses phénotypiques comparatives. L'accès à la cohorte BREATHE incluant des patients atteints de CBNPC avant et après traitement est un avantage considérable pour notre équipe permettant de récupérer divers échantillons biologiques (sang périphérique, biopsies). Cependant, la plupart des patients bénéficie maintenant d'une thérapie néoadjuvante avant l'intervention chirurgicale. Ce traitement préopératoire a pour objectif de réduire les dimensions des tumeurs à exciser. Outre l'impact non négligeable que le traitement peut avoir sur le TME et les ECs, la réduction de la tumeur a limité notre capacité à disposer d'échantillons adaptés à l'isolement de populations cellulaires et à l'analyse approfondie que nous souhaitons entreprendre. De plus, maintenir en culture des ECs issues de biopsies a constitué un défi supplémentaire, principalement en raison de la nature plastique et primaire de ces cellules.

Contrairement à notre approche *in vitro*, qui a mis en lumière les difficultés à préserver le phénotype des TECs sur une période prolongée, la communauté scientifique privilégie largement des modèles *in vivo*, comme les modèles murins, de poisson zèbres ou de CAM (chick chorioallantoic membrane)⁴⁹², ou bien se concentre sur des études transcriptomiques immédiatement après l'isolement des cellules de la tumeur. Ces méthodes permettent de maintenir les caractéristiques spécifiques des ECs en limitant leur exposition aux conditions de culture. Elles minimisent ainsi les risques de dédifférenciation ou de biais induits par les conditions expérimentales. En revanche, ces approches ne permettent pas de valider les aspects phénotypiques fonctionnels associés aux observations transcriptomiques. Certaines équipes répondent à cette nécessité de pouvoir cultiver des ECs tout en conservant un phénotype tumoral en recourant à des surnageants conditionnés⁴⁹³. Ce milieu conditionné est obtenu après un temps d'incubation avec des cellules tumorales, puis utilisé pour traiter les

DISCUSSION

ECs ce qui permet d'étudier l'impact du sécrétome sur l'endothélium. Bien que cette méthode soit plus simple, elle présente l'inconvénient de ne pas seulement ajouter des signaux émis par les cellules tumorales mais également de dépleter le milieu en cytokine et autres nutriments. L'absence de ces signaux initialement évalués comme nécessaires à la culture des ECs introduit un biais supplémentaire dans les résultats expérimentaux.

Pour nous affranchir des trop fortes contraintes de mise en culture de TECs tout en conservant l'ambition de décrire les fonctions biologiques des EC, nous avons réfléchi à un modèle alternatif de coculture intégrant des HUVEC afin de mimer le compartiment vasculaire sain. Ces modèles incluent des cellules tumorales de CBNPC ainsi que d'autres types cellulaires, dans des contextes en 2D et 3D. Cette nouvelle approche, développée au cours de ma troisième année de thèse, offrait la possibilité d'une complexité accrue par rapport aux monocouches de cellules en 2D. Elle apporte également la possibilité de faire varier les paramètres environnementaux, afin de s'approcher au plus près des conditions *in vivo*. De plus, ces co-cultures profitent des mêmes avantages que les cultures en surnageant conditionné tout en limitant le biais de consommation du milieu et en offrant un contact direct entre les HUVEC et les cellules tumorales. Cependant, ces modèles présentent également des limitations et comportent des contraintes spécifiques, que nous aborderons en détail dans la partie suivante.

MODELISATION DU CONTACT TUMEUR/ENDOTHELIUM : IMPACT SUR LA REPONSE IMMUNITAIRE

Nous avons exploré l'hypothèse selon laquelle les ECs, influencées par leur contact avec les cellules tumorales, subissent des modifications transcriptomiques et phénotypiques qui peuvent altérer leur fonctionnement initial et conduire à une transformation tumorale de l'endothélium. Dans cette hypothèse, cette transformation des ECs pourrait jouer un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire antitumorale. Nos recherches se sont donc concentrées sur la mise en évidence de propriétés immunomodulatrices des HUVECs après leur mise en contact avec les cellules tumorales. Nous avons notamment recherché dans quelle mesure elles pouvaient influencer l'activité des LT CD8⁺ effecteurs, des CD4⁺ auxiliaires mais aussi la différenciation des LT naïfs et des monocytes en macrophages.

Notre approche s'est inspirée des travaux réalisés en 2022 par Njock et al. sur un modèle de coculture de HUVECs et de cellules de cancer du sein triple négatif (MDA-MB-231)⁴⁹⁴. Nous avons, sur le même principe, exposé des HUVECs pendant 48 heures à trois lignées cellulaires tumorales de CBNPC (A549, H1755 et H1975) représentatives d'une hétérogénéité mutationnelle. J'ai ensuite ré-isolé les HUVECs à partir des cocultures. Par simplicité, dans la suite de mon manuscrit les HUVECs cocultivées avec les différentes lignées seront appelées de façon générale les NSCLC-TECs, et plus précisément A549-TECs, H1755-TECs et H1975-TECs, tandis que les monocultures contrôles seront identifiées comme NECs. Pour évaluer les modifications induites par la co-culture, nous avons effectué un séquençage 3'RNAseq qui nous a permis de montrer que les NSCLC-TECs présentaient des variations d'expression génique caractéristiques d'un profil d'activation endothéliale. Ce profil est marqué par la surexpression de gènes pro-inflammatoires, notamment ceux codant pour des molécules d'adhésions cellulaires et des chimiokines. Un différentiel d'expression s'est également dégagé pour des gènes impliqués dans plusieurs voies de signalisation, révélant une activation potentiellement accrue des voies de synthèse des prostaglandines, des voies impliquées dans l'adhésion cellulaire et dans la présentation antigénique en particulier du CMH de classe II. En revanche, aucune différence n'a été observée dans l'expression de marqueurs de la transition EndoMT ou dans les capacités d'angiogenèse des NSCLC-TECs. Un tel profil d'activation des ECs a également été mentionné dans l'étude de Njock. Leur travaux n'impliquent qu'une seule lignée tumorale en coculture avec les HUVECs, contrairement à

DISCUSSION

notre étude qui révèle que le type de cellules cancéreuses pourrait exercer une influence variable sur les profils des HUVECs co-cultivées. En effet, les H1755-TECs (mutations tumorales *BRAF* et *TP53*) affichent un profil transcriptomique moins éloigné des NECs que les H1975-TECs (mutations tumorales *EGFR* et *TP53*) ou des A549-TECs (*KRAS-G12S*). Plus précisément, le contact avec les cellules H1755 engendre chez les ECs un différentiel significatif d'expression de seulement 137 gènes par rapport aux NECs, tandis que les cellules H1975 induisent des variations sur 4402 gènes et les A549 sur 1298 gènes. Pour les gènes d'expression modifiée, 83 étaient communément dérégulés dans les trois lignées tumorales étudiées.

Pour s'affranchir des effets de contacts directs et explorer les effets d'une signalisation paracrine, nous avons développé un modèle de coculture indirect entre CBNPC et HUVECs via l'utilisation de filtres « transwell ». Les cellules sontensemencées dans deux puits distincts, séparés par une membrane poreuse laissant passer les signaux sécrétés. Nous avons observé que l'influence des cellules tumorales était fortement réduite dans ce modèle de co-culture indirecte, comparativement à la situation où les HUVECs sont cultivées dans le même puits que les cellules tumorales. Cette différence suggère que des interactions membranaires impliquant des ligands et des récepteurs présents à la surface des différents types cellulaires sont mobilisées pour conduire aux changements des ECs. L'effet biologique peut aussi être la conséquence de la formation de jonctions intercellulaires facilitant les échanges directs de matériel intracellulaire. Ce mode de communication a été mis en avant par une équipe nantaise, qui a démontré que le transfert de peptides tumoraux des cellules tumorales vers les EC via les «Gap junctions» permettait une reconnaissance et une activation des LT cytotoxiques⁴⁹⁵. Avec cette donnée que la signalisation paracrine n'est pas le mode principal de communication impliquée dans l'activation des profils des TECs, nous nous sommes concentrés sur les modèles de coculture par contact direct.

En lien avec le profil transcriptomique d'activation, les A549-TECs ont montré une augmentation de l'expression des ARNs de VCAM-1 après 48 heures de coculture. Cette surexpression serait cohérente avec l'amélioration de l'adhésion des leucocytes observée 6 heures après le tri. Malgré cette augmentation transcriptomique significative, l'expression protéique de VCAM-1 n'est que de 1,5 fois supérieure, ce qui n'est peut-être pas suffisant pour observer un effet fonctionnel. De plus, l'expression des intégrines semble transitoire avec une diminution de l'adhésion constatée à 24 heures. En complément de ces observations,

DISCUSSION

nous avons évalué la transcription de gènes cibles après la remise en culture des HUVECs triées à différents temps. J'ai extrait les ARNs à T0 après le tri, puis à 6, 24, 48 et 72 heures. Les résultats de qPCR suggèrent que pour certains gènes particuliers, les cellules tendent à perdre les caractéristiques acquises durant la coculture pour retrouver un niveau d'expression similaire à celui observé dans les monocultures après 48 heures. Ces extractions nous ont également permis de mettre en évidence que le tri magnétique pourrait avoir un impact sur les HUVECs en activant l'induction de voies de signalisation par l'intermédiaire de la fixation de l'anticorps sur le CD31 cellulaire. Toutefois, étant donné que toutes les cellules sont comparées à leur conditions monoculture contrôle, ayant reçu le même traitement (dont le tri), ce biais est pris en compte dans nos observations.

Les ECs cocultivées au profil pro-inflammatoire ont révélé, en plus d'une surexpression des molécules d'adhésion ICAM et VCAM, une différence d'expression de gènes impliqués dans divers processus de régulation du système immunitaire et plus particulièrement liés au recrutement des cellules immunitaires. Une augmentation de l'expression de nombreux gènes codants pour des chimiokines tels que CXCL10, CCL5, caractérise ainsi les ECs en condition de coculture. Concernant les phénotypes fonctionnels, le milieu conditionné par les H1755-TECs et H1975-TECs post-tri, favorise un recrutement significatif des LT CD8⁺ et LT CD4⁺ lors d'un test de migration en transwell. A noter que l'augmentation se limite à une tendance pour les A549-TECs. En revanche, aucun des milieux conditionnés de TEC/NEC n'a modifié la migration de monocytes circulants. Il est à noter que les milieux sont conditionnés après tri pendant seulement 6 heures. Cela soulève des questions sur la quantité et la temporalité de la production des chimiokines dans le surnageant, qui pourrait ne pas être optimale pour le recrutement. L'étape de diapédèse, autre étape-clé de la réponse immunitaire, pourrait aussi être analysée en mesurant les capacités de transmigration des PBMCs à travers une barrière monocouche de NSCLC-TECs.

Parmi les gènes de co-stimulation immunitaire différenciellement exprimés, nous avons porté notre attention sur OX40L, dont le niveau d'expression est diminué dans toutes les HUVECs cocultivées. En tant que facteur-clé dans l'activation des LT CD4⁺ et CD8⁺, l'atténuation de la signalisation OX40/OX40L compromet la réponse anti-tumorale. En effet, il a été montré dans plusieurs modèles de cancer, que l'utilisation d'un anticorps agoniste anti-OX40 renforce l'immunité anti-tumorale engendrée par les LT, ce qui favorise la régression

DISCUSSION

tumorale et la survie des patients^{496,497}. Dans mon modèle, nous avons montré que les A549-TECs ou H1975-TECs induisaient une diminution significative de la prolifération de LT CD4 polyclonaux après activation. Nous formulons l'hypothèse que cette inhibition découle de la défaillance du signal de soutien prolifératif normalement apporté par OX40/OX40L au moment de l'activation des LT. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'aucune différence de prolifération n'est observée dans le cas des LT naïfs, qui n'expriment OX40 que très tardivement après leur activation⁴⁹⁸. Pour nos travaux futurs, nous avons l'intention d'évaluer les conditions de prolifération des LT avec les NECs (qui ont des niveaux normaux d'OX40L) et en présence d'un anticorps inhibiteur de l'interaction OX40/OX40L, afin de déterminer si la prolifération est également compromise, ce qui appuierait davantage notre hypothèse. De plus, compte tenu du rôle de l'interaction OX40/OX40L dans l'établissement d'une réponse mémoire effectrice, comme démontré par Soroosh et al.,⁴⁹⁹ il serait pertinent d'examiner les marqueurs de LT mémoires effecteurs (CD45RA⁻ CCR7⁻) et centraux (CD45RA⁻ CCR7⁺) après activation⁵⁰⁰.

L'intérêt pour OX40L ne s'arrête pas là puisqu'il a été démontré qu'il agissait sur la polarisation des LT naïfs, avec un effet inhibiteur dans l'induction de Treg et inducteur d'une réponse de type Th2⁵⁰¹. Récemment, Zhang et al. ont montré que la liaison entre OX40 et OX40L inhibe l'induction de FoxP3 par l'intermédiaire des protéines BATF, qui régulent sa transcription, ou en activant la voie AKT-mTOR⁵⁰². La perte de OX40L dans les NSCLC-TEC pourrait donc être associée à la perte de l'inhibition de la polarisation des Treg.

Dans ce contexte, pour étudier la polarisation des LT, nous avons incubé les NEC ou NSCLC-TEC pendant 5 jours avec des LT naïfs isolés à partir de PBMCs de différents donneurs sains. De manière surprenante, nous n'avons pas observé d'induction de Treg dans les conditions où les NSCLC-TECs avaient perdu l'expression de OX40L. Il est possible que des signaux responsables de la polarisation soient manquants dans notre modèle puisque les HUVECs ne produisent pas d'IL-10 ou de TGF- β essentielles à l'induction des Treg. Pour explorer plus précisément la dynamique de polarisation, nous avons réalisé un LegendPlex afin d'évaluer les cytokines produites en fonction des différents types de LThelper induits, dans les surnageants de nos cocultures entre HUVECs et les LT naïfs. La génération de LT de type Th2 est associée à la production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13 et d'IL-10, et à l'expression de GATA3 dans les LT CD4⁺^{503,504}. Nos résultats n'ont pas révélé une induction marquée de toutes

DISCUSSION

ces cytokines. Toutefois, dans des conditions où les HUVECs ont été activées avec des cytokines pro-inflammatoires induisant l'expression de OX40L, j'ai observé une potentielle polarisation des LT naïfs en Th2, avec une augmentation de la concentration de l'expression d'IL-5 et d'IL-13. De même, la coculture avec des A549-TECs induit une expression d'IL-5 et d'IL-2, associée au profil Th2 et Th1, respectivement. Ces résultats sont à nuancer car nous ne retrouvons pas d'expression d'IL-4 et d'IL-10 confirmant cette polarisation. Il serait pertinent de regarder l'expression des facteurs de transcription (GATA3) pour consolider nos résultats.

Nous avons observé, dans les conditions de coculture avec les H1975-TECs, la présence significative d'IL-22, tandis que l'IL-17F reste très peu exprimée (et l'IL-17A indétectable), ce qui indique une polarisation vers une sous-population de type Th22, comme décrit dans la littérature^{505,506}. Une étude américaine a rapporté que l'induction de Th22 se produit en présence d'IL-6, de TNF- α et en absence de TGF- β ⁵⁰⁷, ce qui paraît correspondre aux conditions de notre étude, où les cocultures avec les H1975-TECs semblent produire de plus grande quantité d'IL-6 et de TNF- α par rapport aux autres conditions. La caractérisation des cellules Th22 est relativement récente. Elles ont été définies, dans un premier temps, comme cellules spécialisées dans les processus de réparation tissulaire. Par la suite, il a été observé que la présence de Th22 et les niveaux d'expression de l'IL-22 sont augmentés dans les sites inflammatoires par rapport aux tissus normaux, comme ça peut être le cas dans le cancer^{508,509}. Les cellules Th22 infiltrant la tumeur ont été étudiées dans de nombreux cancers humains et leur présence intratumorale était associée à un facteur de mauvais pronostic⁵¹⁰⁻⁵¹². En effet, la surexpression d'IL-22 est associée à la promotion tumorigénique en stimulant la prolifération cellulaire via la voie STAT3 et en régulant à la hausse les molécules prolifératives (CyclinD1, c-Myc, Rb2, CDK4)⁵¹³. Elle est également décrite comme pouvant inhiber l'apoptose par régulation positive des gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, et elle induit l'angiogenèse^{514,515}. Cependant, il demeure incertain que les cellules Th22 soient recrutées, induites ou développées au sein du TME. Nous proposons ici l'hypothèse selon laquelle, les ECs dans des conditions spécifiques de transformation tumorale qu'il reste à élucider, contribuent à la polarisation des Th22 et par conséquent, participent à l'immunosuppression dans le TME. Dans la continuité de ce projet, il serait intéressant d'approfondir notre compréhension des mécanismes sous-jacents de l'interaction entre les ECs et les Th22.

DISCUSSION

Pour finir sur OX40L, qui nous semble être une cible de premier plan, il faudra comprendre comment le contact avec les cellules tumorales aboutit à une répression de OX40L dans les NSCLC-TECs. Une des pistes serait de regarder le niveau de la méthylation de l'ADN puisque l'épigénétique est centrale dans la régulation de l'expression des gènes en fonction de l'environnement. En effet, le gène *TNFSF4* codant pour OX40L se trouve sur le chromosome 1 humain et de manière intéressante, il est retrouvé dans la même région que le gène *TNFSF18* codant pour GITRL qui se trouve lui aussi sous-exprimé dans nos conditions de coculture. Or cette région est effectivement davantage méthylée dans les tumeurs de CBNPC en comparaison des tissus sains comme présenté dans la figure 22, ce qui pourrait ouvrir sur des perspectives thérapeutiques intéressantes.

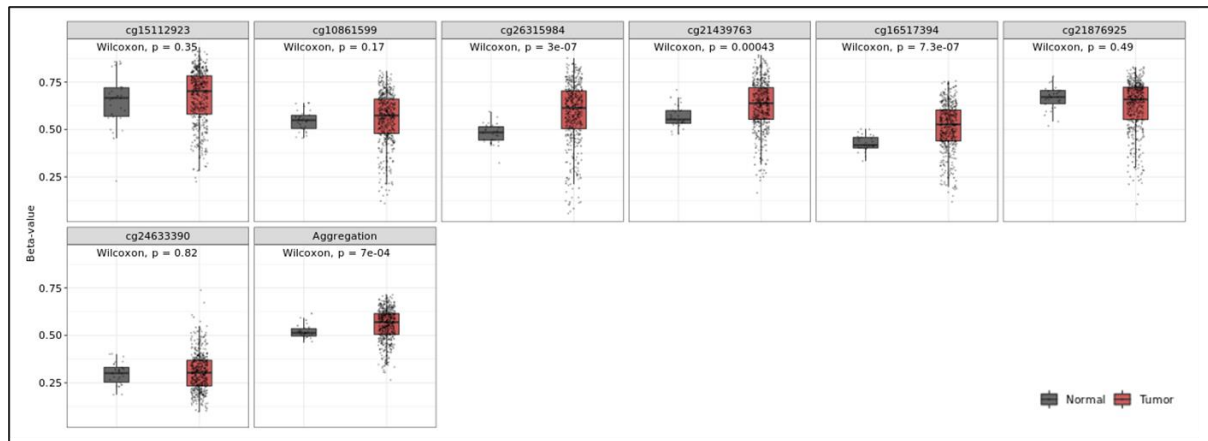


Figure 23 : Comparaison de la méthylation des îlots CpG entre tissu sain et tumoral dans le CBNPC des locus encadrant *TNFSF4*. Fait avec <http://www.bioinfo-zs.com/smartapp/>.

En parallèle des LT, les macrophages sont également des acteurs clés de la réponse immunitaire anti-tumorale. J'ai donc également étudié leur interaction avec les TECs durant ma thèse. Dans le microenvironnement du CBNPC, les TAM se révèlent être le type cellulaire majoritaire en constituant 34,1 % des cellules immunitaires identifiées⁵¹⁶. Bien que certaines populations résidentes de macrophages sont classées parmi les TAM^{517,518}, beaucoup proviennent de monocytes circulant recrutés, par exemple via l'axe CCR2/CCL2⁵¹⁹. La différenciation des monocytes en TAMs est influencée par leur environnement. Par exemple, le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF), également appelé CSF1 et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), également appelé CSF2, sont des cytokines impliquées dans la régulation de la polarisation des macrophages. Le GM-CSF est lié à l'activation du phénotype M1 et le M-CSF est associé à la différenciation du phénotype M2⁵²⁰. Dans le CBNPC, des études ont montré que le niveau

DISCUSSION

sérique de M-CSF est augmenté chez les patients^{521,522} et qu'une expression élevée de son récepteur CSFR1 sur les TAM est corrélée à un taux de mortalité accrue⁵²³. En tant que cellules immunosuppressives, les TAMs facilitent le processus d'évasion immunitaire tout en favorisant la prolifération, la survie et l'invasion des cellules tumorales⁵²⁴.

Pour reproduire cette composante du TME, nous avons isolé des monocytes circulants à partir de PBMCs de donneur sain, que nous avons mis en coculture avec les HUVECs triées après leur exposition aux cellules tumorales de CBNPC (NSCLC-TECs). Nous avons ensuite analysé la présence de marqueurs M2-like (CD16 et CD163) ou M1-like (HLA-DR) en cytométrie en flux. Nous avons montré que le contact avec des HUVECs cocultivées semble modifier le phénotype des macrophages induits, avec une potentielle diminution de l'expression du marqueur M1 et une augmentation des marqueurs M2, bien que les réponses diffèrent suivant la lignée de CBNPC utilisée. Ces observations rejoignent les résultats présentés par Njock et al., qui indiquent que le traitement avec des EVs produites par les ECs lors d'une coculture avec des MDA-MB-231, entraîne une libération de miRNAs dans les macrophages susceptibles d'induire une polarisation vers un phénotype M2⁴⁹⁴. Ce phénomène serait cohérent avec nos observations précédentes suggérant que les ECs, modifiées par leur interaction avec les cellules tumorales, participent à l'immunosuppression en influençant les acteurs de l'immunité dans le TME.

Clara Bourreau, étudiante en thèse dans notre équipe, a montré dans ses travaux que les A549 produisent du M-CSF, plus que d'autres lignées tumorales de CBNPC (comme les H1755 et H1975). Nous avons donc supposé que les monocytes en coculture avec les A549 s'orienteraient vers un profil M2, comme démontré par Camille Chatelain avec les cellules de MPM⁵²⁵. Nous avons voulu déterminer l'impact d'un ajout de ECs dans cette coculture. Nous avonsensemencé des ECs avec des cellules tumorales et des monocytes pendant 5 jours, avant d'analyser le devenir des macrophages. La faible population de macrophages observée après incubation a été attribuée à la prolifération tumorale, plutôt qu'à un manque de signaux de survie. Nos résultats ont révélé une augmentation des marqueurs M2-like uniquement dans les cocultures avec les A549, confirmant que le M-CSF pourrait favoriser cette polarisation. Une augmentation (non significative) de ces marqueurs a également été observée pour les monocytes cultivés seul avec le milieu EGM2 supplémenté. Cette induction pourrait être imputée à la présence de VEGF dans le milieu, facteur connu pour favoriser le

DISCUSSION

switch entre M1-like vers M2-like⁵²⁶. L'ajout des HUVECs dans ce milieu semble réduire l'induction du profil M2-like, sans toutefois interférer avec l'induction provoquée par les cellules tumorales. L'augmentation du ratio des HUVECs dans la coculture semble également atténuer le switch M2-like, orientant les macrophages vers un profil intermédiaire entre M1-like et M2-like.

Les observations que j'ai pu faire dans mon modèle indiquent que la présence des ECs provoque des modifications dans le phénotype des macrophages, peut-être en induisant de nouveaux sous types mais cette hypothèse reste à vérifier. Avec seulement 3 marqueurs analysés il est difficile de caractériser précisément les populations. Comme discuté précédemment, les macrophages existent le long d'un continuum phénotypique et ne sont pas facilement caractérisés par des marqueurs uniques^{527,528}. Chaque type de macrophage peut contenir de nombreux sous-types et en raison de leur plasticité, peuvent passer d'un type à un autre en fonction des facteurs solubles et cellulaires présents dans le TME⁵²⁹. Pour affiner nos observations, l'exploration d'autres marqueurs tels que CD206 pour les M2-like, CD80/86 pour les M1-like⁵²⁵ ou encore LYVE-1 pour les macrophages périvasculaires⁵³⁰ serait pertinente. De plus, il serait intéressant de déterminer si la présence seule de ECs permet d'induire ce phénotype de macrophages périvasculaires. Plusieurs études suggèrent que les profils acquis par les macrophages dans la tumeur ne relèvent pas d'un processus linéaire, mais impliquent un programme complexe en plusieurs étapes avec des phénotypes intermédiaires guidés par le TME^{340,531,532}. L'évolution rapide de nos connaissances sur la plasticité macrophagique souligne l'importance d'adopter une approche méthodique pour caractériser les différents profils possibles et mieux comprendre l'hétérogénéité des TAMs.

Dans notre modèle, le gène *PGES* codant pour l'enzyme responsable de la métabolisation de PGE2 est le gène le plus significativement régulé à la hausse dans toutes les cocultures. PGE2, connue pour être surexprimée dans le cancer est souvent facteur de mauvais pronostic car responsable d'une inflammation favorisant la progression tumorale^{533,534}. Une dérégulation est également observée pour de nombreux autres gènes impliqués dans la voie comme ceux des transporteurs membranaires des prostaglandines. Ces observations sont conformes aux travaux de Njock et al., cependant, les expériences exploratoires de dosage par ELISA de PGE2 dans les surnageants de culture n'ont pas été concluants. Les expériences en cours visent à détecter PGE2 par spectrométrie de masse afin

DISCUSSION

de disposer d'une sensibilité suffisante pour envisager l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la voie de synthèse du PGE2 comme piste thérapeutique.

L'utilisation de plusieurs lignées tumorales aux mutations distinctes permet d'appréhender des mécanismes des dialogues qui pourraient être communs et d'autres plus spécifiques du type cellulaire. Nous avons observé que les lignées tumorales induisent des profils variés chez les HUVECs. Nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle ces variations pourraient être liées aux mutations des cellules tumorales. Pour explorer cette hypothèse nous avons utilisé 2 nouvelles lignées cellulaires disponibles au laboratoire et présentant la même mutation que les A549 (KRAS G12S). Bien que les résultats ne soient pas inclus dans la thèse, nos analyses ont mis en évidence des réponses distinctes par rapport aux TEC-A549 face à ces lignées, invalidant l'idée de modifications de l'endothélium qui soient uniquement dépendantes des mutations tumorales.

Dans l'étude de coculture en 2D, qui nous a permis d'explorer les interactions entre les ECs, les cellules tumorales et les principaux acteurs de l'immunité anti-tumorale, nous nous sommes concentrés sur les effets produits sur les HUVECs après leur contact avec les cellules tumorales. Nous convenons néanmoins que la communication au sein du TME n'est pas unidirectionnelle et que les lymphocytes comme les macrophages peuvent agir sur le phénotype des ECs^{535,536} ou même sur celui des cellules tumorales.

D'un point de vue technique, la variabilité biologique associée aux donneurs s'est de nouveau révélée être un frein pour l'interprétation de nos observations. En effet, les HUVECs tout comme les cellules immunitaires ont été isolées de différents individus, ce qui introduit une hétérogénéité génétique et épigénétique dans le modèle. Cette hétérogénéité peut rendre difficile la reproductibilité des résultats et réduire la robustesse des conclusions. Le choix du type cellulaire étudié dans le modèle pour représenter l'endothélium vasculaire (les HUVECs) peut de plus faire débat et sera approfondi dans la dernière partie de cette discussion de thèse.

DISCUSSION

SPHEROÏDES 3D : UN MODELE PLUS COMPLET POUR LA DIVERSIFICATION CELLULAIRE

Plusieurs études ont démontré que les cultures 3D favorisent l'induction de cellules présentant à la fois des caractéristiques transcriptomiques et morphologiques se rapprochant des conditions *in vivo*, comparativement à la culture en 2D^{537,538}. Dans cette perspective, nous avons décidé d'approfondir notre compréhension des interactions entre les ECs et d'autres types cellulaires dans un contexte tumoral, en développant et caractérisant un modèle 3D de sphéroïde multicellulaire tumoral (MCTS). Notre équipe a acquis l'expertise d'un tel modèle dans lequel la proportion de cellules myéloïdes semble davantage conservée, et reproduit de manière plus précise les interactions intercellulaires au sein d'une tumeur que les cocultures en 2D. A partir de ce modèle, Thibault Blondy a montré que 90% des monocytes intégrés dans les MCTS avec des cellules de mésothéliome pleural malin (une tumeur thoracique de la plèvre) adoptent un phénotype M2-like, capable d'inhiber la réponse de clones LT antitumoraux³⁴⁵. Les premiers tests de formations de MCTS intégrant les HUVECs au mélange tumoral et monocytes, se sont avérés infructueux car la présence des ECs restreint la compaction adéquate de l'agrégat cellulaire. L'ajout de fibroblastes a permis de surmonter ce manque de stabilité⁵³⁹ aboutissant à l'élaboration d'un modèle MCTS composé de cellules tumorales (40%), de HUVECs (20%), de fibroblastes dérivés de tissus pulmonaires normaux (20%) et de monocytes circulants (20%).

Nous avons effectué un scRNAseq sur ce nouveau modèle de MCTS, dont les analyses bioinformatiques réalisées par Lucas Treppe, ont permis de montrer la diversité de sous-populations induites dans ce modèle. Nous avons ainsi identifié 4 sous-groupes distincts au sein de la population myéloïde dérivée de monocytes, dont la majorité rentrait dans la classification M2-like, bien qu'un groupe avait un profil M1-like. D'autres études ont mis en évidence l'hétérogénéité des TAMs dans les modèles 3D, notamment Madsen et al., qui ont démontré que différentes lignées tumorales induisent des variations dans l'infiltration des monocytes et la polarisation des macrophages de manière lignée dépendante⁵⁴⁰. Dans notre cas particulier, nous avons identifié un groupe de macrophages M2 périvasculaires, caractérisé par l'expression de marqueurs clés comme *LYVE1* et *FOLR2*. Ces macrophages périvasculaires, que nous avons déjà brièvement abordés, sont décrits comme agissant dans le cancer en régulant les interactions entre les leucocytes et les EC, l'angiogenèse, et pouvant

DISCUSSION

influencer la réponse aux traitements^{541,542}. En effet, l'expression forcée de *LYVE1* dans les macrophages murins RAW264.7, entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm de la métalloprotéinase matricielle 2 (*Mmp2*), de *Mmp9* et du *Vegfa*. Les macrophages exprimant *LYVE1* favorisent la migration et la formation de tubes des HUVECs⁵⁴³. Fait intéressant, une étude publiée en 2020 rapporte que l'expression de *FOLR2*, particulièrement exprimée dans notre modèle, est fortement associée au profil transcriptomique des macrophages dépendants du M-CSF⁵⁴⁴. Ce sous-ensemble identifié dans notre MCTS pourrait être doté de rôles distincts dans la progression et l'immunité tumorale. Il mérite une investigation plus approfondie en raison de son implication controversée. En effet, dans l'adénocarcinome pulmonaire, les macrophages *LYVE1+FOLR2+* sont associés à un phénotype agressif défavorable et semblent dériver de la transformation de macrophages alvéolaires résidents au cours du développement tumoral⁵⁴⁵. Ramos et al., ont montré que dans le cancer du sein, les macrophages *FOLR2* se concentrent dans les zones périvasculaires du stroma tumoral, où ils interagissent avec les lymphocytes T CD8⁺, ce qui améliore leur activation et est donc corrélé à une meilleure survie des patients⁵⁴⁶. Nos résultats de microscopie confocale sur MCTS semblent aller dans ce sens avec la présence des cellules CD45⁺ en contact intime avec les ECs au sein d'agglomérats cellulaires. Cette contradiction concernant les effets de la présence de ce type cellulaire pourrait être liée au type de cancer ou à la localisation de ces macrophages au sein de la tumeur. A la lumière de ces observations, il serait pertinent d'examiner la localisation de ces macrophages dans notre modèle ainsi que les types cellulaires présents dans leur environnement immédiat. Sont-ils positionnés à proximité des HUVECs ? Sont-ils répartis de manière homogène dans le sphéroïde ou préférentiellement dans certaine région comme le centre nécrotique ? Cette question sera explorée par Hortense Perdrieau cours de sa thèse avec des expériences envisagées en transcriptomique spatiale sur des MCTS.

En ce qui concerne le compartiment endothélial, bien que le nombre de cellules analysées soit relativement restreint, nous avons pu identifier trois sous-types distincts, situés au sein du sphéroïde et entourant un noyau nécrotique. La première population se distingue des autres par un phénotype angiogénique, avec l'expression de marqueurs pro-angiogéniques comme *DLL4*, *Kit* et *PLVAP*⁵⁴⁷. La seconde est une population proliférative marquée par l'expression des cyclines et dont les principales voies up-régulées s'orientent

DISCUSSION

autour des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de la glycolyse. Cette population conserve également des marqueurs angiogéniques, rejoignant les caractéristiques retrouvées chez les TECs dans le CBNPC⁵⁴⁸. La dernière population de ECs présente un profil inflammatoire traduisant une activation endothéliale, comme nous avons pu l'observer dans notre modèle 2D. Elle est caractérisée par la surexpression de molécules d'adhésions telles que ICAM1 et de chimiokines comme CXCL8. De manière intéressante, cette population présente une signature associée à l'autophagie, à la signalisation mTORC et à la transition EndoMT. Cette dernière caractéristique n'était pas présente dans un modèle 2D avec des HUVECs et nous rapproche davantage du profil observé dans les TECs fraîchement isolées de CBNPC. Le processus d'autophagie est décrit comme ayant un rôle majeur dans les capacités immunomodulatrices des TEC. Verhaeven et al., ont montré que l'autophagie au sein de l'endothélium tumoral limite les réponses du mélanome aux thérapies anti-PD1. En effet, dans leur modèle de souris transgéniques où les TEC sont déficientes pour l'autophagie, l'expression des facteurs impliqués dans la voie NF- κ B et celle de diverses molécules d'adhésion à l'EC ont été significativement régulée à la hausse, signant la levée de l'anergie endothéliale⁵⁴⁹. A noter que l'autophagie a également été montrée comme importante dans les EC lymphatiques tumorales⁵⁵⁰. Ces observations attestent l'établissement d'un environnement immunosuppresseur actif dans nos modèles de MCTS, offrant des perspectives prometteuses pour l'évaluation des résistances aux traitements par ICIs rencontrées dans le CBNPC, et pour l'exploration des mécanismes sous-jacents à ces résistances.

L'analyse du devenir des fibroblastes présents dans les MCTS a révélé 13 profils transcriptomiques distincts. Parmi ceux-ci, certaines signatures correspondent aux iCAFs, et peuvent être corrélées avec l'infiltration tumorale. D'autres correspondent aux myCAFs, impliqués dans la construction d'un environnement immunosuppresseur en attirant et en retenant les Treg²⁸⁷. Les CAFs recrutent également des monocytes et des macrophages et contribuent à la formation d'une niche pro-angiogénique avec une population de TAM périovasculaire⁵³². En outre, dans les cancers humains, des preuves expérimentales ont révélé que les CAFs soutiennent l'angiogenèse en libérant des quantités importantes de VEGF-A et d'autres signaux pro-angiogéniques dans le TME⁵⁵¹. Une étude réalisée dans le CBNPC a également montré que les iCAF étaient spatialement proches des ECs²⁹³. Cependant, le dialogue complexe entre les CAFs, les TAMs et les TECs au sein du TME reste peu documenté.

DISCUSSION

L'étude du devenir de ces CAFs, ainsi que la caractérisation de leurs interactions avec les ECs au sein de notre modèle de MCTS, constitue un projet de recherche ambitieux à part entière. Ce thème sera au centre des prochains travaux de thèse d'Émilie Navarro, que j'ai eu l'occasion d'encadrer pour son stage de fin d'étude d'ingénieur. Ce projet sera également mené en collaboration avec une équipe du département d'immunologie du St. George Campus à Toronto. Parmi les perspectives de ce modèle MCTS, l'inclusion des LT pourrait fournir une complexité supplémentaire permettant l'étude d'immunothérapies combinées et éventuellement d'une amélioration des réponses antitumorales.

MODELES ALTERNATIFS : LIMITES ET PERSPECTIVES POUR EXPLORER LES COMPLEXITES BIOLOGIQUES

Les interactions cellulaires, les signaux paracrines, la rigidité du substrat, la quantité d'oxygène, et d'autres facteurs présents dans un organisme vivant sont absents ou considérablement simplifiés *in vitro*, ce qui limite la pertinence physiologique des résultats. Malgré une amélioration apportée par nos modèles par rapport à une culture 2D bicellulaire, ils ne permettent pas de reproduire de manière fidèle la complexité du microenvironnement retrouvé *in vivo*. Quelle que soit l'approche choisie, il y a toujours des défis à relever pour optimiser les paramètres comme la densité cellulaire et le rapport d'ensemencement, ainsi que des contraintes inhérentes aux types cellulaires choisis pour le modèle. Je ne peux donc pas terminer la discussion de ma thèse sans aborder la principale question qui m'a été fréquemment posée, au cours des échanges que j'ai pu avoir avec la communauté scientifique, notamment lors de congrès : pourquoi utiliser le type cellulaire HUVECs en tant que modèle représentatif de l'endothélium pulmonaire sain ?

Les HUVECs restent une source prédominante de ECs primaires au sein de la communauté scientifique, particulièrement pour les études *in vitro* de la vascularisation et l'angiogenèse⁵⁵² ainsi que pour les recherches sur les biomatériaux⁵⁵³. Leur principal atout réside dans leur accessibilité puisque le cordon ombilical, souvent considéré comme un déchet biologique après la naissance, est une source abondante de ces cellules par ailleurs difficiles à obtenir et cultiver avec succès à partir des différents autres lits vasculaires. De plus, leur relative facilité d'isolement et les faibles risques de contamination par d'autres types de cellules constituent un avantage considérable. Pour l'instant, il s'agit d'une limitation pour les études comparatives complètes de l'endothélium capillaire. Cependant, l'absence de spécificité d'organe et le niveau de différenciation des HUVEC doivent être pris en compte.

Bien qu'elles soient parmi les ECs les mieux caractérisées, il existe encore des lacunes concernant leur capacité à récapituler l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle de l'endothélium provenant de différentes origines vasculaires⁵⁵⁴. En effet, les HUVECs représentent des cellules entièrement différenciées, incapable de se développer davantage en endothélium spécifique à un organe⁵⁵⁵. Par exemple, les HUVECs sont jugées inappropriées pour les études de vascularisation du tissu nerveux, car elles ne parviennent pas à établir une

DISCUSSION

barrière endothéliale hermétique et efficace, caractéristique du système nerveux central⁵⁵⁶. Les barrières formées *in vitro* par les HUVECs affichent également une perméabilité plus élevée que celle constituée par d'autres types de ECs⁵⁵⁷.

Bien qu'elles ne reflètent pas parfaitement la complexité de l'endothélium *in vivo*, l'utilisation des HUVECs pour notre étude nous a paru être un bon compromis. Leur utilisation largement répandue les rend très présentes dans les recherches qui sont menées sur les interactions cellulaires. Cela nous a paru de nature à faciliter les comparaisons inter-études, notamment dans le cadre de cocultures avec des cellules tumorales. Sur cette base, notre étude s'inscrit tout naturellement dans la continuité de nombreuses autres avec les HUVECs comme modèle de référence endothéliale, certaines ayant permis de comparer des données transcriptomiques entre différents cancers^{494,558}. Il convient de noter que l'utilisation des HUVECs soulève néanmoins des questions, notamment en ce qui concerne l'étude des interactions avec le système immunitaire, qui s'effectuent principalement au niveau des veinules post-capillaires. Cependant, nous avons pu vérifier que lorsqu'elles sont cultivées en 2D ou 3D, elles présentent au niveau transcriptomique des marqueurs caractéristiques de microvaisseaux. Malgré tout, lorsque nous comparons les transcriptomes des HUVECs cocultivées avec celui des TECs isolées de biopsie, il apparaît des différences significatives sur le plan transcriptomique. Dans les perspectives à court terme pour ce projet, nous proposons de tester un nouveau type cellulaire ECs, en remplaçant les HUVECs par des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HMVEC-L). Cette stratégie devrait reproduire de manière plus fidèle les interactions cellulaires propres au modèle pulmonaire.

Les études s'appuyant sur le modèle sphéroïde ont été introduits pour la première fois dans les années 1970^{559,560}. Depuis lors, leur complexité n'a cessé d'évoluer, avec le développement de modèles multicellulaires montrant que certains d'entre eux, contenant des infiltrats de macrophages présentent certaines des caractéristiques essentielles des tumeurs solides. Parmi ces caractéristiques figurent l'hétérogénéité cellulaire, les modifications métaboliques, les gradients de nutriments, la production des ROS, ainsi que l'interaction entre HIF1 α et HSP70, qui favorise la régulation des enzymes responsables de la dégradation de la MEC⁵⁶¹. Notre étude vient renforcer l'intérêt de tels modèles puisque nous avons pu mettre en évidence la diversité des sous-populations cellulaires induites dans ce contexte, avec des profils semblables à certains types cellulaires retrouvés *in vivo* et que nous ne retrouvions pas

DISCUSSION

dans les cultures 2D. Les modèles 3D de MCTS représentent donc un outil prometteur pour le criblage d'immuno/thérapies anticancéreuses. Cela permettrait d'améliorer la pertinence physiologique des études et de mieux comprendre les raisons pour lesquelles les patients répondent différemment à certains traitements, ouvrant ainsi la voie à une personnalisation thérapeutique.

Malgré leur complexification possible, ces modèles demeurent statiques limitant une reproduction fidèle des conditions réelles produites par des vaisseaux sanguins dans lesquels le flux sanguin influence les phénotypes cellulaires, l'expression des gènes⁵⁶², les propriétés mécaniques⁵⁶³ et la capacité d'adhésion^{564,565}. En condition statique, les cellules sont exposées à un environnement biochimique uniforme, alors que les gradients moléculaires varient selon les sites anatomiques⁵⁶⁶. Depuis plus de deux décennies, la microfluidique a permis des avancées significatives dans l'analyse cellulaire *in vitro*, en particulier pour les études des interactions entre cellules tumorales et divers types de cellules cibles dans des conditions physiologiques davantage pertinentes, telles que les ECs, les cellules stromales, les cellules immunitaires et même directement en sphéroïde⁵⁶⁷⁻⁵⁷⁰. Les dispositifs microfluidiques offrent ainsi une approche reproduisant des forces mécaniques naturelles ce qui permet de restituer en partie les conditions physiologiques. Dans cette perspective, le laboratoire a acquis l'équipement nécessaire pour inclure le flux dans nos futurs modèles. Les mises au point de la formation de vaisseaux en Chip ont récemment été réalisées par Nikita Rajkumari, étudiante en thèse dans notre équipe. Il serait intéressant d'étudier la complexité apportée par le flux sur le compartiment endothélial dans le modèle 2D ou 3D intégrant la potentielle perfusion du sphéroïde.

DISCUSSION

CONCLUSION

La recherche que j'ai menée au cours de cette thèse s'inscrivait dans un contexte de fort engouement pour les ECs au sein du TME, afin de déterminer si ces cellules sont des actrices d'influence de l'immunité tumorale. L'objectif de ma thèse était donc de mieux comprendre les relations entre cellules tumorales pulmonaires, ECs et cellules immunes dans le CBNPC étudiées au laboratoire. Au cours de mes travaux de thèse j'ai pu montrer que les cellules tumorales induisent une transformation des ECs qui les oriente vers un profil inflammatoire. Elles influencent alors le comportement des cellules immunitaires dans le TME en induisant une immunosuppression, via l'inhibition de la prolifération des LT CD4⁺ et la polarisation en macrophage de type M2-like (Figure 23). Toutefois, des limitations liées à la complexité des interactions cellulaires et les conditions de culture imposées par nos modèles *in vitro* restent non négligeables et demandent à être améliorées. L'optimisation du modèle est un prérequis pour espérer se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques du TME. L'intégration de la microfluidique est l'amélioration qui semble la plus prometteuse pour garantir une plus grande portée des résultats.

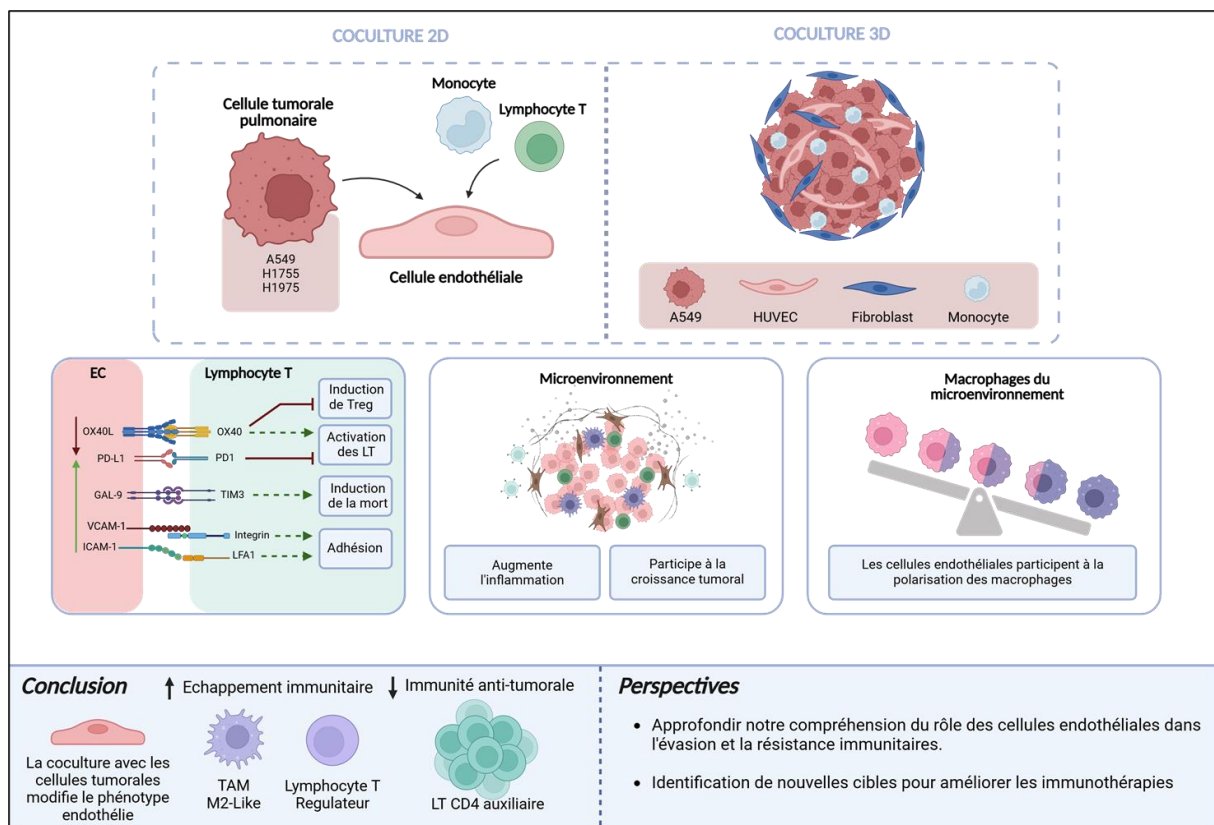


Figure 24 : Résumé graphique du travail de thèse.

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE



BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Furchgott, R., and Zawadzki, J. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376. <https://doi.org/10.1038/288373a0>.
2. Starling, E.H. (1923). The Anatomy and Physiology of Capillaries. *Nature* 112, 270–272. <https://doi.org/10.1038/112270a0>.
3. Wilting, J., and Chao, T.I. (2015). Integrated Vascular Anatomy. In *PanVascular Medicine*, P. Lanzer, ed. (Springer), pp. 193–241. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37078-6_252.
4. Poole, D., and Musch, T. (2023). Capillary-Mitochondrial Oxygen Transport in Muscle: Paradigm Shifts. *Funct. Oxf. Engl.* 4, zqad013. <https://doi.org/10.1093/function/zqad013>.
5. Sarin, H. (2010). Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J. Angiogenesis Res.* 2, 14. <https://doi.org/10.1186/2040-2384-2-14>.
6. Griffin, C., and Gao, S. (2017). Building discontinuous liver sinusoidal vessels. *J. Clin. Invest.* 127, 790–792. <https://doi.org/10.1172/JCI92823>.
7. Girard, J., Moussion, C., and Förster, R. (2012). HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 762–773. <https://doi.org/10.1038/nri3298>.
8. Filippini, A., Tamagnone, L., and D’Alessio, A. (2022). Endothelial Cell Metabolism in Vascular Functions. *Cancers* 14. <https://doi.org/10.3390/cancers14081929>.
9. Drayton, D., Bonizzi, G., Ying, X., Liao, S., Karin, M., and Ruddle, N. (2004). I kappa B kinase complex alpha kinase activity controls chemokine and high endothelial venule gene expression in lymph nodes and nasal-associated lymphoid tissue. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 6161–6168. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.10.6161>.
10. Browning, J., Allaire, N., Ngam-Ek, A., Notidis, E., Hunt, J., Perrin, S., and Fava, R. (2005). Lymphotoxin-beta receptor signaling is required for the homeostatic control of HEV differentiation and function. *Immunity* 23, 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.10.002>.
11. Patan, S. (2000). Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J. Neurooncol.* 50, 1–15. <https://doi.org/10.1023/a:1006493130855>.
12. Simons, M., and Eichmann, A. (2015). Molecular controls of arterial morphogenesis. *Circ. Res.* 116, 1712–1724. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.302953>.
13. Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671–674. <https://doi.org/10.1038/386671a0>.
14. Senger, D., and Davis, G. (2011). Angiogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005090. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005090>.
15. Zygmunt, M., Herr, F., Münstedt, K., Lang, U., and Liang, O. (2003). Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 110 Suppl 1, S10-8. [https://doi.org/10.1016/s0301-2115\(03\)00168-4](https://doi.org/10.1016/s0301-2115(03)00168-4).
16. Dudley, A., and Griffioen, A. (2023). The modes of angiogenesis: an updated perspective. *Angiogenesis* 26, 477–480. <https://doi.org/10.1007/s10456-023-09895-4>.
17. He, X., Zeng, H., and Chen, J. (2019). Emerging role of SIRT3 in endothelial metabolism, angiogenesis, and cardiovascular disease. *J. Cell. Physiol.* 234, 2252–2265. <https://doi.org/10.1002/jcp.27200>.
18. Costa, C., Incio, J., and Soares, R. (2007). Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 10, 149–166. <https://doi.org/10.1007/s10456-007-9074-0>.
19. Lugano, R., Ramach, ran, M., and Dimberg, A. (2020). Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 77, 1745–1770. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>.

BIBLIOGRAPHIE

20. Olsson, A., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 359–371. <https://doi.org/10.1038/nrm1911>.
21. Simons, M., Gordon, E., and Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 611–625. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.87>.
22. Apte, R., Chen, D., and Ferrara, N. (2019). VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* *176*, 1248–1264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>.
23. Phng, L., and Gerhardt, H. (2009). Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev. Cell* *16*, 196–208. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.015>.
24. Jakobsson, L., Franco, C., Bentley, K., Collins, R., Ponsioen, B., Aspalter, I., Rosewell, I., Busse, M., Thurston, G., Medvinsky, A., et al. (2010). Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat. Cell Biol.* *12*, 943–953. <https://doi.org/10.1038/ncb2103>.
25. Burri, P., Hlushchuk, R., and Djonov, V. (2004). Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *231*, 474–488. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20184>.
26. Li, G., Gao, J., Ding, P., and Gao, Y. (2024). The role of endothelial cell-pericyte interactions in vascularization and diseases. *J. Adv. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.jare.2024.01.016>.
27. Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R., and Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* *20*. <https://doi.org/10.3390/ijms20184411>.
28. Pober, J. (1988). Warner-Lambert/Parke-Davis award lecture. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Physiology and pathology. Am. J. Pathol.* *133*, 426–433.
29. Aird, W. (2012). Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a006429. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006429>.
30. Klein, D. (2018). The Tumor Vascular Endothelium as Decision Maker in Cancer Therapy. *Front. Oncol.* *8*, 367. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00367>.
31. Fang, Z., Zhao, G., Zhao, S., Yu, X., Feng, R., Zhang, Y., Li, H., Huang, L., Guo, Z., Zhang, Z., et al. (2024). GTF2H4 regulates partial EndMT via NF-κB activation through NCOA3 phosphorylation in ischemic diseases. *Innov. Camb. Mass* *5*, 100565. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2024.100565>.
32. Fang, J., Hultgren, N., and Hughes, C. (2021). Regulation of Partial and Reversible Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Angiogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* *9*, 702021. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.702021>.
33. Aird, W. (2003). Endothelial cell heterogeneity. *Crit. Care Med.* *31*, S221-30. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000057847.32590.C1>.
34. Coppiello, G., Collantes, M., Sirerol-Piquer, M., V, enwijngaert, S., Schoors, S., Swinnen, M., V, ersmissen, I., Herijgers, P., et al. (2015). Meox2/Tcf15 heterodimers program the heart capillary endothelium for cardiac fatty acid uptake. *Circulation* *131*, 815–826. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013721>.
35. Zhao, Z., Nelson, A., Betsholtz, C., and Zlokovic, B. (2015). Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* *163*, 1064–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.067>.
36. Hu, Y., Du, G., Li, C., Wang, R., Liu, J., Wang, Y., and Dong, J. (2024). EGFR-mediated crosstalk between vascular endothelial cells and hepatocytes promotes Piezo1-dependent liver regeneration. *Genes Dis.* *101321*. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2024.101321>.
37. Ding, B., Nolan, D., Guo, P., Babazadeh, A., Cao, Z., Rosenwaks, Z., Crystal, R., Simons, M., Sato, T., Worgall, S., et al. (2011). Endothelial-derived angiocrine signals induce and sustain regenerative lung alveolarization. *Cell* *147*, 539–553. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.003>.
38. Bendayan, M. (2002). Morphological and cytochemical aspects of capillary permeability. *Microsc. Res. Tech.* *57*, 327–349. <https://doi.org/10.1002/jemt.10088>.

BIBLIOGRAPHIE

39. Simionescu, M., Gafencu, A., and Antohe, F. (2002). Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey. *Microsc. Res. Tech.* *57*, 269–288. <https://doi.org/10.1002/jemt.10086>.
40. Aird, W. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* *100*, 158–173. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a>.
41. Nolan, D., Ginsberg, M., Israely, E., Palikuqi, B., Poulos, M., James, D., Ding, B., Schachterle, W., Liu, Y., Rosenwaks, Z., et al. (2013). Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration. *Dev. Cell* *26*, 204–219. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.017>.
42. Sabbagh, M., Heng, J., Luo, C., Castanon, R., Nery, J., Rattner, A., Goff, L., Ecker, J., and Nathans, J. (2018). Transcriptional and epigenomic landscapes of CNS and non-CNS vascular endothelial cells. *eLife* *7*. <https://doi.org/10.7554/eLife.36187>.
43. Kalucka, J., de, L., Rooij, Goveia, J., Rohlenova, K., Dumas, S., Meta, E., Conchinha, N., Taverna, F., Teuwen, L., Veys, K., et al. (2020). Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. *Cell* *180*, 764–779.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.015>.
44. Lowe, J. (2003). Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.08.002>.
45. Lee, J., McMurtry, S., and Stevens, T. (2017). Single cell cloning generates lung endothelial colonies with conserved growth, angiogenic, and bioenergetic characteristics. *Pulm. Circ.* *7*, 777–792. <https://doi.org/10.1177/2045893217731295>.
46. Niethamer, T., Stabler, C., Leach, J., Zepp, J., Morley, M., Babu, A., Zhou, S., and Morrissey, E. (2020). Defining the role of pulmonary endothelial cell heterogeneity in the response to acute lung injury. *eLife* *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.53072>.
47. Mitzner, W., and Wagner, E. (2004). Vascular remodeling in the circulations of the lung. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 *97*, 1999–2004. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00473.2004>.
48. King, J., Hamil, T., Creighton, J., Wu, S., Bhat, P., McDonald, F., and Stevens, T. (2004). Structural and functional characteristics of lung macro- and microvascular endothelial cell phenotypes. *Microvasc. Res.* *67*, 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2003.11.006>.
49. Parker, J., and Yoshikawa, S. (2002). Vascular segmental permeabilities at high peak inflation pressure in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *283*, L1203-9. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00488.2001>.
50. Comhair, S., Xu, W., Mavrakis, L., Aldred, M., Asosingh, K., and Erzurum, S. (2012). Human primary lung endothelial cells in culture. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *46*, 723–730. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0416TE>.
51. Stevens, R., Paudel, S., Johnson, S., Stevens, T., and Lee, J. (2021). Endothelial metabolism in pulmonary vascular homeostasis and acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *321*, L358–L376. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00131.2021>.
52. Parra-Bonilla, G., Alvarez, D., Al-Mehdi, A., Alexeyev, M., and Stevens, T. (2010). Critical role for lactate dehydrogenase A in aerobic glycolysis that sustains pulmonary microvascular endothelial cell proliferation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *299*, L513-22. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00274.2009>.
53. Gebb, S., and Stevens, T. (2004). On lung endothelial cell heterogeneity. *Microvasc. Res.* *68*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2004.02.002>.
54. Travaglini, K., Nabhan, A., Penl, L., Sinha, R., Gillich, A., Sit, R., Chang, S., Conley, S., Mori, Y., et al. (2020). A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature* *587*, 619–625. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2922-4>.

BIBLIOGRAPHIE

55. Gillich, A., Zhang, F., Farmer, C., Travaglini, K., Tan, S., Gu, M., Zhou, B., Feinstein, J., Krasnow, M., and Metzger, R. (2020). Capillary cell-type specialization in the alveolus. *Nature* 586, 785–789. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2822-7>.
56. Vila, L., Ellis, Cain, M., Hutchison, V., Flodby, P., Cr, all, E., Borok, Z., Zhou, B., Ostrin, E., Wythe, J., et al. (2020). Epithelial Vegfa Specifies a Distinct Endothelial Population in the Mouse Lung. *Dev. Cell* 52, 617-630.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.01.009>.
57. Goveia, J., Rohlenova, K., Taverna, F., Treppe, L., Conradi, L., Pircher, A., Geldhof, V., de, L., Rooij, Kalucka, J., Sokol, L., et al. (2020). An Integrated Gene Expression Landscape Profiling Approach to Identify Lung Tumor Endothelial Cell Heterogeneity and Angiogenic Candidates. *Cancer Cell* 37, 21-36.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.12.001>.
58. Coillard, A., and Segura, E. (2019). In vivo Differentiation of Human Monocytes. *Front. Immunol.* 10, 1907. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01907>.
59. Kapellos, T., Bonaguro, L., Gemünd, I., Reusch, N., Saglam, A., Hinkley, E., and Schultze, J. (2019). Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* 10, 2035. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02035>.
60. Wong, K., Tai, J., Wong, W., Han, H., Sem, X., Yeap, W., Kourilsky, P., and Wong, S. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118, e16-31. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326355>.
61. Mowat, A., Scott, C., and Bain, C. (2017). Barrier-tissue macrophages: functional adaptation to environmental challenges. *Nat. Med.* 23, 1258–1270. <https://doi.org/10.1038/nm.4430>.
62. Westphalen, K., Gusarova, G., Islam, M., Subramanian, M., Cohen, T., Prince, A., and Bhattacharya, J. (2014). Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature* 506, 503–506. <https://doi.org/10.1038/nature12902>.
63. Hume, P., Gibbings, S., Jakubzick, C., Tuder, R., Curran-Everett, D., Henson, P., Smith, B., and Janssen, W. (2020). Localization of Macrophages in the Human Lung via Design-based Stereology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 201, 1209–1217. <https://doi.org/10.1164/rccm.201911-2105OC>.
64. Goritzka, M., Makris, S., Kausar, F., Durant, L., Pereira, C., Kumagai, Y., Culley, F., Mack, M., Akira, S., and Johansson, C. (2015). Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes. *J. Exp. Med.* 212, 699–714. <https://doi.org/10.1084/jem.20140825>.
65. Branchett, W., Cook, J., Oliver, R., Bruno, N., Walker, S., Stölting, H., Mack, M., O’Garra, A., Saglani, S., and Lloyd, C. (2021). Airway macrophage-intrinsic TGF- β 1 regulates pulmonary immunity during early-life allergen exposure. *J. Allergy Clin. Immunol.* 147, 1892–1906. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.01.026>.
66. Jardine, L., Wiscombe, S., Reynolds, G., McDonald, D., Fuller, A., Green, K., Filby, A., Forrest, I., Ruchaud-Sparagano, M., Scott, J., et al. (2019). Lipopolysaccharide inhalation recruits monocytes and dendritic cell subsets to the alveolar airspace. *Nat. Commun.* 10, 1999. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09913-4>.
67. Watanabe, S., Alex, er, M., Misharin, A., and Budinger, G. (2019). The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* 129, 2619–2628. <https://doi.org/10.1172/JCI124615>.
68. Evren, E., Ringqvist, E., Doisne, J., Thaller, A., Sleiers, N., Flavell, R., Di, J., Santo, and Willinger, T. (2022). CD116+ fetal precursors migrate to the perinatal lung and give rise to human alveolar macrophages. *J. Exp. Med.* 219. <https://doi.org/10.1084/jem.20210987>.
69. Dick, S., Wong, A., Hamidzada, H., Nejat, S., Nechanitzky, R., Vohra, S., Mueller, B., Zaman, R., Kantores, C., Aronoff, L., et al. (2022). Three tissue resident macrophage subsets coexist across organs with conserved origins and life cycles. *Sci. Immunol.* 7, eabf7777. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf7777>.
70. Keerthivasan, S., Şenbabaoğlu, Y., Martinez-Martin, N., Husain, B., Verschueren, E., Wong, A., Yang, Y., Sun, Y., Pham, V., Hinkle, T., et al. (2021). Homeostatic functions of monocytes and interstitial lung macrophages

BIBLIOGRAPHIE

- are regulated via collagen domain-binding receptor LAIR1. *Immunity* 54, 1511-1526.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.012>.
71. Zhou, B., Magana, L., Hong, Z., Huang, L., Chakraborty, S., Tsukasaki, Y., Huang, C., Wang, L., Di, A., Ganesh, B., et al. (2020). The angiocrine Rspodin3 instructs interstitial macrophage transition via metabolic-epigenetic reprogramming and resolves inflammatory injury. *Nat. Immunol.* 21, 1430–1443. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0764-8>.
 72. Schyns, J., Bai, Q., Ruscitti, C., Radermecker, C., De, S., Schepper, Chakarov, S., Farnir, F., Pirottin, D., Ginhoux, F., Boeckxstaens, G., et al. (2019). Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung. *Nat. Commun.* 10, 3964. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11843-0>.
 73. Osorio-Valencia, S., and Zhou, B. (2024). Roles of Macrophages and Endothelial Cells and Their Crosstalk in Acute Lung Injury. *Biomedicines* 12. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12030632>.
 74. Janssen, W., Barthel, L., Muldrow, A., Oberley-Deegan, R., Kearns, M., Jakubzick, C., and Henson, P. (2011). Fas determines differential fates of resident and recruited macrophages during resolution of acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 547–560. <https://doi.org/10.1164/rccm.201011-1891OC>.
 75. Mould, K., Jackson, N., Henson, P., Seibold, M., and Janssen, W. (2019). Single cell RNA sequencing identifies unique inflammatory airspace macrophage subsets. *JCI Insight* 4. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126556>.
 76. Zaslona, Z., Przybranowski, S., Wilke, C., van, N., Rooijen, Teitz-Tennenbaum, S., Osterholzer, J., Wilkinson, J., Moore, B., and Peters-Golden, M. (2014). Resident alveolar macrophages suppress, whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of asthma. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 193, 4245–4253. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400580>.
 77. Aegerter, H., Kulikauskaite, J., Crotta, S., Patel, H., Kelly, G., Hessel, E., Mack, M., Beinke, S., and Wack, A. (2020). Influenza-induced monocyte-derived alveolar macrophages confer prolonged antibacterial protection. *Nat. Immunol.* 21, 145–157. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0568-x>.
 78. Madissoon, E., Oliver, A., Kleshchevnikov, V., Willbrey-Clark, A., Polanski, K., Richoz, N., Ribeiro, A., Orsi, Mamanova, L., Bolt, L., Elementaite, R., et al. (2023). A spatially resolved atlas of the human lung characterizes a gland-associated immune niche. *Nat. Genet.* 55, 66–77. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01243-4>.
 79. Evren, E., Ringqvist, E., Tripathi, K., Sleiers, N., Rives, I., Alisjahbana, A., Gao, Y., Sarhan, D., Halle, T., Sorini, C., et al. (2021). Distinct developmental pathways from blood monocytes generate human lung macrophage diversity. *Immunity* 54, 259-275.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.12.003>.
 80. Julia, V., Hessel, E., Malherbe, L., Glaichenhaus, N., O’Garra, A., and Coffman, R. (2002). A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity* 16, 271–283. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00276-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00276-5).
 81. Collin, M., and Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* 154, 3–20. <https://doi.org/10.1111/imm.12888>.
 82. Kopf, M., Schneider, C., and Nobs, S. (2015). The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells. *Nat. Immunol.* 16, 36–44. <https://doi.org/10.1038/ni.3052>.
 83. Desch, A., Gibbings, S., Goyal, R., Kolde, R., Bednarek, J., Bruno, T., Slansky, J., Jacobelli, J., Mason, R., Ito, Y., et al. (2016). Flow Cytometric Analysis of Mononuclear Phagocytes in Nondiseased Human Lung and Lung-Draining Lymph Nodes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 614–626. <https://doi.org/10.1164/rccm.201507-1376OC>.
 84. MacLean, J., Xia, W., Pinto, C., Zhao, L., Liu, H., and Kradin, R. (1996). Sequestration of inhaled particulate antigens by lung phagocytes. A mechanism for the effective inhibition of pulmonary cell-mediated immunity. *Am. J. Pathol.* 148, 657–666.

BIBLIOGRAPHIE

85. Mesnil, C., Raulier, S., Paulissen, G., Xiao, X., Birrell, M., Pirottin, D., Janss, T., Starkl, P., Ramery, E., Henket, M., et al. (2016). Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J. Clin. Invest.* *126*, 3279–3295. <https://doi.org/10.1172/JCI85664>.
86. Yipp, B., Kim, J., Lima, R., Zbytniuk, L., Petri, B., Swanlund, N., Ho, M., Szeto, V., Tak, T., Koenderman, L., et al. (2017). The Lung is a Host Defense Niche for Immediate Neutrophil-Mediated Vascular Protection. *Sci. Immunol.* *2*. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aam8929>.
87. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G., Metzler, K., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 459–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>.
88. Aulakh, G. (2018). Neutrophils in the lung: the first responders. *Cell Tissue Res.* *371*, 577–588. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2748-z>.
89. Bhatia, M., Zemans, R., and Jeyaseelan, S. (2012). Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *46*, 566–572. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0392TR>.
90. Doerschuk, C. (2001). Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. *Microcirc. N. Y. N* *1994* *8*, 71–88.
91. Padigel, U., Hess, J., Lee, J., Lok, J., Nolan, T., Schad, G., and Abraham, D. (2007). Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *J. Infect. Dis.* *196*, 1844–1851. <https://doi.org/10.1086/522968>.
92. Chu, D., Jimenez-Saiz, R., Verschoor, C., Walker, T., Goncharova, S., Llop-Guevara, A., Shen, P., Gordon, M., Barra, N., Bassett, J., et al. (2014). Indigenous enteric eosinophils control DCs to initiate a primary Th2 immune response in vivo. *J. Exp. Med.* *211*, 1657–1672. <https://doi.org/10.1084/jem.20131800>.
93. Bernink, J., Peters, C., Munneke, M., te, A., Velde, Meijer, S., Weijer, K., Hreggvidsdottir, H., Heinsbroek, S., Legr, N, et al. (2013). Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nat. Immunol.* *14*, 221–229. <https://doi.org/10.1038/ni.2534>.
94. Cooper, G., Ostridge, K., Khakoo, S., Wilkinson, T., and Staples, K. (2018). Human CD49a(+) Lung Natural Killer Cell Cytotoxicity in Response to Influenza A Virus. *Front. Immunol.* *9*, 1671. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01671>.
95. Tomasello, E., Yessaad, N., Gregoire, E., Hudspeth, K., Luci, C., Mavilio, D., Hardwigsen, J., and Vivier, E. (2012). Mapping of NKp46(+) Cells in Healthy Human Lymphoid and Non-Lymphoid Tissues. *Front. Immunol.* *3*, 344. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00344>.
96. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* *9*, 503–510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>.
97. Glatzer, T., Killig, M., Meisig, J., Ommert, I., Luetke-Eversloh, M., Babic, M., Paclik, D., Blüthgen, N., Seidl, R., Seifarth, C., et al. (2013). RORγt⁺ innate lymphoid cells acquire a proinflammatory program upon engagement of the activating receptor NKp44. *Immunity* *38*, 1223–1235. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.013>.
98. Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di, J., Santo, Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R., McKenzie, A., Mebius, R., et al. (2013). Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 145–149. <https://doi.org/10.1038/nri3365>.
99. Krangel, M. (2009). Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.03.009>.
100. Fichtner, A., Ravens, S., and Prinz, I. (2020). Human γδ TCR Repertoires in Health and Disease. *Cells* *9*. <https://doi.org/10.3390/cells9040800>.
101. Farber, D., Yudanin, N., and Restifo, N. (2014). Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 24–35. <https://doi.org/10.1038/nri3567>.

BIBLIOGRAPHIE

102. Sanmamed, M., Pastor, F., Rodriguez, A., Perez-Gracia, J., Rodriguez-Ruiz, M., Jure-Kunkel, M., and Melero, I. (2015). Agonists of Co-stimulation in Cancer Immunotherapy Directed Against CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, and ICOS. *Semin. Oncol.* *42*, 640–655. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.05.014>.
103. Ishii, N., Takahashi, T., Soroosh, P., and Sugamura, K. (2010). OX40-OX40 ligand interaction in T-cell-mediated immunity and immunopathology. *Adv. Immunol.* *105*, 63–98. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(10\)05003-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(10)05003-0).
104. Willoughby, J., Griffiths, J., Tews, I., and Cragg, M. (2017). OX40: Structure and function - What questions remain? *Mol. Immunol.* *83*, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.01.006>.
105. Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T., and Forsthuber, T. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* *74*, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>.
106. Thome, J., Yudanin, N., Ohmura, Y., Kubota, M., Grinshpun, B., Sathaliyawala, T., Kato, T., Lerner, H., Shen, Y., and Farber, D. (2014). Spatial map of human T cell compartmentalization and maintenance over decades of life. *Cell* *159*, 814–828. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.026>.
107. Muroyama, Y., and Wherry, E. (2021). Memory T-Cell Heterogeneity and Terminology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *13*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037929>.
108. Chalmin, F., Humblin, E., Ghiringhelli, F., and Végran, F. (2018). Transcriptional Programs Underlying Cd4 T Cell Differentiation and Functions. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *341*, 1–61. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.07.002>.
109. Rouers, A., Jeger-Madiot, R., Moris, A., and Graff-Dubois, S. (2017). [Follicular helper T cells and HIV - United for better and worse]. *Med. Sci. MS* *33*, 878–886. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173310020>.
110. Croft, M., So, T., Duan, W., and Soroosh, P. (2009). The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol. Rev.* *229*, 173–191. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00766.x>.
111. Croft, M. (2010). Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 57–78. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101243>.
112. Rogers, P., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* *15*, 445–455. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00191-1](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00191-1).
113. Song, J., Salek-Ardakani, S., Rogers, P., Cheng, M., Van, L., Parijs, and Croft, M. (2004). The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity. *Nat. Immunol.* *5*, 150–158. <https://doi.org/10.1038/ni1030>.
114. Mestas, J., Crampton, S., Hori, T., and Hughes, C. (2005). Endothelial cell co-stimulation through OX40 augments and prolongs T cell cytokine synthesis by stabilization of cytokine mRNA. *Int. Immunol.* *17*, 737–747. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh255>.
115. Fantini, M., Becker, C., Tubbe, I., Nikolaev, A., Lehr, H., Galle, P., and Neurath, M. (2006). Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* *55*, 671–680. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.072801>.
116. Webb, G., Hirschfield, G., and Lane, P. (2016). OX40, OX40L and Autoimmunity: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *50*, 312–332. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8498-3>.
117. Jember, A., Zuberi, R., Liu, F., and Croft, M. (2001). Development of allergic inflammation in a murine model of asthma is dependent on the costimulatory receptor OX40. *J. Exp. Med.* *193*, 387–392. <https://doi.org/10.1084/jem.193.3.387>.
118. Gramaglia, I., Jember, A., Pippig, S., Weinberg, A., Killeen, N., and Croft, M. (2000). The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 3043–3050. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.6.3043>.

BIBLIOGRAPHIE

119. Murata, K., Nose, M., Ndhlovu, L., Sato, T., Sugamura, K., and Ishii, N. (2002). Constitutive OX40/OX40 ligand interaction induces autoimmune-like diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 4628–4636. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4628>.
120. Unsoeld, H., and Pircher, H. (2005). Complex memory T-cell phenotypes revealed by coexpression of CD62L and CCR7. *J. Virol.* *79*, 4510–4513. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.4510-4513.2005>.
121. Anderson, K., Sung, H., Skon, C., Lefrançois, L., Deisinger, A., Vezys, V., and Masopust, D. (2012). Cutting edge: intravascular staining redefines lung CD8 T cell responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 2702–2706. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201682>.
122. Cose, S., Brammer, C., Khanna, K., Masopust, D., and Lefrançois, L. (2006). Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1423–1433. <https://doi.org/10.1002/eji.200535539>.
123. Carman, C., and Martinelli, R. (2015). T Lymphocyte-Endothelial Interactions: Emerging Understanding of Trafficking and Antigen-Specific Immunity. *Front. Immunol.* *6*, 603. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00603>.
124. Chekol, E., Abebe, Asmamaw, T., Dejenie, Mengie, T., Ayele, Dagnew, N., Baye, Agegnehu, A., Teshome, and Tilahun, Z., Mucho (2021). The Role of Regulatory B Cells in Health and Diseases: A Systemic Review. *J. Inflamm. Res.* *14*, 75–84. <https://doi.org/10.2147/JIR.S286426>.
125. Allie, S., Bradley, J., Mudunuru, U., Schultz, M., Graf, B., Lund, F., R, and all, T. (2019). The establishment of resident memory B cells in the lung requires local antigen encounter. *Nat. Immunol.* *20*, 97–108. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0260-6>.
126. Tan, H., Esterbauer, R., V, erven, H., Juno, J., Kent, S., and Wheatley, A. (2019). Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissues (iBALT) Serve as Sites of B Cell Selection and Maturation Following Influenza Infection in Mice. *Front. Immunol.* *10*, 611. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00611>.
127. Mathew, N., Jayanthan, J., Smirnov, I., Robinson, J., Axelsson, H., Nakka, S., Emmanouilidi, A., Czarnewski, P., Yewdell, W., Schön, K., et al. (2021). Single-cell BCR and transcriptome analysis after influenza infection reveals spatiotemporal dynamics of antigen-specific B cells. *Cell Rep.* *35*, 109286. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109286>.
128. MacLean, A., Richmond, N., Koneva, L., Attar, M., Medina, C., Thornton, E., Gomes, A., El-Turabi, A., Bachmann, M., Rijal, P., et al. (2022). Secondary influenza challenge triggers resident memory B cell migration and rapid relocation to boost antibody secretion at infected sites. *Immunity* *55*, 718-733.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.03.003>.
129. Weisel, N., Joachim, S., Smita, S., Callahan, D., Elsner, R., Conter, L., Chikina, M., Farber, D., Weisel, F., and Shlomchik, M. (2022). Surface phenotypes of naive and memory B cells in mouse and human tissues. *Nat. Immunol.* *23*, 135–145. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01078-x>.
130. Barker, K., Etesami, N., Shenoy, A., Arafa, E., Lyon, C., de, Ana, Smith, N., Martin, I., Goltry, W., Barron, A., Browning, J., et al. (2021). Lung-resident memory B cells protect against bacterial pneumonia. *J. Clin. Invest.* *131*. <https://doi.org/10.1172/JCI141810>.
131. Silva-Sanchez, A., R, and all, T. (2020). Role of iBALT in Respiratory Immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *426*, 21–43. https://doi.org/10.1007/82_2019_191.
132. Swarnalekha, N., Schreiner, D., Litzler, L., Iftikhar, S., Kirchmeier, D., Künzli, M., Son, Y., Sun, J., Moreira, E., and King, C. (2021). T resident helper cells promote humoral responses in the lung. *Sci. Immunol.* *6*. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abb6808>.
133. Son, Y., Cheon, I., Wu, Y., Li, C., Wang, Z., Gao, X., Chen, Y., Takahashi, Y., Fu, Y., Dent, A., et al. (2021). Tissue-resident CD4(+) T helper cells assist the development of protective respiratory B and CD8(+) T cell memory responses. *Sci. Immunol.* *6*. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abb6852>.
134. Stahl, F., Heller, K., Halle, S., Keyser, K., Busche, A., Marquardt, A., Wagner, K., Boelter, J., Bischoff, Y., Kremmer, E., et al. (2013). Nodular inflammatory foci are sites of T cell priming and control of murine

BIBLIOGRAPHIE

- cytomegalovirus infection in the neonatal lung. *PLoS Pathog.* 9, e1003828. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003828>.
135. Cadena, A., Fortune, S., and Flynn, J. (2017). Heterogeneity in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 691–702. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.69>.
 136. Butcher, E. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67, 1033–1036. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90279-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90279-8).
 137. Springer, T. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301–314. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90337-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90337-9).
 138. Pober, J., and Sessa, W. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 803–815. <https://doi.org/10.1038/nri2171>.
 139. Dauphinee, S., and Karsan, A. (2006). Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 86, 9–22. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700366>.
 140. Liao, J. (2013). Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J. Clin. Invest.* 123, 540–541. <https://doi.org/10.1172/JCI66843>.
 141. Metcalf, D., Nightingale, T., Zenner, H., Lui-Roberts, W., and Cutler, D. (2008). Formation and function of Weibel-Palade bodies. *J. Cell Sci.* 121, 19–27. <https://doi.org/10.1242/jcs.03494>.
 142. Cook-Mills, J., and Deem, T. (2005). Active participation of endothelial cells in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 77, 487–495. <https://doi.org/10.1189/jlb.0904554>.
 143. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689. <https://doi.org/10.1038/nri2156>.
 144. McEver, R. (2002). Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 581–586. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(02\)00367-8](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(02)00367-8).
 145. McEver, R., and Cummings, R. (1997). Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.* 100, 485–491. <https://doi.org/10.1172/JCI119556>.
 146. Barreiro, O., Yanez-Mo, M., Serrador, J., Montoya, M., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Furthmayr, H., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J. Cell Biol.* 157, 1233–1245. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112126>.
 147. Cinamon, G., Shinder, V., and Alon, R. (2001). Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat. Immunol.* 2, 515–522. <https://doi.org/10.1038/88710>.
 148. Gerhardt, T., and Ley, K. (2015). Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc. Res.* 107, 321–330. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv147>.
 149. Muller, W. (2016). Transendothelial migration: unifying principles from the endothelial perspective. *Immunol. Rev.* 273, 61–75. <https://doi.org/10.1111/imr.12443>.
 150. Nourshargh, S., and Alon, R. (2014). Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 41, 694–707. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>.
 151. Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 692–704. <https://doi.org/10.1038/nri3908>.
 152. Engelhardt, B., and Ransohoff, R. (2012). Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol.* 33, 579–589. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.07.004>.
 153. Allingham, M., van, J., Buul, and Burridge, K. (2007). ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 4053–4064. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.4053>.

BIBLIOGRAPHIE

154. Orsenigo, F., Giampietro, C., Ferrari, A., Corada, M., Galaup, A., Sigismund, S., Ristagno, G., Maddaluno, L., Koh, G., Franco, D., et al. (2012). Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat. Commun.* *3*, 1208. <https://doi.org/10.1038/ncomms2199>.
155. Luscinskas, F., Ma, S., Nusrat, A., Parkos, C., and Shaw, S. (2002). Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair. *Semin. Immunol.* *14*, 105–113. <https://doi.org/10.1006/smim.2001.0347>.
156. Woodfin, A., Voisin, M., Beyrau, M., Colom, B., Caille, D., Diapouli, F., Nash, G., Chavakis, T., Albelda, S., Rainger, G., et al. (2011). The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat. Immunol.* *12*, 761–769. <https://doi.org/10.1038/ni.2062>.
157. Schulte, D., Küppers, V., Dartsch, N., Broermann, A., Li, H., Zarbock, A., Kamenyeva, O., Kiefer, F., Kh, oga, A., et al. (2011). Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. *EMBO J.* *30*, 4157–4170. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.304>.
158. Alcaide, P., Auerbach, S., and Luscinskas, F. (2009). Neutrophil recruitment under shear flow: it's all about endothelial cell rings and gaps. *Microcirc. N. Y. N* *16*, 43–57. <https://doi.org/10.1080/10739680802273892>.
159. Carman, C., and Springer, T. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol.* *167*, 377–388. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404129>.
160. Carman, C., Sage, P., Sciuto, T., de, M., la, Fuente, Geha, R., Ochs, H., Dvorak, H., Dvorak, A., and Springer, T. (2007). Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* *26*, 784–797. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.04.015>.
161. Tedder, T., Steeber, D., Chen, A., and Engel, P. (1995). The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *9*, 866–873.
162. Schweitzer, K., Dräger, A., van, P., der, Valk, Thijsen, S., Zevenbergen, A., Theijssmeijer, A., van, C., der, Schoot, and Langenhuisen, M. (1996). Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am. J. Pathol.* *148*, 165–175.
163. Weninger, W., Ulfman, L., Cheng, G., Souchkova, N., Quackenbush, E., Lowe, J., and von, U., Andrian (2000). Specialized contributions by alpha(1,3)-fucosyltransferase-IV and FucT-VII during leukocyte rolling in dermal microvessels. *Immunity* *12*, 665–676. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80217-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80217-4).
164. Chong, B., Murphy, J., Kupper, T., and Fuhlbrigge, R. (2004). E-selectin, thymus- and activation-regulated chemokine/CCL17, and intercellular adhesion molecule-1 are constitutively coexpressed in dermal microvessels: a foundation for a cutaneous immunosurveillance system. *J. Immunol. Baltim. Md* *172*, 1575–1581. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1575>.
165. Maas, S., Soehnlein, O., and Viola, J. (2018). Organ-Specific Mechanisms of Transendothelial Neutrophil Migration in the Lung, Liver, Kidney, and Aorta. *Front. Immunol.* *9*, 2739. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02739>.
166. Rossaint, J., and Zarbock, A. (2013). Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. *J. Innate Immun.* *5*, 348–357. <https://doi.org/10.1159/000345943>.
167. Kornerup, K., Salmon, G., Pitchford, S., Liu, W., and Page, C. (2010). Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *109*, 758–767. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01086.2009>.
168. Mizgerd, J., Meek, B., Kutkoski, G., Bullard, D., Beaudet, A., and Doerschuk, C. (1996). Selectins and neutrophil traffic: margination and Streptococcus pneumoniae-induced emigration in murine lungs. *J. Exp. Med.* *184*, 639–645. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.639>.
169. Lim, Y., Garcia-Cardena, G., Allport, J., Zervoglos, M., Connolly, A., Gimbrone, J., MA, and Luscinskas, F. (2003). Heterogeneity of endothelial cells from different organ sites in T-cell subset recruitment. *Am. J. Pathol.* *162*, 1591–1601. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64293-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64293-9).

BIBLIOGRAPHIE

170. Doerschuk, C. (2000). Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages. *Respir. Res.* *1*, 136–140. <https://doi.org/10.1186/rr24>.
171. Kuebler, W., and Goetz, A. (2002). The margined pool. *Eur. Surg. Res. Eur. Chir. Forsch. Rech. Chir. Eur.* *34*, 92–100. <https://doi.org/10.1159/000048894>.
172. Lohse, A., Knolle, P., Bilo, K., Uhrig, A., Waldmann, C., Ibe, M., Schmitt, E., Gerken, G., and Meyer, K., Zum, B. (1996). Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* *110*, 1175–1181. <https://doi.org/10.1053/gast.1996.v110.pm8613007>.
173. Wedgwood, J., Hatam, L., and Bonagura, V. (1988). Effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor on the expression of class I and class II major histocompatibility molecules by cultured human umbilical vein endothelial cells. *Cell. Immunol.* *111*, 1–9. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(88\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0008-8749(88)90046-9).
174. Knolle, P., and Wöhleber, D. (2016). Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells. *Cell. Mol. Immunol.* *13*, 347–353. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.5>.
175. Motz, G., Santoro, S., Wang, L., Garrabrant, T., Lastra, R., Hagemann, I., Lal, P., Feldman, M., Benencia, F., and Coukos, G. (2014). Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat. Med.* *20*, 607–615. <https://doi.org/10.1038/nm.3541>.
176. Dini, L., Lentini, A., Diez, G., Rocha, M., Falasca, L., Serafino, L., and Vidal-Vanaclocha, F. (1995). Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *J. Cell Sci.* *108* (Pt 3), 967–973. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.3.967>.
177. Zhou, T., Zheng, Y., Sun, L., Badea, S., Jin, Y., Liu, Y., Rolfe, A., Sun, H., Wang, X., Cheng, Z., et al. (2019). Microvascular endothelial cells engulf myelin debris and promote macrophage recruitment and fibrosis after neural injury. *Nat. Neurosci.* *22*, 421–435. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0324-9>.
178. Schurich, A., Böttcher, J., Burgdorf, S., Penzler, P., Hegenbarth, S., Kern, M., Dolf, A., Endl, E., Schultze, J., Wiertz, E., et al. (2009). Distinct kinetics and dynamics of cross-presentation in liver sinusoidal endothelial cells compared to dendritic cells. *Hepatology* *50*, 909–919. <https://doi.org/10.1002/hep.23075>.
179. Shiao, S., McNiff, J., and Pober, J. (2005). Memory T cells and their costimulators in human allograft injury. *J. Immunol.* *175*, 4886–4896. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.4886>.
180. Sha, X., Meng, S., Li, X., Xi, H., Maddaloni, M., Pascual, D., Shan, H., Jiang, X., Wang, H., and Yang, X. (2015). Interleukin-35 Inhibits Endothelial Cell Activation by Suppressing MAPK-AP-1 Pathway. *J. Biol. Chem.* *290*, 19307–19318. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.663286>.
181. Mai, J., Nanayakkara, G., Lopez-Pastrana, J., Li, X., Li, Y., Wang, X., Song, A., Virtue, A., Shao, Y., Shan, H., et al. (2016). Interleukin-17A Promotes Aortic Endothelial Cell Activation via Transcriptionally and Post-translationally Activating p38 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Pathway. *J. Biol. Chem.* *291*, 4939–4954. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.690081>.
182. Gatheral, T., Reed, D., Moreno, L., Gough, P., Votta, B., Sehon, C., Rickard, D., Bertin, J., Lim, E., Nicholson, A., et al. (2012). A key role for the endothelium in NOD1 mediated vascular inflammation: comparison to TLR4 responses. *PloS One* *7*, e42386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042386>.
183. Shibamiya, A., Hersemeyer, K., Schmidt, T., Wöll, Sedding, D., Daniel, J., Bauer, S., Koyama, T., Preissner, K., and Kanse, S. (2009). A key role for Toll-like receptor-3 in disrupting the hemostasis balance on endothelial cells. *Blood* *113*, 714–722. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-137901>.
184. Cross, A., Lion, J., Poussin, K., Assayag, M., Taupin, J., Glotz, D., and Mooney, N. (2019). HLA-DQ alloantibodies directly activate the endothelium and compromise differentiation of FoxP3(high) regulatory T lymphocytes. *Kidney Int.* *96*, 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.04.023>.
185. Lomas-Neira, J., Monaghan, S., Huang, X., Fallon, E., Chung, C., and Ayala, A. (2018). Novel Role for PD-1:PD-L1 as Mediator of Pulmonary Vascular Endothelial Cell Functions in Pathogenesis of Indirect ARDS in Mice. *Front. Immunol.* *9*, 3030. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03030>.

BIBLIOGRAPHIE

186. Daar, A., Fuggle, S., Fabre, J., Ting, A., and Morris, P. (1984). The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs. *Transplantation* 38, 293–298. <https://doi.org/10.1097/00007890-198409000-00019>.
187. Mestas, J., and Hughes, C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 2731–2738. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>.
188. Odobasic, D., Kitching, A., Semple, T., Timoshanko, J., Tipping, P., and Holdsworth, S. (2005). Glomerular expression of CD80 and CD86 is required for leukocyte accumulation and injury in crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16, 2012–2022. <https://doi.org/10.1681/ASN.2004060437>.
189. Pober, J., Merola, J., Liu, R., and Manes, T. (2017). Antigen Presentation by Vascular Cells. *Front. Immunol.* 8, 1907. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01907>.
190. Tan, P., Chan, C., Xue, S., Dong, R., Ananthasayanan, B., Manunta, M., Kerouedan, C., Cheshire, N., Wolfe, J., Haskard, D., et al. (2004). Phenotypic and functional differences between human saphenous vein (HSVEC) and umbilical vein (HUVEC) endothelial cells. *Atherosclerosis* 173, 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2003.12.011>.
191. Lozanoska-Ochser, B., Klein, N., Huang, G., Alvarez, R., and Peakman, M. (2008). Expression of CD86 on human islet endothelial cells facilitates T cell adhesion and migration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 6109–6116. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6109>.
192. Biedermann, B., and Pober, J. (1999). Human vascular endothelial cells favor clonal expansion of unusual alloreactive CTL. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 7022–7030.
193. Taflin, C., Favier, B., Baudhuin, J., Savenay, A., Hemon, P., Bensussan, A., Charron, D., Glotz, D., and Mooney, N. (2011). Human endothelial cells generate Th17 and regulatory T cells under inflammatory conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2891–2896. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011811108>.
194. Jane-Wit, D., Manes, T., Yi, T., Qin, L., Clark, P., Kirkiles-Smith, N., Abrahami, P., Devalliere, J., Moeckel, G., Kulkarni, S., et al. (2013). Alloantibody and complement promote T cell-mediated cardiac allograft vasculopathy through noncanonical nuclear factor- κ B signaling in endothelial cells. *Circulation* 128, 2504–2516. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002972>.
195. Lion, J., Burbach, M., Cross, A., Poussin, K., Taflin, C., Kaveri, S., Haziot, A., Glotz, D., and Mooney, N. (2017). Endothelial Cell Amplification of Regulatory T Cells Is Differentially Modified by Immunosuppressors and Intravenous Immunoglobulin. *Front. Immunol.* 8, 1761. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01761>.
196. Liu, L., Fang, C., Fu, W., Jiang, B., Li, G., Qin, L., Rosenbluth, J., Gong, G., Xie, C., Yoo, P., et al. (2020). Endothelial Cell-Derived Interleukin-18 Released During Ischemia Reperfusion Injury Selectively Expands T Peripheral Helper Cells to Promote Alloantibody Production. *Circulation* 141, 464–478. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.042501>.
197. Rao, G., Wong, A., Collinge, M., Sarhan, J., Yarovinsky, T., Ramgolam, V., Gaestel, M., Pardi, R., and Bender, J. (2018). T cell LFA-1-induced proinflammatory mRNA stabilization is mediated by the p38 pathway kinase MK2 in a process regulated by hnRNPs C, H1 and K. *PLoS One* 13, e0201103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201103>.
198. Haydinger, C., Ash, er, L., Tan, A., and Smith, J. (2023). Intercellular Adhesion Molecule 1: More than a Leukocyte Adhesion Molecule. *Biology* 12. <https://doi.org/10.3390/biology12050743>.
199. Zhao, G., Gentile, M., Xue, L., Cosgriff, C., Weiner, A., Adams-Tzivelekidis, S., Wong, J., Li, X., Kass-Gergi, S., Holcomb, N., et al. (2023). Vascular Endothelial-derived SPARCL1 Exacerbates Viral Pneumonia Through Pro-Inflammatory Macrophage Activation. *BioRxiv Prepr. Serv. Biol.* <https://doi.org/10.1101/2023.05.25.541966>.
200. Liu, P., Li, Y., Li, M., Zhou, H., Zhang, H., Zhang, Y., Xu, J., Xu, Y., Zhang, J., Xia, B., et al. (2022). Endothelial Shp2 deficiency controls alternative activation of macrophage preventing radiation-induced lung injury through notch signaling. *iScience* 25, 103867. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103867>.

BIBLIOGRAPHIE

201. Feng, Z., Zhou, J., Liu, Y., Xia, R., Li, Q., Yan, L., Chen, Q., Chen, X., Jiang, Y., Chao, G., et al. (2021). Epithelium- and endothelium-derived exosomes regulate the alveolar macrophages by targeting RGS1 mediated calcium signaling-dependent immune response. *Cell Death Differ.* 28, 2238–2256. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00750-x>.
202. Ma, R., Su, H., Jiao, K., and Liu, J. (2023). Role of Th17 cells, Treg cells, and Th17/Treg imbalance in immune homeostasis disorders in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Immun. Inflamm. Dis.* 11, e784. <https://doi.org/10.1002/iid3.784>.
203. Barna, B., Judson, M., and Thomassen, M. (2021). Inflammatory Pathways in Sarcoidosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1304, 39–52. https://doi.org/10.1007/978-3-030-68748-9_3.
204. Alex, rova, Y., Costiniuk, C., and Jenabian, M. (2021). Pulmonary Immune Dysregulation and Viral Persistence During HIV Infection. *Front. Immunol.* 12, 808722. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.808722>.
205. Gomes, M., Teixeira, A., Coelho, A., Araújo, A., and Medeiros, R. (2014). The role of inflammation in lung cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 816, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0837-8_1.
206. Rudin, C., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., and Sage, J. (2021). Small-cell lung cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* 7, 3. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0>.
207. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 12, 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
208. Lawrence, M., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S., Stewart, C., Mermel, C., Roberts, S., et al. (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499, 214–218. <https://doi.org/10.1038/nature12213>.
209. Li, Y., and Hecht, S. (2022). Carcinogenic components of tobacco and tobacco smoke: A 2022 update. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 165, 113179. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113179>.
210. Sheikh, M., Virani, S., Robbins, H., Foretova, L., Holcatova, I., Janout, V., Lissowska, J., Navratilova, M., Mukeriya, A., Ognjanovic, M., et al. (2023). Survival and prognostic factors of early-stage non-small cell lung cancer in Central and Eastern Europe: A prospective cohort study. *Cancer Med.* 12, 10563–10574. <https://doi.org/10.1002/cam4.5791>.
211. Alonso-Sardón, M., Chamorro, A., Hernández-García, I., Iglesias-de-Sena, H., Martín-Rodero, H., Herrera, C., Marcos, M., and Mirón-Canelo, J. (2015). Association between Occupational Exposure to Wood Dust and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 10, e0133024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133024>.
212. Markowitz, S. (2022). Lung Cancer Screening in Asbestos-Exposed Populations. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 19. <https://doi.org/10.3390/ijerph19052688>.
213. Ge, C., Peters, S., Olsson, A., Portengen, L., Schüz, J., Almansa, J., Behrens, T., Pesch, B., Kendzia, B., Ahrens, W., et al. (2020). Respirable Crystalline Silica Exposure, Smoking, and Lung Cancer Subtype Risks. A Pooled Analysis of Case-Control Studies. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 202, 412–421. <https://doi.org/10.1164/rccm.201910-1926OC>.
214. Riudavets, M., Garcia, M., de Herreros, Besse, B., and Mezquita, L. (2022). Radon and Lung Cancer: Current Trends and Future Perspectives. *Cancers* 14. <https://doi.org/10.3390/cancers14133142>.
215. Hill, W., Lim, E., Weeden, C., Lee, C., Augustine, M., Chen, K., Kuan, F., Marongiu, F., Evans, J., EJ, Moore, D., et al. (2023). Lung adenocarcinoma promotion by air pollutants. *Nature* 616, 159–167. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05874-3>.
216. Nassikas, N., Malhamé, I., Miller, M., and Bourjeily, G. (2021). Pulmonary Considerations for Pregnant Women. *Clin. Chest Med.* 42, 483–496. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2021.04.008>.
217. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V., Zhou, S., Diaz, J., LA, and Kinzler, K. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546–1558. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>.

BIBLIOGRAPHIE

218. Bailey, M., Tokheim, C., Porta-Pardo, E., Sengupta, S., Bertr, D., Weerasinghe, A., Colaprico, A., Wendl, M., Kim, J., et al. (2018). Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell* *173*, 371–385.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.060>.
219. Bourreau, C., Treps, L., Faure, S., Fradin, D., and Clere, N. (2023). Therapeutic strategies for non-small cell lung cancer: Experimental models and emerging biomarkers to monitor drug efficacies. *Pharmacol. Ther.* *242*, 108347. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108347>.
220. Ghimessy, A., Radecky, P., Laszlo, V., Hegedus, B., Renyi-Vamos, F., Fillinger, J., Klepetko, W., Lang, C., Dome, B., and Megyesfalvi, Z. (2020). Current therapy of KRAS-mutant lung cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *39*, 1159–1177. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09903-9>.
221. Tímár, J. (2014). The clinical relevance of KRAS gene mutation in non-small-cell lung cancer. *Curr. Opin. Oncol.* *26*, 138–144. <https://doi.org/10.1097/CCO.000000000000051>.
222. O’Bryan, J. (2019). Pharmacological targeting of RAS: Recent success with direct inhibitors. *Pharmacol. Res.* *139*, 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.10.021>.
223. Dogan, S., Shen, R., Ang, D., Johnson, M., D’Angelo, S., Paik, P., Brzostowski, E., Riely, G., Kris, M., Zakowski, M., et al. (2012). Molecular epidemiology of EGFR and KRAS mutations in 3,026 lung adenocarcinomas: higher susceptibility of women to smoking-related KRAS-mutant cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 6169–6177. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3265>.
224. Marchetti, A., Felicioni, L., Malatesta, S., Grazia, M., Sciarrotta, Guetti, L., Chella, A., Viola, P., Pullara, C., Mucilli, F., and Buttitta, F. (2011). Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *29*, 3574–3579. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.9638>.
225. Alvarez, J., and Otterson, G. (2019). Agents to treat BRAF-mutant lung cancer. *Drugs Context* *8*, 212566. <https://doi.org/10.7573/dic.212566>.
226. Yan, N., Guo, S., Zhang, H., Zhang, Z., Shen, S., and Li, X. (2022). BRAF-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Current Treatment Status and Future Perspective. *Front. Oncol.* *12*, 863043. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.863043>.
227. Yun, C., Boggon, T., Li, Y., Woo, M., Greulich, H., Meyerson, M., and Eck, M. (2007). Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* *11*, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.12.017>.
228. Zappa, C., and Mousa, S. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl. Lung Cancer Res.* *5*, 288–300. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>.
229. Deng, H., Lei, Q., Wang, C., Wang, Z., Chen, H., Wang, G., Yang, N., Huang, D., Yu, Q., Yao, M., et al. (2022). A fluorogenic probe for predicting treatment response in non-small cell lung cancer with EGFR-activating mutations. *Nat. Commun.* *13*, 6944. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34627-5>.
230. Moreau, D., Huchot, E., Foch, E., Allou, N., Caumont, C., Merlio, J., and Andre, M. (2022). Molecular profile of non-small cell lung cancer in reunion Island. *Respir. Med. Res.* *82*, 100939. <https://doi.org/10.1016/j.resmer.2022.100939>.
231. Matakidou, A., Eisen, T., and Houlston, R. (2005). Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br. J. Cancer* *93*, 825–833. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602769>.
232. Kundu, J., and Surh, Y. (2008). Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat. Res.* *659*, 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.002>.
233. de, J., Torres, Marín, J., Casanova, C., Cote, C., Carrizo, S., Cordoba-Lanus, E., Baz-Dávila, R., Zulueta, J., Aguirre-Jaime, A., Saetta, M., et al. (2011). Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease— incidence and predicting factors. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *184*, 913–919. <https://doi.org/10.1164/rccm.201103-0430OC>.

BIBLIOGRAPHIE

234. Ballester, B., Milara, J., and Cortijo, J. (2019). Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer: Mechanisms and Molecular Targets. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20030593>.
235. Cabrera-Sanchez, J., Cuba, V., Vega, V., Van, P., der, Stuyft, and Otero, L. (2022). Lung cancer occurrence after an episode of tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* 31. <https://doi.org/10.1183/16000617.0025-2022>.
236. Wang, D., Li, W., Albasha, N., Griffin, L., Chang, H., Amaya, L., Ganguly, S., Zeng, L., Keum, B., González-Navajas, J., et al. (2023). Long-term exposure to house dust mites accelerates lung cancer development in mice. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 42, 26. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02587-9>.
237. Arriagada, R., Bergman, B., Dunant, A., Le, T., Chevalier, Pignon, J., Vansteenkiste, J., and International, G., Adjuvant, Lung, Cancer, Trial, Collaborative (2004). Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 351–360. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031644>.
238. Khalifa, J., Lerouge, D., Le, C., Péchoux, Pourel, N., Darréon, J., Mornex, F., and Giraud, P. (2022). Radiotherapy for primary lung cancer. *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* 26, 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2021.11.005>.
239. Visa, M., Abazeed, M., and Avella, D., Patino (2024). Integrative Approaches in Non-Small Cell Lung Cancer Management: The Role of Radiotherapy. *J. Clin. Med.* 13. <https://doi.org/10.3390/jcm13154296>.
240. Zhao, X., and Shao, C. (2020). Radiotherapy-Mediated Immunomodulation and Anti-Tumor Abscopal Effect Combining Immune Checkpoint Blockade. *Cancers* 12. <https://doi.org/10.3390/cancers12102762>.
241. Mok, T., Wu, Y., Thongprasert, S., Yang, C., Chu, D., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., et al. (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* 361, 947–957. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810699>.
242. Boumahdi, S., and de, F., Sauvage (2020). The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 19, 39–56. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0044-1>.
243. Hodi, F., O’Day, S., McDermott, D., Weber, R., Sosman, J., Haanen, J., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711–723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>.
244. Weber, J., M, ala, M., Del, M., Vecchio, Gogas, H., Arance, A., Cowey, C., Dalle, S., Schenker, M., Chiarion-Sileni, V., et al. (2017). Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 377, 1824–1835. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709030>.
245. Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A., Hui, R., Csősz, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., et al. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 375, 1823–1833. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>.
246. G, hi, L., Rodríguez-Abreu, D., Gadgeel, S., Esteban, E., Felip, E., De, F., Angelis, Domine, M., Clingan, P., Hochmair, M., et al. (2018). Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 378, 2078–2092. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801005>.
247. Popat, S., Mellemaard, A., Fahrback, K., Martin, A., Rizzo, M., Kaiser, R., Griebisch, I., and Reck, M. (2015). Nintedanib plus docetaxel as second-line therapy in patients with non-small-cell lung cancer: a network meta-analysis. *Future Oncol. Lond. Engl.* 11, 409–420. <https://doi.org/10.2217/fon.14.290>.
248. Larkins, E., Scepura, B., Blumenthal, G., Bloomquist, E., Tang, S., Biabie, M., Kluetz, P., Keegan, P., and Pazdur, R. (2015). U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: Ramucirumab for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Following Disease Progression On or After Platinum-Based Chemotherapy. *The oncologist* 20, 1320–1325. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0221>.
249. Socinski, M., Nishio, M., Jotte, R., Cappuzzo, F., Or, i, F., Stroyakovskiy, D., Nogami, N., Rodríguez-Abreu, D., Moro-Sibilot, D., et al. (2021). IMpower150 Final Overall Survival Analyses for Atezolizumab Plus Bevacizumab and Chemotherapy in First-Line Metastatic Nonsquamous NSCLC. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 16, 1909–1924. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.07.009>.

BIBLIOGRAPHIE

250. Reck, M., Mok, T., Nishio, M., Jotte, R., Cappuzzo, F., Orli, F., Stroyakovskiy, D., Nogami, N., Rodríguez-Abreu, D., et al. (2019). Atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in non-small-cell lung cancer (IMpower150): key subgroup analyses of patients with EGFR mutations or baseline liver metastases in a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Respir. Med.* *7*, 387–401. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30084-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30084-0).
251. Reck, M., Popat, S., Grohé, C., Corral, J., Novello, S., Gottfried, M., Brueckl, W., Radonjic, D., Kaiser, R., and Heymach, J. (2023). Anti-angiogenic agents for NSCLC following first-line immunotherapy: Rationale, recent updates, and future perspectives. *Lung Cancer Amst. Neth.* *179*, 107173. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2023.03.009>.
252. Kawashima, Y., Fukuhara, T., Saito, H., Furuya, N., Watanabe, K., Sugawara, S., Iwasawa, S., Tsunazuka, Y., Yamaguchi, O., Okada, M., et al. (2022). Bevacizumab plus erlotinib versus erlotinib alone in Japanese patients with advanced, metastatic, EGFR-mutant non-small-cell lung cancer (NEJ026): overall survival analysis of an open-label, randomised, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Respir. Med.* *10*, 72–82. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00166-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00166-1).
253. Pezzella, F., Pastorino, U., Tagliabue, E., Andreola, S., Sozzi, G., Gasparini, G., Menard, S., Gatter, K., Harris, A., Fox, S., et al. (1997). Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am. J. Pathol.* *151*, 1417–1423.
254. Moitra, K., Lou, H., and Dean, M. (2011). Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin. Pharmacol. Ther.* *89*, 491–502. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.14>.
255. Madjd, Z., Mehrjerdi, A., Sharifi, A., Molanaei, S., Shahzadi, S., and Asadi-Lari, M. (2009). CD44+ cancer cells express higher levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in breast tumours. *Cancer Immun.* *9*, 4.
256. Kobayashi, T., Makino, T., Yamashita, K., Saito, T., Tanaka, K., Takahashi, T., Kurokawa, Y., Yamasaki, M., Nakajima, K., Morii, E., et al. (2021). APR-246 induces apoptosis and enhances chemo-sensitivity via activation of ROS and TAp73-Noxa signal in oesophageal squamous cell cancer with TP53 missense mutation. *Br. J. Cancer* *125*, 1523–1532. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01561-0>.
257. Olivares-Urbano, M., Griñán-Lisón, C., Marchal, J., and Núñez, M. (2020). CSC Radioresistance: A Therapeutic Challenge to Improve Radiotherapy Effectiveness in Cancer. *Cells* *9*. <https://doi.org/10.3390/cells9071651>.
258. Jänne, P., Yang, J., Kim, D., Planchard, D., Ohe, Y., Ramalingam, S., Ahn, M., Kim, S., Su, W., Horn, L., et al. (2015). AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* *372*, 1689–1699. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411817>.
259. Thress, K., Paweletz, C., Felip, E., Cho, B., Stetson, D., Dougherty, B., Lai, Z., Markovets, A., Vivancos, A., Kuang, Y., et al. (2015). Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat. Med.* *21*, 560–562. <https://doi.org/10.1038/nm.3854>.
260. Chen, D., and Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* *39*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>.
261. Bonaventura, P., Shekarian, T., Alcazer, V., Valladeau-Guilemond, J., Valsesia-Wittmann, S., Amigorena, S., Caux, C., and Depil, S. (2019). Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Front. Immunol.* *10*, 168. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00168>.
262. Ayers, M., Lunceford, J., Nebozhyn, M., Murphy, E., Loboda, A., Kaufman, D., Albright, A., Cheng, J., Kang, S., Shankaran, V., et al. (2017). IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J. Clin. Invest.* *127*, 2930–2940. <https://doi.org/10.1172/JCI91190>.
263. Fumet, J., Richard, C., Ledys, F., Klopfenstein, Q., Joubert, P., Routy, B., Truntzer, C., Gagné, A., Hamel, M., Guimaraes, C., et al. (2018). Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy. *Br. J. Cancer* *119*, 950–960. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0220-9>.

BIBLIOGRAPHIE

264. Youn, J., Park, S., Park, S., Kim, G., Lee, H., Son, J., Hong, M., Ghaderpour, A., Baik, B., Islam, J., et al. (2020). Peripheral natural killer cells and myeloid-derived suppressor cells correlate with anti-PD-1 responses in non-small cell lung cancer. *Sci. Rep.* *10*, 9050. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65666-x>.
265. Kang, D., Chung, C., Sun, P., Lee, D., Lee, S., Park, D., Koh, J., Kim, Y., Yi, H., and Lee, J. (2022). Circulating regulatory T cells predict efficacy and atypical responses in lung cancer patients treated with PD-1/PD-L1 inhibitors. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII* *71*, 579–588. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-03018-y>.
266. Ghiringhelli, F., Bibeau, F., Greillier, L., Fumet, J., Ilie, A., Monville, F., Laugé, C., Catteau, A., Boquet, I., Majdi, A., et al. (2023). Immunoscore immune checkpoint using spatial quantitative analysis of CD8 and PD-L1 markers is predictive of the efficacy of anti- PD1/PD-L1 immunotherapy in non-small cell lung cancer. *EBioMedicine* *92*, 104633. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104633>.
267. Taylor, B., and Balko, J. (2022). Mechanisms of MHC-I Downregulation and Role in Immunotherapy Response. *Front. Immunol.* *13*, 844866. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.844866>.
268. Pereira, C., Gimenez-Xavier, P., Pros, E., Pajares, M., Moro, M., Gomez, A., Navarro, A., Condom, E., Moran, S., Gomez-Lopez, G., et al. (2017). Genomic Profiling of Patient-Derived Xenografts for Lung Cancer Identifies B2M Inactivation Impairing Immunorecognition. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *23*, 3203–3213. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1946>.
269. Limagne, E., Richard, C., Thibaudin, M., Fumet, J., Truntzer, C., Lagrange, A., Favier, L., Coudert, B., and Ghiringhelli, F. (2019). Tim-3/galectin-9 pathway and mMDSC control primary and secondary resistances to PD-1 blockade in lung cancer patients. *Oncoimmunology* *8*, e1564505. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1564505>.
270. Datar, I., Sanmamed, M., Wang, J., Henick, B., Choi, J., Badri, T., Dong, W., Mani, N., Toki, M., Mejías, L., et al. (2019). Expression Analysis and Significance of PD-1, LAG-3, and TIM-3 in Human Non-Small Cell Lung Cancer Using Spatially Resolved and Multiparametric Single-Cell Analysis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *25*, 4663–4673. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4142>.
271. Woo, S., Turnis, M., Goldberg, M., Bankoti, J., Selby, M., Nirschl, C., Bettini, M., Gravano, D., Vogel, P., Liu, C., et al. (2012). Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res.* *72*, 917–927. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1620>.
272. Ribas, A., Shin, D., Zaretsky, J., Frederiksen, J., Cornish, A., Avramis, E., Seja, E., Kivork, C., Siebert, J., Kaplan-Lefko, P., et al. (2016). PD-1 Blockade Expands Intratumoral Memory T Cells. *Cancer Immunol. Res.* *4*, 194–203. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0210>.
273. Hinshaw, D., and Shevde, L. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* *79*, 4557–4566. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>.
274. McAllister, S., and Weinberg, R. (2014). The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat. Cell Biol.* *16*, 717–727. <https://doi.org/10.1038/ncb3015>.
275. Engels, E., Biggar, R., Hall, H., Cross, H., Crutchfield, A., Finch, J., Grigg, R., Hylton, T., Pawlish, K., McNeel, T., et al. (2008). Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. *Int. J. Cancer* *123*, 187–194. <https://doi.org/10.1002/ijc.23487>.
276. Deeks, S., Overbaugh, J., Phillips, A., and Buchbinder, S. (2015). HIV infection. *Nat. Rev. Dis. Primer* *1*, 15035. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.35>.
277. Joyce, J., and Fearon, D. (2015). T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* *348*, 74–80. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6204>.
278. Dunn, G., Bruce, A., Ikeda, H., Old, L., and Schreiber, R. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* *3*, 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>.
279. Kunimasa, K., and Goto, T. (2020). Immunosurveillance and Immunoediting of Lung Cancer: Current Perspectives and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* *21*. <https://doi.org/10.3390/ijms21020597>.

BIBLIOGRAPHIE

280. Klemm, F., Maas, R., Bowman, R., Kornete, M., Soukup, K., Nassiri, S., Broul, JP, Iacobuzio-Donahue, C., Brennan, C., et al. (2020). Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells. *Cell* *181*, 1643-1660.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.007>.
281. Pan, D., and Jia, D. (2021). Application of Single-Cell Multi-Omics in Dissecting Cancer Cell Plasticity and Tumor Heterogeneity. *Front. Mol. Biosci.* *8*, 757024. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.757024>.
282. Schneider, G., Schmidt-Supprian, M., Rad, R., and Saur, D. (2017). Tissue-specific tumorigenesis: context matters. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 239–253. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.5>.
283. Chen, X., and Song, E. (2019). Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Drug Discov.* *18*, 99–115. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0004-1>.
284. Boyle, S., Johan, M., and Samuel, M. (2020). Tumour-directed microenvironment remodelling at a glance. *J. Cell Sci.* *133*. <https://doi.org/10.1242/jcs.247783>.
285. Aoto, K., Ito, K., and Aoki, S. (2018). Complex formation between platelet-derived growth factor receptor β and transforming growth factor β receptor regulates the differentiation of mesenchymal stem cells into cancer-associated fibroblasts. *Oncotarget* *9*, 34090–34102. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26124>.
286. Strong, A., Pei, D., Hurst, C., Gimble, J., Burow, M., and Bunnell, B. (2017). Obesity Enhances the Conversion of Adipose-Derived Stromal/Stem Cells into Carcinoma-Associated Fibroblast Leading to Cancer Cell Proliferation and Progression to an Invasive Phenotype. *Stem Cells Int.* *2017*, 9216502. <https://doi.org/10.1155/2017/9216502>.
287. Kieffer, Y., Hocine, H., Gentric, G., Pelon, F., Bernard, C., Bourachot, B., Lameiras, S., Albergante, L., Bonneau, C., Guyard, A., et al. (2020). Single-Cell Analysis Reveals Fibroblast Clusters Linked to Immunotherapy Resistance in Cancer. *Cancer Discov.* *10*, 1330–1351. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1384>.
288. Najafi, M., Farhood, B., and Mortezaee, K. (2019). Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *J. Cell. Biochem.* *120*, 2782–2790. <https://doi.org/10.1002/jcb.27681>.
289. Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 582–598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>.
290. Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D., Egeblad, M., Evans, R., Fearon, D., Greten, F., Hingorani, S., Hunter, T., et al. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Cancer* *20*, 174–186. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>.
291. Mao, X., Xu, J., Wang, W., Liang, C., Hua, J., Liu, J., Zhang, B., Meng, Q., Yu, X., and Shi, S. (2021). Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol. Cancer* *20*, 131. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01428-1>.
292. Wong, K., Cheung, A., Chen, B., Chan, W., Yu, J., Lo, K., Kang, W., and To, K. (2022). Cancer-associated fibroblasts in nonsmall cell lung cancer: From molecular mechanisms to clinical implications. *Int. J. Cancer* *151*, 1195–1215. <https://doi.org/10.1002/ijc.34127>.
293. Cords, L., Engler, S., Haberecker, M., Rüschoff, J., Moch, H., de, N., Souza, and Bodenmiller, B. (2024). Cancer-associated fibroblast phenotypes are associated with patient outcome in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell* *42*, 396-412.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.12.021>.
294. Ferl, -McCullough, D., Slater, S., Richard, J., Reni, C., and Mangialardi, G. (2017). Pericytes, an overlooked player in vascular pathobiology. *Pharmacol. Ther.* *171*, 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.11.008>.
295. Meng, M., Zaorsky, N., Deng, L., Wang, H., Chao, J., Zhao, L., Yuan, Z., and Ping, W. (2015). Pericytes: a double-edged sword in cancer therapy. *Future Oncol. Lond. Engl.* *11*, 169–179. <https://doi.org/10.2217/fon.14.123>.
296. Jiang, Z., Zhou, J., Li, L., Liao, S., He, J., Zhou, S., and Zhou, Y. (2023). Pericytes in the tumor microenvironment. *Cancer Lett.* *556*, 216074. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216074>.

BIBLIOGRAPHIE

297. Voloshenyuk, T., L, esman, E., Khoutorova, E., Hart, A., and Gardner, J. (2011). Induction of cardiac fibroblast lysyl oxidase by TGF- β 1 requires PI3K/Akt, Smad3, and MAPK signaling. *Cytokine* 55, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.03.024>.
298. Gopal, S., Veracini, L., Grall, D., Butori, C., Schaub, S., Audebert, S., Camoin, L., Baudelet, E., Radwanska, A., Beghelli-de, S., la, Forest, Divonne, et al. (2017). Fibronectin-guided migration of carcinoma collectives. *Nat. Commun.* 8, 14105. <https://doi.org/10.1038/ncomms14105>.
299. Timaner, M., Tsai, K., and Shaked, Y. (2020). The multifaceted role of mesenchymal stem cells in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 60, 225–237. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.003>.
300. He, Y., Liu, T., Dai, S., Xu, Z., Wang, L., and Luo, F. (2021). Tumor-Associated Extracellular Matrix: How to Be a Potential Aide to Anti-tumor Immunotherapy? *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 739161. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.739161>.
301. Miyazawa, A., Ito, S., Asano, S., Tanaka, I., Sato, M., Kondo, M., and Hasegawa, Y. (2018). Regulation of PD-L1 expression by matrix stiffness in lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 2344–2349. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.115>.
302. Mennens, S., Bolomini-Vittori, M., Weiden, J., Joosten, B., Cambi, A., and van, K., den, Dries (2017). Substrate stiffness influences phenotype and function of human antigen-presenting dendritic cells. *Sci. Rep.* 7, 17511. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17787-z>.
303. Kortlever, R., Sodir, N., Wilson, C., Burkhart, D., Pellegrinet, L., Brown, L., Swigart, Littlewood, T., and Evan, G. (2017). Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. *Cell* 171, 1301-1315.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.013>.
304. van, G., Niel, Carter, D., Clayton, A., Lambert, D., Raposo, G., and Vader, P. (2022). Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 369–382. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00460-3>.
305. Lucotti, S., Kenific, C., Zhang, H., and Lyden, D. (2022). Extracellular vesicles and particles impact the systemic landscape of cancer. *EMBO J.* 41, e109288. <https://doi.org/10.15252/embj.2021109288>.
306. Teng, F., and Fussenegger, M. (2020). Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Adv. Sci. Weinh. Baden-Wurtt. Ger.* 8, 2003505. <https://doi.org/10.1002/adv.202003505>.
307. Théry, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol. Rep.* 3, 15. <https://doi.org/10.3410/B3-15>.
308. Vignard, V., Labbé, M., Marec, N., André-Grégoire, G., Jou, N, Fonteneau, J., Labarrière, N., and Fradin, D. (2020). MicroRNAs in Tumor Exosomes Drive Immune Escape in Melanoma. *Cancer Immunol. Res.* 8, 255–267. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0522>.
309. Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., et al. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* 18, 883–891. <https://doi.org/10.1038/nm.2753>.
310. Chen, G., Huang, A., Zhang, W., Zhang, G., Wu, M., Xu, W., Yu, Z., Yang, J., Wang, B., Sun, H., et al. (2018). Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 560, 382–386. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0392-8>.
311. Poggio, M., Hu, T., Pai, C., Chu, B., Belair, C., Chang, A., Montabana, E., Lang, U., Fu, Q., Fong, L., et al. (2019). Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. *Cell* 177, 414-427.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.016>.
312. Webber, J., Steadman, R., Mason, M., Tabi, Z., and Clayton, A. (2010). Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res.* 70, 9621–9630. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1722>.

BIBLIOGRAPHIE

313. Chen, C., Luo, Y., He, W., Zhao, Y., Kong, Y., Liu, H., Zhong, G., Li, Y., Li, J., Huang, J., et al. (2020). Exosomal long noncoding RNA LNMAT2 promotes lymphatic metastasis in bladder cancer. *J. Clin. Invest.* *130*, 404–421. <https://doi.org/10.1172/JCI130892>.
314. Vetsika, E., Sharma, P., Samaras, I., Markou, A., Georgoulas, V., Whiteside, T., and Kotsakis, A. (2021). Small Extracellular Vesicles in Pre-Therapy Plasma Predict Clinical Outcome in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Cancers* *13*. <https://doi.org/10.3390/cancers13092041>.
315. Brocco, D., Lanuti, P., Pieragostino, D., Cufaro, M., Simeone, P., Bologna, G., Di, P., Marino, De, M., Tursi, Grassadonia, A., Irtelli, L., et al. (2021). Phenotypic and Proteomic Analysis Identifies Hallmarks of Blood Circulating Extracellular Vesicles in NSCLC Responders to Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancers* *13*. <https://doi.org/10.3390/cancers13040585>.
316. El, D., Safadi, Mokhtari, A., Krejbich, M., Lagrave, A., Hirigoyen, U., Lebeau, G., Viranaicken, W., and Krejbich-Trotot, P. (2024). Exosome-Mediated Antigen Delivery: Unveiling Novel Strategies in Viral Infection Control and Vaccine Design. *Vaccines* *12*. <https://doi.org/10.3390/vaccines12030280>.
317. Hernandez, C., Huebener, P., and Schwabe, R. (2016). Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene* *35*, 5931–5941. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.104>.
318. Aloe, C., Wang, H., Vlahos, R., Irving, L., Steinfort, D., and Bozinovski, S. (2021). Emerging and multifaceted role of neutrophils in lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* *10*, 2806–2818. <https://doi.org/10.21037/tlcr-20-760>.
319. Grard, M., Chatelain, C., Delaunay, T., Pons-Tostivint, E., Bennouna, J., and Fonteneau, J. (2021). Homozygous Co-Deletion of Type I Interferons and CDKN2A Genes in Thoracic Cancers: Potential Consequences for Therapy. *Front. Oncol.* *11*, 695770. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.695770>.
320. Siemińska, I., Poljańska, E., and Baran, J. (2021). Granulocytes and Cells of Granulocyte Origin-The Relevant Players in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* *22*. <https://doi.org/10.3390/ijms22073801>.
321. Veglia, F., Sanseviero, E., and Gabilovich, D. (2021). Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* *21*, 485–498. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00490-y>.
322. Goudot, C., Coillard, A., Villani, A., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., Tang-Huau, T., Bohec, M., Baul, e, S., et al. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity* *47*, 582–596.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.016>.
323. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* *23*, 549–555. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)02302-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02302-5).
324. Kloosterman, D., and Akkari, L. (2023). Macrophages at the interface of the co-evolving cancer ecosystem. *Cell* *186*, 1627–1651. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.020>.
325. Güç, E., and Pollard, J. (2021). Redefining macrophage and neutrophil biology in the metastatic cascade. *Immunity* *54*, 885–902. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.022>.
326. Pittet, M., Michielin, O., and Migliorini, D. (2022). Clinical relevance of tumour-associated macrophages. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *19*, 402–421. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00620-6>.
327. Bejarano, L., Jordão, M., and Joyce, J. (2021). Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov.* *11*, 933–959. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1808>.
328. Salvagno, C., Ciampricotti, M., Tuit, S., Hau, C., van, A., Weverwijk, Coffelt, S., Kersten, K., Vrijl, K, Kos, K., et al. (2019). Therapeutic targeting of macrophages enhances chemotherapy efficacy by unleashing type I interferon response. *Nat. Cell Biol.* *21*, 511–521. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0298-1>.
329. Zhu, Y., Knolhoff, B., Meyer, M., Nywening, T., West, B., Luo, J., Wang-Gillam, A., Goedegebuure, S., Linehan, D., and DeNardo, D. (2014). CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and

BIBLIOGRAPHIE

- improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res.* *74*, 5057–5069. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3723>.
330. Chen, Y., Song, Y., Du, W., Gong, L., Chang, H., and Zou, Z. (2019). Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J. Biomed. Sci.* *26*, 78. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0568-z>.
331. Mantovani, A., Allavena, P., Marchesi, F., Garl, and a, C. (2022). Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *21*, 799–820. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00520-5>.
332. Propper, D., and Balkwill, F. (2022). Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *19*, 237–253. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00588-9>.
333. Chávez-Galán, L., Olleros, M., Vesin, D., and Garcia, I. (2015). Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages. *Front. Immunol.* *6*, 263. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00263>.
334. Cheng, S., Li, Z., Gao, R., Xing, B., Gao, Y., Yang, Y., Qin, S., Zhang, L., Ouyang, H., Du, P., et al. (2021). A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells. *Cell* *184*, 792-809.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.010>.
335. Mulder, K., Patel, A., Kong, W., Piot, C., Halitzki, E., Dunsmore, G., Khalilnezhad, S., Irac, S., Dubuisson, A., Chevrier, M., et al. (2021). Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity* *54*, 1883-1900.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.007>.
336. Zilionis, R., Engblom, C., Pfirschke, C., Savova, V., Zemmour, D., Saatcioglu, H., Krishnan, I., Maroni, G., Meyerovitz, C., Kerwin, C., et al. (2019). Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity* *50*, 1317-1334.e10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.009>.
337. De, M., Palma, Venneri, M., Galli, R., Sergi, L., Sergi, Politi, L., Sampaolesi, M., and Naldini, L. (2005). Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* *8*, 211–226. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.002>.
338. Pucci, F., Venneri, M., Biziato, D., Nonis, A., Moi, D., Sica, A., Di, C., Serio, Naldini, L., and De, M., Palma (2009). A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood resident monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships. *Blood* *114*, 901–914. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-200931>.
339. Coffelt, S., Chen, Y., Muthana, M., Welford, A., Tal, A., Scholz, A., Plate, K., Reiss, Y., Murdoch, C., De, M., Palma, et al. (2011). Angiopoietin 2 stimulates TIE2-expressing monocytes to suppress T cell activation and to promote regulatory T cell expansion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 4183–4190. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002802>.
340. Anstee, J., Feehan, K., Opzoomer, J., Dean, I., Muller, H., Bahri, M., Cheung, T., Liakath-Ali, K., Liu, Z., Choy, D., et al. (2023). LYVE-1(+) macrophages form a collaborative CCR5-dependent perivascular niche that influences chemotherapy responses in murine breast cancer. *Dev. Cell* *58*, 1548-1561.e10. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.06.006>.
341. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* *25*, 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>.
342. Colin, S., Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2014). Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol. Rev.* *262*, 153–166. <https://doi.org/10.1111/imr.12218>.
343. Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* *233*, 6425–6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>.
344. Chéné, A., d’Almeida, S., Blondy, T., Tabiasco, J., Deshayes, S., Fonteneau, J., Cellerin, L., Delneste, Y., Grégoire, M., and Blanquart, C. (2016). Pleural Effusions from Patients with Mesothelioma Induce

BIBLIOGRAPHIE

- Recruitment of Monocytes and Their Differentiation into M2 Macrophages. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 11, 1765–1773. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.06.022>.
345. Blondy, T., d'Almeida, S., Briolay, T., Tabiasco, J., Meiller, C., Chéné, A., Cellierin, L., Deshayes, S., Delneste, Y., Fonteneau, J., et al. (2020). Involvement of the M-CSF/IL-34/CSF-1R pathway in malignant pleural mesothelioma. *J. Immunother. Cancer* 8. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000182>.
346. Cheng, S., Li, Z., Gao, R., Xing, B., Gao, Y., Yang, Y., Qin, S., Zhang, L., Ouyang, H., Du, P., et al. (2021). A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells. *Cell* 184, 792–809.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.010>.
347. Mulder, K., Patel, A., Kong, W., Piot, C., Halitzki, E., Dunsmore, G., Khalilnezhad, S., Irac, S., Dubuisson, A., Chevrier, M., et al. (2021). Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity* 54, 1883–1900.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.007>.
348. Ma, R., Black, A., and Qian, B. (2022). Macrophage diversity in cancer revisited in the era of single-cell omics. *Trends Immunol.* 43, 546–563. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.04.008>.
349. Loyher, P., Hamon, P., Laviron, M., Meghraoui-Kheddar, A., Goncalves, E., Deng, Z., Torstensson, S., Bercovici, N., Baudesson, C., de Chanville, Combadière, B., et al. (2018). Macrophages of distinct origins contribute to tumor development in the lung. *J. Exp. Med.* 215, 2536–2553. <https://doi.org/10.1084/jem.20180534>.
350. Almatroodi, S., McDonald, C., and Pouniotis, D. (2014). Alveolar Macrophage Polarisation in Lung Cancer. *Lung Cancer Int.* 2014, 721087. <https://doi.org/10.1155/2014/721087>.
351. Pouniotis, D., Plebanski, M., Apostolopoulos, V., and McDonald, C. (2006). Alveolar macrophage function is altered in patients with lung cancer. *Clin. Exp. Immunol.* 143, 363–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.02998.x>.
352. Casanova-Acebes, M., Dalla, E., Leader, A., LeBerichel, J., Nikolic, J., Morales, B., Brown, M., Chang, C., Troncoso, L., Chen, S., et al. (2021). Tissue-resident macrophages provide a pro-tumorigenic niche to early NSCLC cells. *Nature* 595, 578–584. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03651-8>.
353. Fu, Y., Pajulas, A., Wang, J., Zhou, B., Cannon, A., Cheung, C., Zhang, J., Zhou, H., Fisher, A., Omstead, D., et al. (2022). Mouse pulmonary interstitial macrophages mediate the pro-tumorigenic effects of IL-9. *Nat. Commun.* 13, 3811. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31596-7>.
354. Bates, G., Fox, S., Han, C., Leek, R., Garcia, J., Harris, A., and Banham, A. (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 5373–5380. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.05.9584>.
355. Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960–1964. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>.
356. Al-Shibli, K., Donnem, T., Al-Saad, S., Persson, M., Bremnes, R., and Busund, L. (2008). Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 5220–5227. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0133>.
357. Katakai, A., Scheid, P., Piet, M., Marie, B., Martinet, N., Martinet, Y., and Vignaud, J. (2002). Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression. *J. Lab. Clin. Med.* 140, 320–328. <https://doi.org/10.1067/mlc.2002.128317>.
358. Demaria, O., Cornen, S., Daëron, M., Morel, Y., Medzhitov, R., and Vivier, E. (2019). Harnessing innate immunity in cancer therapy. *Nature* 574, 45–56. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1593-5>.
359. Reeves, E., and James, E. (2017). Antigen processing and immune regulation in the response to tumours. *Immunology* 150, 16–24. <https://doi.org/10.1111/imm.12675>.
360. Kloosterman, D., and Akkari, L. (2023). Macrophages at the interface of the co-evolving cancer ecosystem. *Cell* 186, 1627–1651. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.020>.

BIBLIOGRAPHIE

361. Brightman, S., Naradikian, M., Miller, A., and Schoenberger, S. (2020). Harnessing neoantigen specific CD4 T cells for cancer immunotherapy. *J. Leukoc. Biol.* *107*, 625–633. <https://doi.org/10.1002/JLB.5RI0220-603RR>.
362. Yuen, G., Demissie, E., and Pillai, S. (2016). B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends Cancer* *2*, 747–757. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.10.010>.
363. van, A., Weverwijk, and de, K., Visser (2023). Mechanisms driving the immunoregulatory function of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* *23*, 193–215. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00544-4>.
364. Tang, S., Ning, Q., Yang, L., Mo, Z., and Tang, S. (2020). Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle. *Int. Immunopharmacol.* *86*, 106700. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106700>.
365. Zitvogel, L., Tesniere, A., and Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 715–727. <https://doi.org/10.1038/nri1936>.
366. Shah, R., Ibis, B., Kashyap, M., and Boussiotis, V. (2024). The role of ROS in tumor infiltrating immune cells and cancer immunotherapy. *Metabolism.* *151*, 155747. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2023.155747>.
367. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C., and Hafler, D. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 490–500. <https://doi.org/10.1038/nri2785>.
368. Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S. (2008). Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 10113–10118. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711106105>.
369. Kobie, J., Shah, P., Yang, L., Rebhahn, J., Fowell, D., and Mosmann, T. (2006). T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J. Immunol. Baltim. Md* *177*, 6780–6786. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.6780>.
370. Grossman, W., Verbsky, J., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J., and Ley, T. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* *21*, 589–601. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.09.002>.
371. Qureshi, O., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E., Baker, J., Jeffery, L., Kaur, S., Briggs, Z., et al. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* *332*, 600–603. <https://doi.org/10.1126/science.1202947>.
372. Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J., and Gögenur, I. (2021). Cytotoxic CD8(+) T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br. J. Cancer* *124*, 359–367. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01048-4>.
373. Peterson, C., Denlinger, N., and Yang, Y. (2022). Recent Advances and Challenges in Cancer Immunotherapy. *Cancers* *14*. <https://doi.org/10.3390/cancers14163972>.
374. Lin, Q., Choyke, P., and Sato, N. (2023). Visualizing vasculature and its response to therapy in the tumor microenvironment. *Theranostics* *13*, 5223–5246. <https://doi.org/10.7150/thno.84947>.
375. Heldin, C., Rubin, K., Pietras, K., and Ostman, A. (2004). High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 806–813. <https://doi.org/10.1038/nrc1456>.
376. Perrot, C., Herrera, J., Fournier-Goss, A., and Komatsu, M. (2020). Prostaglandin E2 breaks down pericyte-endothelial cell interaction via EP1 and EP4-dependent downregulation of pericyte N-cadherin, connexin-43, and R-Ras. *Sci. Rep.* *10*, 11186. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68019-w>.
377. Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* *285*, 1182–1186. <https://doi.org/10.1056/NEJM197111182852108>.
378. Folkman, J., Watson, K., Ingber, D., and Hanahan, D. (1989). Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* *339*, 58–61. <https://doi.org/10.1038/339058a0>.

BIBLIOGRAPHIE

379. Sánchez-Chapado, M., Olmedilla, G., Cabeza, M., Donat, E., and Ruiz, A. (2003). Prevalence of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia in Caucasian Mediterranean males: an autopsy study. *The Prostate* 54, 238–247. <https://doi.org/10.1002/pros.10177>.
380. Nielsen, M., Thomsen, J., Primdahl, S., Dyreborg, U., and Andersen, J. (1987). Breast cancer and atypia among young and middle-aged women: a study of 110 medicolegal autopsies. *Br. J. Cancer* 56, 814–819. <https://doi.org/10.1038/bjc.1987.296>.
381. Black, W., and Welch, H. (1993). Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy. *N. Engl. J. Med.* 328, 1237–1243. <https://doi.org/10.1056/NEJM199304293281706>.
382. Naumov, G., Folkman, J., and Straume, O. (2009). Tumor dormancy due to failure of angiogenesis: role of the microenvironment. *Clin. Exp. Metastasis* 26, 51–60. <https://doi.org/10.1007/s10585-008-9176-0>.
383. Dameron, K., Volpert, O., Tainsky, M., and Bouck, N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265, 1582–1584. <https://doi.org/10.1126/science.7521539>.
384. De, M., Palma, Biziato, D., and Petrova, T. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 17, 457–474. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.51>.
385. Liang, W., and Ferrara, N. (2016). The Complex Role of Neutrophils in Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Cancer Immunol. Res.* 4, 83–91. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0313>.
386. Liu, T., Zhou, L., Li, D., Andl, T., and Zhang, Y. (2019). Cancer-Associated Fibroblasts Build and Secure the Tumor Microenvironment. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 60. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00060>.
387. Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., et al. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* 161, 1163–1177. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302047>.
388. Haas, G., Fan, S., Ghadimi, M., De, T., Oliveira, and Conradi, L. (2021). Different Forms of Tumor Vascularization and Their Clinical Implications Focusing on Vessel Co-option in Colorectal Cancer Liver Metastases. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 612774. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.612774>.
389. Qian, C., Tan, M., Yang, J., and Cao, Y. (2016). Revisiting tumor angiogenesis: vessel co-option, vessel remodeling, and cancer cell-derived vasculature formation. *Chin. J. Cancer* 35, 10. <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0070-2>.
390. Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* 126, 3047–3055. <https://doi.org/10.1242/dev.126.14.3047>.
391. Wilting, J., Birkenhäger, R., Eichmann, A., Kurz, H., Martiny-Baron, G., Marmé, D., McCarthy, J., Christ, B., and Weich, H. (1996). VEGF121 induces proliferation of vascular endothelial cells and expression of flk-1 without affecting lymphatic vessels of chorioallantoic membrane. *Dev. Biol.* 176, 76–85. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.9993>.
392. Crivellato, E., Nico, B., Vacca, A., Djonov, V., Presta, M., and Ribatti, D. (2004). Recombinant human erythropoietin induces intussusceptive microvascular growth in vivo. *Leukemia* 18, 331–336. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403246>.
393. Ribatti, D., Nico, B., Floris, C., Mangieri, D., Piras, F., Ennas, M., Vacca, A., and Sirigu, P. (2005). Microvascular density, vascular endothelial growth factor immunoreactivity in tumor cells, vessel diameter and intussusceptive microvascular growth in primary melanoma. *Oncol. Rep.* 14, 81–84.
394. Nico, B., Crivellato, E., Guidolin, D., Annese, T., Longo, V., Finato, N., Vacca, A., and Ribatti, D. (2010). Intussusceptive microvascular growth in human glioma. *Clin. Exp. Med.* 10, 93–98. <https://doi.org/10.1007/s10238-009-0076-7>.

BIBLIOGRAPHIE

395. Patan, S., Munn, L., and Jain, R. (1996). Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.* *51*, 260–272. <https://doi.org/10.1006/mvre.1996.0025>.
396. Djonov, V., Högger, K., Sedlacek, R., Laissue, J., and Draeger, A. (2001). MMP-19: cellular localization of a novel metalloproteinase within normal breast tissue and mammary gland tumours. *J. Pathol.* *195*, 147–155. <https://doi.org/10.1002/path.927>.
397. Pezzella, F., Di, A., Bacco, Andreola, S., Nicholson, A., Pastorino, U., and Harris, A. (1996). Angiogenesis in primary lung cancer and lung secondaries. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *32A*, 2494–2500. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(96\)00377-2](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(96)00377-2).
398. Kuczynski, E., Vermeulen, P., Pezzella, F., Kerbel, R., and Reynolds, A. (2019). Vessel co-option in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *16*, 469–493. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0181-9>.
399. Latacz, E., Caspani, E., Barnhill, R., Lugassy, C., Verhoef, C., Grünhagen, D., Van, S., Laere, Fernández, C., Moro, Gerling, M., Dirix, M., et al. (2020). Pathological features of vessel co-option versus sprouting angiogenesis. *Angiogenesis* *23*, 43–54. <https://doi.org/10.1007/s10456-019-09690-0>.
400. Warth, A., Muley, T., Kossakowski, C., Goeppert, B., Schirmacher, P., Dienemann, H., and Weichert, W. (2015). Prognostic Impact of Intra-alveolar Tumor Spread in Pulmonary Adenocarcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* *39*, 793–801. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000409>.
401. Kadota, K., Nitadori, J., Sima, C., Ujiie, H., Rizk, N., Jones, D., Adusumilli, P., and Travis, W. (2015). Tumor Spread through Air Spaces is an Important Pattern of Invasion and Impacts the Frequency and Location of Recurrences after Limited Resection for Small Stage I Lung Adenocarcinomas. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *10*, 806–814. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000486>.
402. Teuwen, L., De, L., Rooij, Cuypers, A., Rohlenova, K., Dumas, S., García-Caballero, M., Meta, E., Amersfoort, J., Taverna, F., Becker, L., et al. (2021). Tumor vessel co-option probed by single-cell analysis. *Cell Rep.* *35*, 109253. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109253>.
403. Ackermann, M., Werlein, C., Plucinski, E., Leybold, S., Kühnel, M., Verleden, S., Khalil, H., Länger, F., Welte, T., Mentzer, S., et al. (2024). The role of vasculature and angiogenesis in respiratory diseases. *Angiogenesis* *27*, 293–310. <https://doi.org/10.1007/s10456-024-09910-2>.
404. Luo, Q., Wang, J., Zhao, W., Peng, Z., Liu, X., Li, B., Zhang, H., Shan, B., Zhang, C., and Duan, C. (2020). Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications. *J. Hematol. Oncol. J. Hematol Oncol* *13*, 19. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00858-6>.
405. Maniotis, A., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E., Gardner, L., Pe'er, J., Trent, J., Meltzer, P., and Hendrix, M. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am. J. Pathol.* *155*, 739–752. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65173-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65173-5).
406. Treps, L., Faure, S., and Clere, N. (2021). Vasculogenic mimicry, a complex and devious process favoring tumorigenesis - Interest in making it a therapeutic target. *Pharmacol. Ther.* *223*, 107805. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107805>.
407. Sievert, W., Tapio, S., Breuninger, S., Gaip, U., Andratschke, N., Trott, K., and Multhoff, G. (2014). Adhesion molecule expression and function of primary endothelial cells in benign and malignant tissues correlates with proliferation. *PLoS One* *9*, e91808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091808>.
408. Cantelmo, A., Conradi, L., Brajic, A., Goveia, J., Kalucka, J., Pircher, A., Chaturvedi, P., Hol, J., Thienpont, B., Teuwen, L., et al. (2016). Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell* *30*, 968–985. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.006>.
409. Rohlenova, K., Goveia, J., García-Caballero, M., Subramanian, A., Kalucka, J., Treps, L., Falkenberg, K., de, L., Rooij, Zheng, Y., Lin, L., et al. (2020). Single-Cell RNA Sequencing Maps Endothelial Metabolic Plasticity in Pathological Angiogenesis. *Cell Metab.* *31*, 862–877.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.03.009>.

BIBLIOGRAPHIE

410. Lambrechts, D., Wauters, E., Boeckx, B., Aibar, S., Nittner, D., Burton, O., Bassez, A., Decaluwé, H., Pircher, A., Van, K., den, Eynde, et al. (2018). Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. *Nat. Med.* *24*, 1277–1289. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0096-5>.
411. Hida, K., Hida, Y., Amin, D., Flint, A., Panigrahy, D., Morton, C., and Klagsbrun, M. (2004). Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res.* *64*, 8249–8255. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1567>.
412. Deeb, K., Luo, W., Karpf, A., Omilian, A., Bshara, W., Tian, L., Tangrea, M., Morrison, C., Johnson, C., and Trump, D. (2011). Differential vitamin D 24-hydroxylase/CYP24A1 gene promoter methylation in endothelium from benign and malignant human prostate. *Epigenetics* *6*, 994–1000. <https://doi.org/10.4161/epi.6.8.16536>.
413. Maishi, N., and Hida, K. (2017). Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis. *Cancer Sci.* *108*, 1921–1926. <https://doi.org/10.1111/cas.13336>.
414. Gasparics, Á., Rosivall, L., Krizbai, I., and Sebe, A. (2016). When the endothelium scores an own goal: endothelial cells actively augment metastatic extravasation through endothelial-mesenchymal transition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *310*, H1055-63. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00042.2016>.
415. St, B., Croix, Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K., Montgomery, E., Lal, A., Riggins, G., Lengauer, C., Vogelstein, B., et al. (2000). Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* *289*, 1197–1202. <https://doi.org/10.1126/science.289.5482.1197>.
416. Kambayashi, T., and Laufer, T. (2014). Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 719–730. <https://doi.org/10.1038/nri3754>.
417. Dirx, A., Oude, M., Egbrink, Kuijpers, M., van, S., der, Niet, Heijnen, V., Bouma-ter, J., Steege, Wagstaff, J., and Griffioen, A. (2003). Tumor angiogenesis modulates leukocyte-vessel wall interactions in vivo by reducing endothelial adhesion molecule expression. *Cancer Res.* *63*, 2322–2329.
418. Flati, V., Pastore, L., Griffioen, A., Satijn, S., Toniato, E., D’Alimonte, I., Laglia, E., Marchetti, P., Gulino, A., and Martinotti, S. (2006). Endothelial cell anergy is mediated by bFGF through the sustained activation of p38-MAPK and NF-kappaB inhibition. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* *19*, 761–773. <https://doi.org/10.1177/039463200601900406>.
419. Huinen, Z., Huijbers, E., van, J., Beijnum, Nowak-Sliwinska, P., and Griffioen, A. (2021). Anti-angiogenic agents - overcoming tumour endothelial cell anergy and improving immunotherapy outcomes. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *18*, 527–540. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00496-y>.
420. Buckanovich, R., Facciabene, A., Kim, S., Benencia, F., Sasaroli, D., Balint, K., Katsaros, D., O’Brien-Jenkins, A., Gimotty, P., and Coukos, G. (2008). Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat. Med.* *14*, 28–36. <https://doi.org/10.1038/nm1699>.
421. Shetty, S., Weston, C., Oo, Y., Westerlund, N., Stamataki, Z., Youster, J., Hubscher, S., Salmi, M., Jalkanen, S., Lator, P., et al. (2011). Common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1 mediates the transmigration of regulatory T cells across human hepatic sinusoidal endothelium. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 4147–4155. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002961>.
422. Karikoski, M., Marttila-Ichihara, F., Elima, K., Rantakari, P., Hollmén, M., Kelkka, T., Gerke, H., Huovinen, V., Irjala, H., Holmdahl, R., et al. (2014). Clever-1/stabilin-1 controls cancer growth and metastasis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 6452–6464. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1236>.
423. Modiano, J., and Bellgrau, D. (2016). Fas ligand based immunotherapy: A potent and effective neoadjuvant with checkpoint inhibitor properties, or a systemically toxic promoter of tumor growth? *Discov. Med.* *21*, 109–116.
424. Liu, S., Qin, T., Liu, Z., Wang, J., Jia, Y., Feng, Y., Gao, Y., and Li, K. (2020). anlotinib alters tumor immune microenvironment by downregulating PD-L1 expression on vascular endothelial cells. *Cell Death Dis.* *11*, 309. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2511-3>.

BIBLIOGRAPHIE

425. Georganaki, M., Ramacharan, M., Tuit, S., Núñez, N., Karampatzakis, A., Fotaki, G., van, L., Hooren, Huang, H., Lugano, R., et al. (2020). Tumor endothelial cell up-regulation of IDO1 is an immunosuppressive feedback mechanism that reduces the response to CD40-stimulating immunotherapy. *Oncoimmunology* *9*, 1730538. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1730538>.
426. Verhoeven, J., Jacobs, K., Rizzollo, F., Lodi, F., Hua, Y., Poźniak, J., Narayanan, A., Srinivasan, Houbaert, D., Shankar, G., More, S., et al. (2023). Tumor endothelial cell autophagy is a key vascular-immune checkpoint in melanoma. *EMBO Mol. Med.* *15*, e18028. <https://doi.org/10.15252/emmm.202318028>.
427. Nagl, L., Horvath, L., Pircher, A., and Wolf, D. (2020). Tumor Endothelial Cells (TECs) as Potential Immune Directors of the Tumor Microenvironment - New Findings and Future Perspectives. *Front. Cell Dev. Biol.* *8*, 766. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00766>.
428. Martinet, L., Garrido, I., Filleron, T., Le, S., Guellec, Bellard, E., Fournie, J., Rochaix, P., and Girard, J. (2011). Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* *71*, 5678–5687. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0431>.
429. Ley, K., and Kansas, G. (2004). Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 325–335. <https://doi.org/10.1038/nri1351>.
430. Asrir, A., Tardiveau, C., Coudert, J., Laffont, R., Blanchard, L., Bellard, E., Veerman, K., Bettini, S., Lafouresse, F., Vina, E., et al. (2022). Tumor-associated high endothelial venules mediate lymphocyte entry into tumors and predict response to PD-1 plus CTLA-4 combination immunotherapy. *Cancer Cell* *40*, 318-334.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.01.002>.
431. Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., de, L., Chaisemartin, Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M., et al. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res.* *74*, 705–715. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1342>.
432. Johansson-Percival, A., He, B., Li, Z., Kjellén, A., Russell, K., Li, J., Larma, I., and Ganss, R. (2017). De novo induction of intratumoral lymphoid structures and vessel normalization enhances immunotherapy in resistant tumors. *Nat. Immunol.* *18*, 1207–1217. <https://doi.org/10.1038/ni.3836>.
433. Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., et al. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2335–2342. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032691>.
434. Augustin, H., and Koh, G. (2022). Antiangiogenesis: Vessel Regression, Vessel Normalization, or Both? *Cancer Res.* *82*, 15–17. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-3515>.
435. Goel, S., Duda, D., Xu, L., Munn, L., Boucher, Y., Fukumura, D., and Jain, R. (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol. Rev.* *91*, 1071–1121. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2010>.
436. Gabrilovich, D., Chen, H., Girgis, K., Cunningham, H., Meny, G., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* *2*, 1096–1103. <https://doi.org/10.1038/nm1096-1096>.
437. Huinen, Z., Huijbers, E., van, J., Beijnum, Nowak-Sliwinska, P., and Griffioen, A. (2021). Anti-angiogenic agents - overcoming tumour endothelial cell anergy and improving immunotherapy outcomes. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *18*, 527–540. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00496-y>.
438. Khan, K., and Kerbel, R. (2018). Improving immunotherapy outcomes with anti-angiogenic treatments and vice versa. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *15*, 310–324. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.9>.
439. Bourhis, M., Palle, J., Galy-Fauroux, I., and Terme, M. (2021). Direct and Indirect Modulation of T Cells by VEGF-A Counteracted by Anti-Angiogenic Treatment. *Front. Immunol.* *12*, 616837. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.616837>.

BIBLIOGRAPHIE

440. Dirx, A., oude, M., Egbrink, Castermans, K., van, D., der, Schaft, Thijssen, V., Dings, R., Kwee, L., Mayo, K., Wagstaff, J., Bouma-ter, J., Steege, et al. (2006). Anti-angiogenesis therapy can overcome endothelial cell anergy and promote leukocyte-endothelium interactions and infiltration in tumors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 621–630. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4493com>.
441. Hodi, F., Lawrence, D., Lezcano, C., Wu, X., Zhou, J., Sasada, T., Zeng, W., Giobbie-Hurder, A., Atkins, M., Ibrahim, N., et al. (2014). Bevacizumab plus ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol. Res.* 2, 632–642. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0053>.
442. Wu, X., Giobbie-Hurder, A., Liao, X., Lawrence, D., McDermott, D., Zhou, J., Rodig, S., and Hodi, F. (2016). VEGF Neutralization Plus CTLA-4 Blockade Alters Soluble and Cellular Factors Associated with Enhancing Lymphocyte Infiltration and Humoral Recognition in Melanoma. *Cancer Immunol. Res.* 4, 858–868. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0084>.
443. Akbarian, M., Bertassoni, L., and Tayebi, L. (2022). Biological aspects in controlling angiogenesis: current progress. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 79, 349. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04348-5>.
444. Uldry, E., Faes, S., Demartines, N., and Dormond, O. (2017). Fine-Tuning Tumor Endothelial Cells to Selectively Kill Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18071401>.
445. Bouzin, C., Brouet, A., De, J., Vriese, Dewever, J., and Feron, O. (2007). Effects of vascular endothelial growth factor on the lymphocyte-endothelium interactions: identification of caveolin-1 and nitric oxide as control points of endothelial cell anergy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 1505–1511. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.3.1505>.
446. Buckanovich, R., Facciabene, A., Kim, S., Benencia, F., Sasaroli, D., Balint, K., Katsaros, D., O'Brien-Jenkins, A., Gimotty, P., and Coukos, G. (2008). Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat. Med.* 14, 28–36. <https://doi.org/10.1038/nm1699>.
447. Calcinotto, A., Grioni, M., Jachetti, E., Curnis, F., Mondino, A., Parmiani, G., Corti, A., and Bellone, M. (2012). Targeting TNF- α to neoangiogenic vessels enhances lymphocyte infiltration in tumors and increases the therapeutic potential of immunotherapy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 2687–2694. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101877>.
448. Bui-Nguyen, T., Pakala, S., Sirigiri, D., Martin, E., Murad, F., and Kumar, R. (2016). Stimulation of inducible nitric oxide by hepatitis B virus transactivator protein HBx requires MTA1 coregulator. *J. Biol. Chem.* 291, 1198. <https://doi.org/10.1074/jbc.A109.065987>.
449. Nasr, N., Alshehri, A., Wright, T., Shahid, M., Heiner, B., Harman, A., Botting, R., Helbig, K., Beard, M., Suzuki, K., et al. (2017). Mechanism of Interferon-Stimulated Gene Induction in HIV-1-Infected Macrophages. *J. Virol.* 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.00744-17>.
450. Allen, E., Jabouille, A., Rivera, L., Lodewijckx, I., Missiaen, R., Steri, V., Feyen, K., Tawney, J., Hanahan, D., Michael, I., et al. (2017). Combined antiangiogenic and anti-PD-L1 therapy stimulates tumor immunity through HEV formation. *Sci. Transl. Med.* 9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aak9679>.
451. V, S., Stoddard, Dodson, K., Adams, K., and L, D., Watkins (2019). In silico Design of Novel Histone Deacetylase 4 Inhibitors: Design Guidelines for Improved Binding Affinity. *Int. J. Mol. Sci.* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21010219>.
452. He, B., Johansson-Percival, A., Backhouse, J., Li, J., Lee, G., Hamzah, J., and Ganss, R. (2020). Remodeling of Metastatic Vasculature Reduces Lung Colonization and Sensitizes Overt Metastases to Immunotherapy. *Cell Rep.* 30, 714-724.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.013>.
453. Colbeck, E., Jones, E., Hindley, J., Smart, K., Schulz, R., Browne, M., Cutting, S., Williams, A., Parry, L., Godkin, A., et al. (2017). Treg Depletion Licenses T Cell-Driven HEV Neogenesis and Promotes Tumor Destruction. *Cancer Immunol. Res.* 5, 1005–1015. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0131>.
454. Vignard, V., Lemercier, B., Lim, A., P, olfino, M., Guilloux, Y., Khammari, A., Rabu, C., Echasserieau, K., Lang, F., et al. (2005). Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 4797–4805. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4797>.

BIBLIOGRAPHIE

455. Fonteneau, J., Larsson, M., Somersan, S., S, ers, C., Münz, C., Kwok, W., Bhardwaj, N., and Jotereau, F. (2001). Generation of high quantities of viral and tumor-specific human CD4+ and CD8+ T-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells. *J. Immunol. Methods* *258*, 111–126. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(01\)00477-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(01)00477-x).
456. Schindelin, J., Arg, a-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* *9*, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
457. Carpentier, G., Berndt, S., Ferratge, S., Rasb, W., Cuendet, M., Uzan, G., and Albanese, P. (2020). Angiogenesis Analyzer for ImageJ - A comparative morphometric analysis of Endothelial Tube Formation Assay and Fibrin Bead Assay. *Sci. Rep.* *10*, 11568. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67289-8>.
458. Labbé, M., Menoret, E., Letourneur, F., Saint-Pierre, B., de, L., Beaurepaire, Veziers, J., Dreno, B., Denis, M., Blanquart, C., Boisgerault, N., et al. (2023). TP53 mutations correlate with the non-coding RNA content of small extracellular vesicles in melanoma. *J. Extracell. Biol.* *2*, e105. <https://doi.org/10.1002/jex2.105>.
459. Sievert, W., Tapio, S., Breuninger, S., Gaip, U., Andratschke, N., Trott, K., and Multhoff, G. (2014). Adhesion molecule expression and function of primary endothelial cells in benign and malignant tissues correlates with proliferation. *PLoS One* *9*, e91808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091808>.
460. Lopatina, T., Favaro, E., Danilova, L., Fertig, E., Favorov, A., Kagohara, L., Martone, T., Bussolati, B., Romagnoli, R., Albera, R., et al. (2020). Extracellular Vesicles Released by Tumor Endothelial Cells Spread Immunosuppressive and Transforming Signals Through Various Recipient Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* *8*, 698. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00698>.
461. Witwer, K., Goberdhan, D., O'Driscoll, L., Théry, C., Welsh, J., Blenkiron, C., Buzás, E., Di, D., Vizio, Erdbrügger, U., Falcón-Pérez, J., et al. (2021). Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* *10*, e12182. <https://doi.org/10.1002/jev2.12182>.
462. Roulois, D., Vignard, V., Gueugnon, F., Labarrière, N., Grégoire, M., and Fonteneau, J. (2011). Recognition of pleural mesothelioma by mucin-1(950-958)/human leukocyte antigen A*0201-specific CD8+ T-cells. *Eur. Respir. J.* *38*, 1117–1126. <https://doi.org/10.1183/09031936.00160210>.
463. Skog, J., Würdinger, T., van, S., Rijn, Meijer, D., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, J., WT, Carter, B., Krichevsky, A., and Breakefield, X. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1470–1476. <https://doi.org/10.1038/ncb1800>.
464. Deregibus, M., Cantaluppi, V., Calogero, R., Lo, M., Iacono, Tetta, C., Biancone, L., Bruno, S., Bussolati, B., and Camussi, G. (2007). Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* *110*, 2440–2448. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-078709>.
465. Kalucka, J., de, L., Rooij, Goveia, J., Rohlenova, K., Dumas, S., Meta, E., Conchinha, N., Taverna, F., Teuwen, L., Veys, K., et al. (2020). Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. *Cell* *180*, 764-779.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.015>.
466. Goveia, J., Rohlenova, K., Taverna, F., Treps, L., Conradi, L., Pircher, A., Geldhof, V., de, L., Rooij, Kalucka, J., Sokol, L., et al. (2020). An Integrated Gene Expression Landscape Profiling Approach to Identify Lung Tumor Endothelial Cell Heterogeneity and Angiogenic Candidates. *Cancer Cell* *37*, 21-36.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.12.001>.
467. Dudley, A., Khan, Z., Shih, S., Kang, S., Zwaans, B., Bischoff, J., and Klagsbrun, M. (2008). Calcification of multipotent prostate tumor endothelium. *Cancer Cell* *14*, 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.06.017>.
468. Potenta, S., Zeisberg, E., and Kalluri, R. (2008). The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br. J. Cancer* *99*, 1375–1379. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604662>.
469. Piera-Velazquez, S., Mendoza, F., and Jimenez, S. (2016). Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases. *J. Clin. Med.* *5*. <https://doi.org/10.3390/jcm5040045>.

BIBLIOGRAPHIE

470. Thannickal, V., Henke, C., Horowitz, J., Noble, P., Roman, J., Sime, P., Zhou, Y., Wells, R., White, E., and Tschumperlin, D. (2014). Matrix biology of idiopathic pulmonary fibrosis: a workshop report of the national heart, lung, and blood institute. *Am. J. Pathol.* *184*, 1643–1651. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.02.003>.
471. Ursoli, F., Ferreira, Eduardo, L., Botelho, Souza, Hassibe, C., Thomé, Tomazini, M., Pinto, Origassa, C., Salustiano, S., Marcel, V., Faça, Olsen, N., Câmara, Kashima, S., and Tadeu, D., Covas (2019). Endothelial Cells Tissue-Specific Origins Affects Their Responsiveness to TGF- β 2 during Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Int. J. Mol. Sci.* *20*. <https://doi.org/10.3390/ijms20030458>.
472. Benadjaoud, M., Soysouvanh, F., Tarlet, G., Paget, V., Buard, V., Santos, H., de, Andrade, Morilla, I., Dos, M., Santos, Bertho, A., l'Homme, B., et al. (2022). Deciphering the Dynamic Molecular Program of Radiation-Induced Endothelial Senescence. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *112*, 975–985. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2021.11.019>.
473. Chen, W., Zhuang, X., Qi, R., and Qiao, T. (2019). MiR-302a-5p suppresses cell proliferation and invasion in non-small cell lung carcinoma by targeting ITGA6. *Am. J. Transl. Res.* *11*, 4348–4357.
474. Chen, W., Zhuang, X., Qi, R., and Qiao, T. (2019). MiR-302a-5p suppresses cell proliferation and invasion in non-small cell lung carcinoma by targeting ITGA6. *Am. J. Transl. Res.* *11*, 4348–4357.
475. Kim, H., Yoon, J., Baek, G., Yoon, M., Han, J., Cho, H., Kim, S., Jeong, J., Cheong, J., and Eun, J. (2023). Tumor Endothelial Cells-Associated Integrin Alpha-6 as a Promising Biomarker for Early Detection and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* *15*. <https://doi.org/10.3390/cancers15164156>.
476. Veronese, A., Visone, R., Consiglio, J., Acunzo, M., Lupini, L., Kim, T., Ferracin, M., Lovat, F., Miotto, E., Balatti, V., et al. (2011). Mutated beta-catenin evades a microRNA-dependent regulatory loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4840–4845. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101734108>.
477. Lupini, L., Pepe, F., Ferracin, M., Braconi, C., Callegari, E., Pagotto, S., Spizzo, R., Zagatti, B., Lanuti, P., Fornari, F., et al. (2016). Over-expression of the miR-483-3p overcomes the miR-145/TP53 pro-apoptotic loop in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* *7*, 31361–31371. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8913>.
478. Rostami, F., Tavakol, Z., Hamedani, Sadoughi, A., Mehrabadi, M., and Kouhkan, F. (2024). PDL1 targeting by miR-138-5p amplifies anti-tumor immunity and Jurkat cells survival in non-small cell lung cancer. *Sci. Rep.* *14*, 13542. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62064-5>.
479. Flati, V., Pastore, L., Griffioen, A., Satijn, S., Toniato, E., D'Alimonte, I., Laglia, E., Marchetti, P., Gulino, A., and Martinotti, S. (2006). Endothelial cell anergy is mediated by bFGF through the sustained activation of p38-MAPK and NF-kappaB inhibition. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* *19*, 761–773. <https://doi.org/10.1177/039463200601900406>.
480. Choi, E., Chavakis, E., Czabanka, M., Langer, H., Fraemohs, L., Economopoulou, M., Kundu, R., Orl, i, A., Zheng, Y., et al. (2008). Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment. *Science* *322*, 1101–1104. <https://doi.org/10.1126/science.1165218>.
481. Béchar, D., Scherpereel, A., Hammad, H., Gentina, T., Tscopoulos, A., Aumercier, M., Pestel, J., Dessaint, J., Tonnel, A., and Lassalle, P. (2001). Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *167*, 3099–3106. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.6.3099>.
482. Cl, P., J, N., A, P., and N, A. (2011). Human brain endothelial cells endeavor to immunoregulate CD8 T cells via PD-1 ligand expression in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation* *8*. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-155>.
483. Rodig, N., Ryan, T., Allen, J.A., Pang, H., Grabie, N., Chernova, T., Greenfield, E.A., Liang, S.C., Sharpe, A.H., Lichtman, A.H., et al. (2003). Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* *33*, 3117–3126. <https://doi.org/10.1002/eji.200324270>.
484. Pittet, C.L., Newcombe, J., Prat, A., and Arbour, N. (2011). Human brain endothelial cells endeavor to immunoregulate CD8 T cells via PD-1 ligand expression in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation* *8*, 155. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-155>.

BIBLIOGRAPHIE

485. Taguchi, K., Onoe, T., Yoshida, T., Yamashita, Y., Tanaka, Y., and Ohdan, H. (2020). Tumor Endothelial Cell-Mediated Antigen-Specific T-cell Suppression via the PD-1/PD-L1 Pathway. *Mol. Cancer Res. MCR* *18*, 1427–1440. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0897>.
486. Chen, W.-J., Hu, X.-F., Yan, M., Zhang, W.-Y., Mao, X.-B., and Shu, Y.-W. (2016). Human umbilical vein endothelial cells promote the inhibitory activation of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells via PD-L1. *Atherosclerosis* *244*, 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.002>.
487. Motz, G., Santoro, S., Wang, L., Garrabrant, T., Lastra, R., Hagemann, I., Lal, P., Feldman, M., Benencia, F., and Coukos, G. (2014). Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat. Med.* *20*, 607–615. <https://doi.org/10.1038/nm.3541>.
488. Burridge, K., and Friedman, M. (2010). Environment and vascular bed origin influence differences in endothelial transcriptional profiles of coronary and iliac arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *299*, H837-46. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00002.2010>.
489. Lacorre, D., Baekkevold, E., Garrido, I., Br, tzaeg, P., Haraldsen, G., Amalric, F., and Girard, J. (2004). Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. *Blood* *103*, 4164–4172. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3537>.
490. Koni, M., Lopatina, T., Grange, C., Sarcinella, A., Cedrino, M., Bruno, S., Buffolo, F., Femminò, S., Camussi, G., and Brizzi, M. (2023). Circulating extracellular vesicles derived from tumor endothelial cells hijack the local and systemic anti-tumor immune response: Role of mTOR/G-CSF pathway. *Pharmacol. Res.* *195*, 106871. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106871>.
491. Lopatina, T., Koni, M., Grange, C., Cedrino, M., Femminò, S., Lombardo, G., Favaro, E., and Brizzi, M. (2022). IL-3 signalling in the tumour microenvironment shapes the immune response via tumour endothelial cell-derived extracellular vesicles. *Pharmacol. Res.* *179*, 106206. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106206>.
492. Ribatti, D. (2016). The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech. Dev.* *141*, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2016.05.003>.
493. Gómez, E., Chirino, Y., Delgado-Buenrostro, N., López-Saavedra, A., Meraz-Cruz, N., and López-Marure, R. (2016). Secretome derived from breast tumor cell lines alters the morphology of human umbilical vein endothelial cells. *Mol. Membr. Biol.* *33*, 29–37. <https://doi.org/10.1080/09687688.2016.1229057>.
494. Njock, M., O’Grady, T., Nivelles, O., Lion, M., Jacques, S., Cambier, M., Herkenne, S., Muller, F., Christian, A., Remacle, C., et al. (2022). Endothelial extracellular vesicles promote tumour growth by tumour-associated macrophage reprogramming. *J. Extracell. Vesicles* *11*, e12228. <https://doi.org/10.1002/jev2.12228>.
495. Benlalam, H., Jalil, A., Hasmim, M., Pang, B., Tamouza, R., Mitterr, M, Godet, Y., Lamerant, N., Robert, C., et al. (2009). Gap junction communication between autologous endothelial and tumor cells induce cross-recognition and elimination by specific CTL. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 2654–2664. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0800815>.
496. Weinberg, A., Rivera, M., Prell, R., Morris, A., Ramstad, T., Vetto, J., Urba, W., Alvord, G., Bunce, C., and Shields, J. (2000). Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 2160–2169. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.2160>.
497. Linch, S., McNamara, M., and Redmond, W. (2015). OX40 Agonists and Combination Immunotherapy: Putting the Pedal to the Metal. *Front. Oncol.* *5*, 34. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00034>.
498. Croft, M., So, T., Duan, W., and Soroosh, P. (2009). The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol. Rev.* *229*, 173–191. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00766.x>.
499. Soroosh, P., Ine, S., Sugamura, K., and Ishii, N. (2007). Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 5014–5023. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5014>.

BIBLIOGRAPHIE

500. Soroosh, P., Ine, S., Sugamura, K., and Ishii, N. (2007). Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4⁺ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 5014–5023. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5014>.
501. Jember, A., Zuberi, R., Liu, F., and Croft, M. (2001). Development of allergic inflammation in a murine model of asthma is dependent on the costimulatory receptor OX40. *J. Exp. Med.* *193*, 387–392. <https://doi.org/10.1084/jem.193.3.387>.
502. Zhang, X., Xiao, X., Lan, P., Li, J., Dou, Y., Chen, W., Ishii, N., Chen, S., Xia, B., Chen, K., et al. (2018). OX40 Costimulation Inhibits Foxp3 Expression and Treg Induction via BATF3-Dependent and Independent Mechanisms. *Cell Rep.* *24*, 607–618. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.052>.
503. Pai, S., Truitt, M., and Ho, I. (2004). GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 1993–1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308697100>.
504. Zhu, J., Min, B., Hu-Li, J., Watson, C., Grinberg, A., Wang, Q., Killeen, N., Urban, J., JF, Guo, L., and Paul, W. (2004). Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat. Immunol.* *5*, 1157–1165. <https://doi.org/10.1038/ni1128>.
505. Trifari, S., Kaplan, C., Tran, E., Crellin, N., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat. Immunol.* *10*, 864–871. <https://doi.org/10.1038/ni.1770>.
506. Rutz, S., Eidenschenk, C., and Ouyang, W. (2013). IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol. Rev.* *252*, 116–132. <https://doi.org/10.1111/imr.12027>.
507. Basu, R., O’Quinn, D., Silberger, D., Schoeb, T., Fouser, L., Ouyang, W., Hatton, R., and Weaver, C. (2012). Th22 cells are an important source of IL-22 for host protection against enteropathogenic bacteria. *Immunity* *37*, 1061–1075. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.024>.
508. Zhuang, Y., Peng, L., Zhao, Y., Shi, Y., Mao, X., Guo, G., Chen, W., Liu, X., Zhang, J., Liu, T., et al. (2012). Increased intratumoral IL-22-producing CD4⁺ T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *61*, 1965–1975. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1241-5>.
509. Huang, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Zhang, S., and Gao, F. (2015). Th22 cell accumulation is associated with colorectal cancer development. *World J. Gastroenterol.* *21*, 4216–4224. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i14.4216>.
510. Niccolai, E., Taddei, A., Ricci, F., Rolla, S., D’Elios, M., Benagiano, M., Bechi, P., Bencini, L., Ringressi, M., Pini, A., et al. (2016). Intra-tumoral IFN- γ -producing Th22 cells correlate with TNM staging and the worst outcomes in pancreatic cancer. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *130*, 247–258. <https://doi.org/10.1042/CS20150437>.
511. Zeng, H., Liu, Z., Wang, Z., Zhou, Q., Qi, Y., Chen, Y., Chen, L., Zhang, P., Wang, J., Chang, Y., et al. (2020). Intratumoral IL22-producing cells define immunoevasive subtype muscle-invasive bladder cancer with poor prognosis and superior nivolumab responses. *Int. J. Cancer* *146*, 542–552. <https://doi.org/10.1002/ijc.32715>.
512. McCuaig, S., Barras, D., Mann, E., Friedrich, M., Bullers, S., Janney, A., Garner, L., Domingo, E., Koelzer, V., Delorenzi, M., et al. (2020). The Interleukin 22 Pathway Interacts with Mutant KRAS to Promote Poor Prognosis in Colon Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *26*, 4313–4325. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1086>.
513. Radaeva, S., Sun, R., Pan, H., Hong, F., and Gao, B. (2004). Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology. Baltim. Md* *39*, 1332–1342. <https://doi.org/10.1002/hep.20184>.
514. Sonnenberg, G., Nair, M., Kirn, T., Zaph, C., Fouser, L., and Artis, D. (2010). Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J. Exp. Med.* *207*, 1293–1305. <https://doi.org/10.1084/jem.20092054>.

BIBLIOGRAPHIE

515. Zhang, T., Wahib, R., Zazara, D., Lücke, J., Shiri, A., Kempfski, J., Zhao, L., Agalioti, T., Machicote, A., Giannou, O., et al. (2023). CD4+ T cell-derived IL-22 enhances liver metastasis by promoting angiogenesis. *Oncoimmunology* 12, 2269634. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2023.2269634>.
516. Sorin, M., Rezanejad, M., Karimi, E., Fiset, B., Desharnais, L., Perus, L., Milette, S., Yu, M., Maritan, S., Doré, S., et al. (2023). Single-cell spatial landscapes of the lung tumour immune microenvironment. *Nature* 614, 548–554. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05672-3>.
517. Pouniotis, D., Plebanski, M., Apostolopoulos, V., and McDonald, C. (2006). Alveolar macrophage function is altered in patients with lung cancer. *Clin. Exp. Immunol.* 143, 363–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.02998.x>.
518. Almatroodi, S., McDonald, C., and Pouniotis, D. (2014). Alveolar Macrophage Polarisation in Lung Cancer. *Lung Cancer Int.* 2014, 721087. <https://doi.org/10.1155/2014/721087>.
519. Nguyen, H., Kan, E., Humayun, M., Gurvich, N., Offeddu, G., Wan, Z., Coughlin, M., Renteria, D., Loew, A., Wilson, S., et al. (2024). Patient-specific vascularized tumor model: Blocking monocyte recruitment with multispecific antibodies targeting CCR2 and CSF-1R. *Biomaterials* 312, 122731. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2024.122731>.
520. Fleetwood, A., Lawrence, T., Hamilton, J., and Cook, A. (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 5245–5252. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.5245>.
521. Coelho, A., Gomes, M., Catarino, R., Rolfo, C., Medeiros, R., and Araújo, A. (2018). CSF-1 and Ang-2 serum levels - prognostic and diagnostic partners in non-small cell lung cancer. *ESMO Open* 3, e000349. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2018-000349>.
522. Bahar, B., Acedil, B., Ayc, Iota, Çoşkun, U., Büyükerberber, S., Benekli, M., and Yildiz, R. (2010). Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) as potential tumor markers in non small cell lung cancer diagnosis. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 11, 709–712.
523. Inamura, K., Shigematsu, Y., Ninomiya, H., Nakashima, Y., Kobayashi, M., Saito, H., Takahashi, K., Futaya, E., Okumura, S., Ishikawa, Y., et al. (2018). CSF1R-Expressing Tumor-Associated Macrophages, Smoking and Survival in Lung Adenocarcinoma: Analyses Using Quantitative Phosphor-Integrated Dot Staining. *Cancers* 10. <https://doi.org/10.3390/cancers10080252>.
524. Conway, E., Pikor, L., Kung, S., Hamilton, M., Lam, S., Lam, W., and Bennewith, K. (2016). Macrophages, Inflammation, and Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193, 116–130. <https://doi.org/10.1164/rccm.201508-1545CI>.
525. Chatelain, C., Berl, L, Gard, M., Jou, N, Fresquet, J., Nader, J., Hirigoyen, U., Petithomme, T., et al. (2024). Interplay between oncolytic measles virus, macrophages and cancer cells induces a proinflammatory tumor microenvironment. *Oncoimmunology* 13, 2377830. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2024.2377830>.
526. Wheeler, K., Jena, M., Pradhan, B., Nayak, N., Das, S., Hsu, C., Wheeler, D., Chen, K., and Nayak, N. (2018). VEGF may contribute to macrophage recruitment and M2 polarization in the decidua. *PloS One* 13, e0191040. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191040>.
527. Ma, R., Black, A., and Qian, B. (2022). Macrophage diversity in cancer revisited in the era of single-cell omics. *Trends Immunol.* 43, 546–563. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.04.008>.
528. Goswami, S., An, han, S., Raychaudhuri, D., and Sharma, P. (2023). Myeloid cell-targeted therapies for solid tumours. *Nat. Rev. Immunol.* 23, 106–120. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00737-w>.
529. Vitale, I., Manic, G., Coussens, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2019). Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab.* 30, 36–50. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.06.001>.
530. Chakarov, S., Lim, H., Tan, L., Lim, S., See, P., Lum, J., Zhang, X., Foo, S., Nakamizo, S., Duan, K., et al. (2019). Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science* 363. <https://doi.org/10.1126/science.aau0964>.

BIBLIOGRAPHIE

531. Arwert, E., Harney, A., Entenberg, D., Wang, Y., Sahai, E., Pollard, J., and Condeelis, J. (2018). A Unidirectional Transition from Migratory to Perivascular Macrophage Is Required for Tumor Cell Intravasation. *Cell Rep.* *23*, 1239–1248. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.007>.
532. Opzoomer, J., Anstee, J., Dean, I., Hill, E., Bouybayoune, I., Caron, J., Muliaditan, T., Gordon, P., Sosnowska, D., Nuamah, R., et al. (2021). Macrophages orchestrate the expansion of a proangiogenic perivascular niche during cancer progression. *Sci. Adv.* *7*, eabg9518. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg9518>.
533. Jara-Gutiérrez, Á., and Baladrón, V. (2021). The Role of Prostaglandins in Different Types of Cancer. *Cells* *10*. <https://doi.org/10.3390/cells10061487>.
534. Finetti, F., Travelli, C., Ercoli, J., Colombo, G., Buoso, E., and Trabalzini, L. (2020). Prostaglandin E2 and Cancer: Insight into Tumor Progression and Immunity. *Biology* *9*. <https://doi.org/10.3390/biology9120434>.
535. Cai, G., Yang, Z., Guo, D., Hu, C., Yan, M., and Yan, J. (2021). Macrophages enhance lipopolysaccharide induced apoptosis via Ang1 and NF- κ B pathways in human umbilical vein endothelial cells. *Sci. Rep.* *11*, 2918. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82531-7>.
536. Fan, Y., Hao, Y., Gao, D., Li, G., and Zhang, Z. (2021). Phenotype and function of macrophage polarization in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rat model. *Physiol. Res.* *70*, 213–226. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934456>.
537. Abbott, A. (2003). Cell culture: biology's new dimension. *Nature* *424*, 870–872. <https://doi.org/10.1038/424870a>.
538. Velazquez, O., Snyder, R., Liu, Z., Fairman, R., and Herlyn, M. (2002). Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *16*, 1316–1318. <https://doi.org/10.1096/fj.01-1011fje>.
539. De, L., Moor, Merovci, I., Baetens, S., Verstraeten, J., Kowalska, P., Krysko, D., De, W., Vos, and Declercq, H. (2018). High-throughput fabrication of vascularized spheroids for bioprinting. *Biofabrication* *10*, 035009. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aac7e6>.
540. Madsen, N., Nielsen, B., Nhat, S., Skov, S., Gad, M., and Larsen, J. (2021). Monocyte Infiltration and Differentiation in 3D Multicellular Spheroid Cancer Models. *Pathog. Basel Switz.* *10*. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080969>.
541. Bahri, M., Anstee, J., Opzoomer, J., and Arnold, J. (2023). Perivascular tumor-associated macrophages and their role in cancer progression. *Essays Biochem.* *67*, 919–928. <https://doi.org/10.1042/EBC20220242>.
542. Lewis, C., Harney, A., and Pollard, J. (2016). The Multifaceted Role of Perivascular Macrophages in Tumors. *Cancer Cell* *30*, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.017>.
543. Kieu, T., Tazawa, K., Kawashima, N., Noda, S., Fujii, M., Nara, K., Hashimoto, K., Han, P., and Okiji, T. (2022). Kinetics of LYVE-1-positive M2-like macrophages in developing and repairing dental pulp in vivo and their pro-angiogenic activity in vitro. *Sci. Rep.* *12*, 5176. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08987-3>.
544. Samaniego, R., Domínguez-Soto, Á., Ratnam, M., Matsuyama, T., Sánchez-Mateos, P., Corbí, Á., and Puig-Kröger, A. (2020). Folate Receptor β (FR β) Expression in Tissue-Resident and Tumor-Associated Macrophages Associates with and Depends on the Expression of PU.1. *Cells* *9*. <https://doi.org/10.3390/cells9061445>.
545. Xiang, C., Zhang, M., Shang, Z., Chen, S., Zhao, J., Ding, B., Jiang, D., Zhu, Q., Teng, H., Zhu, L., et al. (2023). Single-cell profiling reveals the trajectory of FOLR2-expressing tumor-associated macrophages to regulatory T cells in the progression of lung adenocarcinoma. *Cell Death Dis.* *14*, 493. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06021-6>.
546. Nalio, R., Ramos, Missolo-Koussou, Y., Gerber-Ferder, Y., Bromley, C., Bugatti, M., Núñez, N., Tosello, J., Boari, Richer, W., Menger, L., Denizeau, J., et al. (2022). Tissue-resident FOLR2(+) macrophages associate with CD8(+) T cell infiltration in human breast cancer. *Cell* *185*, 1189-1207.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.02.021>.

BIBLIOGRAPHIE

547. Denzer, L., Muranyi, W., Schroten, H., and Schwerk, C. (2023). The role of PLVAP in endothelial cells. *Cell Tissue Res.* 392, 393–412. <https://doi.org/10.1007/s00441-023-03741-1>.
548. Rohlenova, K., Goveia, J., García-Caballero, M., Subramanian, A., Kalucka, J., Treps, L., Falkenberg, K., de, L., Rooij, Zheng, Y., Lin, L., et al. (2020). Single-Cell RNA Sequencing Maps Endothelial Metabolic Plasticity in Pathological Angiogenesis. *Cell Metab.* 31, 862-877.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.03.009>.
549. Verhoeven, J., Jacobs, K., Rizzollo, F., Lodi, F., Hua, Y., Poźniak, J., Narayanan, A., Srinivasan, Houbaert, D., Shankar, G., More, S., et al. (2023). Tumor endothelial cell autophagy is a key vascular-immune checkpoint in melanoma. *EMBO Mol. Med.* 15, e18028. <https://doi.org/10.15252/emmm.202318028>.
550. Houbaert, D., Nikolakopoulos, A., Jacobs, K., Meçe, O., Roels, J., Shankar, G., Agrawal, M., More, S., Ganne, M., Rillaerts, K., et al. (2024). An autophagy program that promotes T cell egress from the lymph node controls responses to immune checkpoint blockade. *Cell Rep.* 43, 114020. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114020>.
551. Ronca, R., Van, J., Ginderachter, and Turtoi, A. (2018). Paracrine interactions of cancer-associated fibroblasts, macrophages and endothelial cells: tumor allies and foes. *Curr. Opin. Oncol.* 30, 45–53. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000420>.
552. Chen, Z., Htay, A., Dos, W., Santos, Gillies, G., Fillmore, H., Sholley, M., and Broaddus, W. (2009). In vitro angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by three-dimensional co-culture with glioblastoma cells. *J. Neurooncol.* 92, 121–128. <https://doi.org/10.1007/s11060-008-9742-y>.
553. Hauser, S., Jung, F., and Pietzsch, J. (2017). Human Endothelial Cell Models in Biomaterial Research. *Trends Biotechnol.* 35, 265–277. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.09.007>.
554. Aird, W. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* 100, 158–173. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a>.
555. Fu, J., and Wang, D. (2018). In Situ Organ-Specific Vascularization in Tissue Engineering. *Trends Biotechnol.* 36, 834–849. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.02.012>.
556. Stenman, J., Rajagopal, J., Carroll, T., Ishibashi, M., McMahon, J., and McMahon, A. (2008). Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. *Science* 322, 1247–1250. <https://doi.org/10.1126/science.1164594>.
557. Oddo, A., Peng, B., Tong, Z., Wei, Y., Tong, W., Thissen, H., and Voelcker, N. (2019). Advances in Microfluidic Blood-Brain Barrier (BBB) Models. *Trends Biotechnol.* 37, 1295–1314. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.04.006>.
558. Nie, L., Lyros, O., Medda, R., Jovanovic, N., Schmidt, J., Otterson, M., Johnson, C., Behmaram, B., Shaker, R., and Rafiee, P. (2014). Endothelial-mesenchymal transition in normal human esophageal endothelial cells cocultured with esophageal adenocarcinoma cells: role of IL-1 β and TGF- β 2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307, C859-77. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00081.2014>.
559. Sutherland RM, McCredie, J., and Inch, W. (1971). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 46, 113–120.
560. Friedrich, J., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L. (2007). Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids—old hat or new challenge? *Int. J. Radiat. Biol.* 83, 849–871. <https://doi.org/10.1080/09553000701727531>.
561. Singh, K., and Gautam, P. (2023). Macrophage infiltration in 3D cancer spheroids to recapitulate the TME and unveil interactions within cancer cells and macrophages to modulate chemotherapeutic drug efficacy. *BMC Cancer* 23, 1201. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11674-9>.
562. Chen, B., Li, Y., Zhao, Y., Chen, K., Li, S., Lao, J., Yuan, S., Shyy, J., and Chien, S. (2001). DNA microarray analysis of gene expression in endothelial cells in response to 24-h shear stress. *Physiol. Genomics* 7, 55–63. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.2001.7.1.55>.
563. Weinbaum, S., Tarbell, J., and Damiano, E. (2007). The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 9, 121–167. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959>.

BIBLIOGRAPHIE

564. Dong, C., Slattery, M., and Liang, S. (2005). Micromechanics of tumor cell adhesion and migration under dynamic flow conditions. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *10*, 379–384. <https://doi.org/10.2741/1535>.
565. Gomes, N., Berard, M., Vassy, J., Peyri, N., Legr, C, and Fauvel-Lafeve, F. (2003). Shear stress modulates tumour cell adhesion to the endothelium. *Biorheology* *40*, 41–45.
566. Wang, J., Loberg, R., and Taichman, R. (2006). The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* *25*, 573–587. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9019-x>.
567. Menon, N., Chuah, Y., Cao, B., Lim, M., and Kang, Y. (2014). A microfluidic co-culture system to monitor tumor-stromal interactions on a chip. *Biomicrofluidics* *8*, 064118. <https://doi.org/10.1063/1.4903762>.
568. Charwat, V., Rothbauer, M., Tedde, S., Hayden, O., Bosch, J., Muellner, P., Hainberger, R., and Ertl, P. (2013). Monitoring dynamic interactions of tumor cells with tissue and immune cells in a lab-on-a-chip. *Anal. Chem.* *85*, 11471–11478. <https://doi.org/10.1021/ac4033406>.
569. Konstantopoulos, K., and Thomas, S. (2009). Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* *11*, 177–202. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-061008-124949>.
570. Kwak, T., and Lee, E. (2020). In vitro modeling of solid tumor interactions with perfused blood vessels. *Sci. Rep.* *10*, 20142. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77180-1>.

ANNEXES

LISTE DES COMMUNICATIONS REALISEES PENDANT LA THESE

POSTERS :

Congrès de la Société Française d'Angiogenèse (SFA), Bordeaux, octobre 2023

Journées scientifiques du LabEx IGO, Nantes, Décembre 2023

Journées scientifiques de l'école doctorale Biologie-Santé, Angers, Avril 2024

COMMUNICATION ORALE :

Congrès de la Société Française du Microenvironnement Tumoral (FSTM), Le Croisic, Décembre 2023

Webinaire de la Société Française d'Angiogenèse (SFA), juin 2024

LISTE DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Apoptosis during ZIKA Virus Infection: Too Soon or Too Late?

International Journal of Molecular Sciences, 2022

Jonathan Turpin, Daed El Safadi, Grégoire Lebeau, Morgane Krejbich, Camille Chatelain, Philippe Desprès, Wildriss Viranaïcken and Pascale Krejbich-Trotot

Exosome-Mediated Antigen Delivery: Unveiling Novel Strategies in Viral Infection Control and Vaccine Design

Vaccines, 2024

Daed El Safadi, Alexandre Mokhtari, Morgane Krejbich, Alisé Lagrave, Ugo Hirigoyen, Grégoire Lebeau, Wildriss Viranaïcken and Pascale Krejbich-Trotot

Oncolytic viruses alter the biogenesis of tumor extracellular vesicles and increase their immunogenicity

Molecular Therapy – Oncolytics, 2024.

Ugo Hirigoyen, Coraly Guilbaud, Morgane Krejbich, Morgane Fouet, Judith Fresquet, Bastien Arnaud, Emmanuelle Com, Charles Pineau, Gwenann Cadiou, Philippe Erbs, Delphine Fradin, Nathalie Labarrière, Jean-François Fonteneau, Taciën Petithomme, Nicolas Boisgerault.

Secretomes from non-small cell lung cancer cells induce endothelial plasticity through a partial endothelial-to-mesenchymal transition

Cancer Medicine, Article en revision

Clara Bourreau, Marine Cotinat, Morgane Krejbich, François Guillonnet, Catherine Guette², Alice Boissard, Cécile Henry, Lucas Treps, Nicolas Clere



Review

Apoptosis during ZIKA Virus Infection: Too Soon or Too Late?

Jonathan Turpin ^{1,†} , Daed El Safadi ^{1,†}, Grégoire Lebeau ^{1,†} , Morgane Krejbich ², Camille Chatelain ²,
Philippe Desprès ¹ , Wildriss Viranaïcken ¹ and Pascale Krejbich-Trotot ^{1,*}

¹ Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Université de La Réunion, INSERM UMR 1187, CNRS 9192, IRD 249, Plateforme CYROI, 97490 Sainte-Clotilde, France; jonathan.turpin@univ-reunion.fr (J.T.); daedalsafadi@gmail.com (D.E.S.); gregorie.lebeau@univ-reunion.fr (G.L.); philippe.despres@univ-reunion.fr (P.D.); wildriss.viranaïcken@univ-reunion.fr (W.V.)

² CRCI2NA, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie, Université de Nantes, Université d'Angers, INSERM UMR 1307, 44000 Nantes, France; morgane.krejbich@etu.univ-nantes.fr (M.K.); camille.chatelain@etu.univ-nantes.fr (C.C.)

* Correspondence: pascale.krejbich@univ-reunion.fr

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Cell death by apoptosis is a major cellular response in the control of tissue homeostasis and as a defense mechanism in the case of cellular aggression such as an infection. Cell self-destruction is part of antiviral responses, aimed at limiting the spread of a virus. Although it may contribute to the deleterious effects in infectious pathology, apoptosis remains a key mechanism for viral clearance and the resolution of infection. The control mechanisms of cell death processes by viruses have been extensively studied. Apoptosis can be triggered by different viral determinants through different pathways as a result of virally induced cell stresses and innate immune responses. Zika virus (ZIKV) induces Zika disease in humans, which has caused severe neurological forms, birth defects, and microcephaly in newborns during the last epidemics. ZIKV also surprised by revealing an ability to persist in the genital tract and in semen, thus being sexually transmitted. Mechanisms of diverting antiviral responses such as the interferon response, the role of cytopathic effects and apoptosis in the etiology of the disease have been widely studied and debated. In this review, we examined the interplay between ZIKV infection of different cell types and apoptosis and how the virus deals with this cellular response. We illustrate a duality in the effects of ZIKV-controlled apoptosis, depending on whether it occurs too early or too late, respectively, in neuropathogenesis, or in long-term viral persistence. We further discuss a prospective role for apoptosis in ZIKV-related therapies, and the use of ZIKV as an oncolytic agent.

Keywords: apoptosis; cell death; Zika virus; ZIKV



Citation: Turpin, J.; El Safadi, D.; Lebeau, G.; Krejbich, M.; Chatelain, C.; Desprès, P.; Viranaïcken, W.; Krejbich-Trotot, P. Apoptosis during ZIKA Virus Infection: Too Soon or Too Late? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1287. <https://doi.org/10.3390/ijms23031287>

Academic Editor: Francisco Estévez

Received: 29 December 2021

Accepted: 21 January 2022

Published: 24 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The recent COVID pandemic reminds us of how vulnerable the world's population is to zoonotic RNA viruses of medical concern. Between 2007 and 2016, the emergence of epidemic strains of mosquito-borne Zika virus (ZIKV), a member of the flavivirus genus of *Flaviviridae* family, was in the spotlight. [1]. At that time, the rapid expansion of the Zika epidemic throughout the intertropical zone had already received international attention. Health authorities from several countries were concerned and had to deal with a disease whose clinical outcomes such as congenital syndromes and microcephaly in infants were more severe and frequent than previously known [2]. The international scientific community had to react to a poorly documented infectious agent whose interactions with its hosts (human or mosquitoes), pathogenesis, and unusual transmission pathways had been only partially or not described [3].

The pathogenicity of an infectious agent depends largely on the cytopathic effects it will produce in its target cells. In contrast, programmed cell death (PCD) is an urgent and

necessary defense response, implemented by the infected host to disrupt virus multiplication and propagation, thereby preserving other cells and surrounding tissue [4]. The death of infected cells by apoptosis also plays a crucial role in promoting antigen presentation and recruiting immune cells, thus facilitating the infection resolution [5,6]. Failures in viral clearance are widely attributed to defects in the infected cells' auto-destruction [7].

Despite the tissue damage and the subsequent critical loss of cell populations, PCD by apoptosis is thus considered a 'necessary evil' of the body's response in its efforts to get rid of the infectious agent.

In the case of ZIKV infection and pathogenesis, massive apoptosis of neuronal progenitor cells (NPCs), early in fetal development, has been proposed as an explanation for the specific induced central nervous system (CNS) disorders in newborns and infants [8,9]. At the same time, the finding that ZIKV can persist in adults in the urinary and reproductive tracts and semen, for many months after the acute infection episode, is an indication that viral clearance may be incomplete and associated with impaired or delayed apoptosis [10].

In this review, we propose examining the available data on ZIKV-induced apoptosis and the state of knowledge regarding the virus's ability to manipulate, delay, or inhibit the cell death response. We also discuss antiviral therapies based on the remediation of apoptosis, and given its unique dual relationship with cell death, the possibility of using ZIKV as an oncolytic agent.

2. Apoptotic Cell Death

2.1. Features of Apoptosis

Apoptosis is one of the genetically programmed cell deaths that regulates tissue homeostasis and aims to eliminate non-viable, stressed, injured, or infected cells [11]. Cell death by apoptosis is a process defined by canonical morphological and molecular criteria. Apoptosis induces specific morphological changes that lead to cell implosion and disappearance. This is supported by the condensation and fragmentation of the nucleus (pyknosis and karyorrhexis), followed by plasma membrane blebbing and cell disassembly [12]. The process ends by efferocytosis, with cell residues such as blebs or apoptotic bodies being engulfed by non-dying neighboring cells or professional phagocytes [13]. At the molecular level, the caspase family of proteases is required for the completion of the operation, which entails initiation and execution phases [14]. Mitochondria plays a major role in the initiation of apoptosis through the permeabilization of its outer membrane (MOMP) [15]. The members of the BCL-2 protein family are the main actors of the MOMP (Figure 1). Among the family are proteins with the BH3 domain only (e.g., BID, BIM, NOXA, BAD), which activate or control other BCL-2 proteins (the pro-apoptotic BAX and BAK) to initiate the complex formation required for MOMP, while anti-apoptotic regulators such as BCL-2, BCL-XL, and MCL-1 inhibit its formation [16]. MOMP leads to the release of cytochrome-c from the mitochondria and the activation of the protein apoptosis protease activating factor 1 (APAF-1). Oligomerized cytochrome-c-APAF-1, together with pro-caspase-9, form a macromolecular complex called apoptosome [17]. Activated caspase-9 from the apoptosome complex will then process the executioner pro-caspase-3 into active caspase-3, which in turn degrades numerous substrates such as poly ADP-ribose polymerase (PARP) [18].

Several typical situations are capable of initiating apoptosis (Figure 1). Receiving death signals activates the extrinsic pathway through TNF receptors (TNFR) and Fas receptors (CD95) and leads to death-inducing signaling complex (DISC) formation and activation of caspase-8. This initiating caspase can activate BID, which will then activate the mitochondrial pathway [19,20]. Cell stresses decompensations, damages of physico-chemical origin (UV, drugs, reactive oxygen species) or following endoplasmic reticulum (ER) stress, and an unresolved unfolded protein response (UPR), lead to an intrinsic pathway of apoptosis with mitochondrial membrane modifications and caspase-9 activation [21,22].

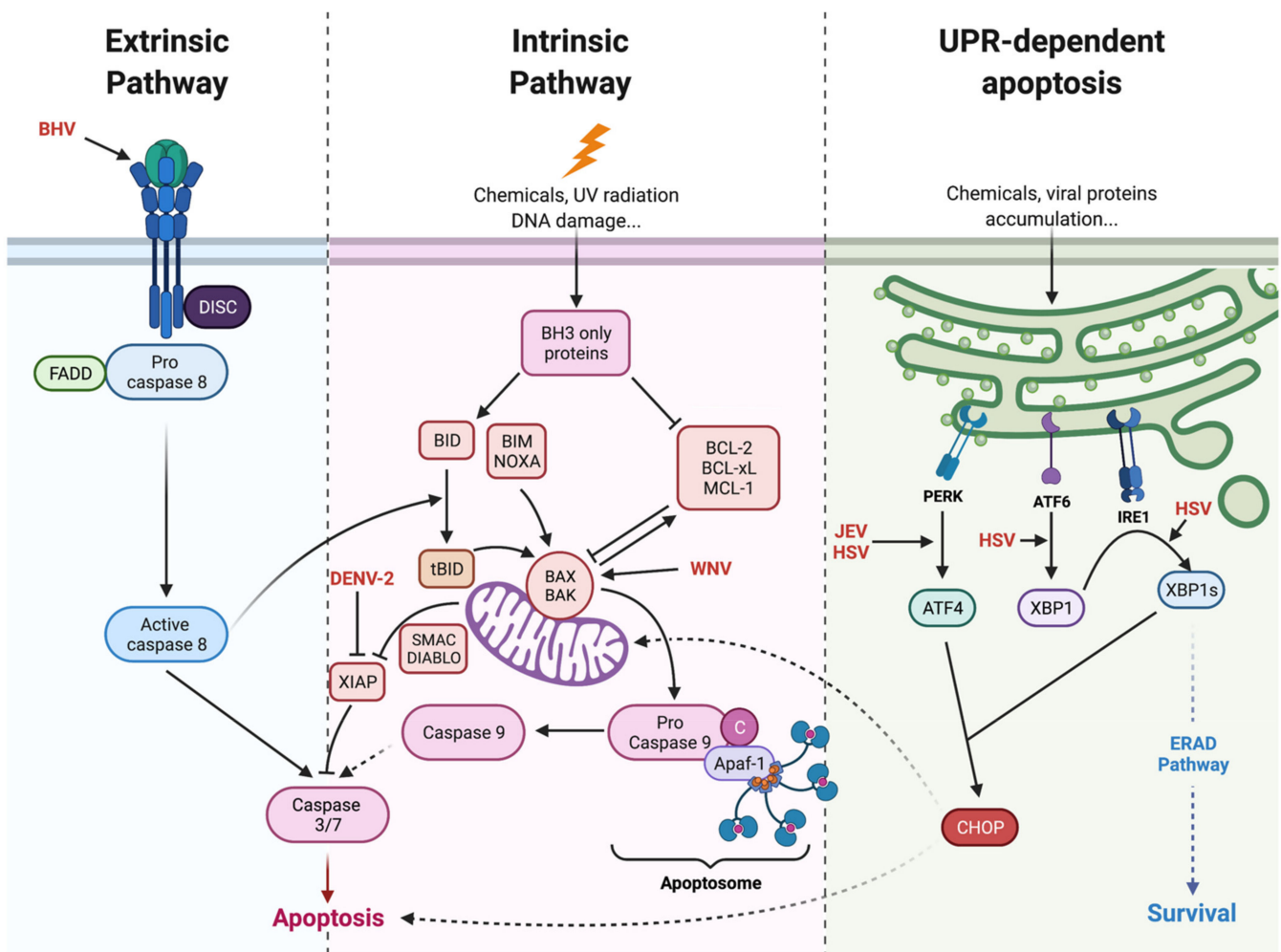


Figure 1. The different pathways of apoptosis. Apoptosis can follow several pathways, depending on the signals integrated by the cell and the respective influence of the mobilized pro- and anti-apoptotic factors. The extrinsic pathway is induced by external death signals such as $\text{TNF}\alpha$ and mediated by death receptors (FAS, DR4 expressed on the cell surface). The intrinsic pathway is induced by internal stimuli such as DNA damage, oxidative stress, or intracellular parasites. Apoptosis could also be activated by unresolved endoplasmic reticulum stress (ER stress) and unfolded protein response (UPR) through C/EBP HOMologous Protein (CHOP) [15–22]. Viruses such as BHV, DENV, WNV, JEV, and HSV (in red) can induce apoptosis by the activation of different pathways [23–35].

2.2. Virus-Induced Apoptosis

Each stage of a viral infection cycle is likely to drive pro-apoptotic signaling. First, some viruses can trigger an extrinsic pathway, just upon attachment and entry. In the cases reported in the literature (e.g., for the bovine herpesvirus (BHV)), functional proximity between the viral cell surface binding site and death receptors seems to be involved [23]. Second, intrinsic pro-apoptotic signaling in infected cells is the logical consequence of the multiple decompensations caused by viral multiplication on cellular homeostasis. It is argued that to ensure its replication cycle and the production of its progeny, the virus robs the cell of its resources for its own benefit. This hijacking of cellular metabolism, the diversion of protein synthesis, and nucleotide pools have been described as being able to disrupt mitochondrial homeostasis and activate the intrinsic pathway of apoptosis [24–26].

In addition to metabolic reprogramming, the increasing amounts of viral compounds following virus replication are likely to generate stresses that lead to apoptosis initiation. The considerable input of proteins to be processed by the endoplasmic reticulum leads to ER stress and UPR. This adaptive response is implemented by cells for its antiviral effects

at the end. UPR is a way to reduce viral protein synthesis and ultimately results in the self-destruction of the cell, thus bypassing the virus. Many viruses have replication cycles that lead to UPR-dependent apoptosis. This kind of viral induced cellular stress, followed by cell death has been extensively documented, for example, in Japanese encephalitis virus (JEV) and herpes simplex virus (HSV) infections [27–29]. Viral compounds have been identified as capable of inducing apoptosis on their own. Among the flaviviruses, the overexpression of viral proteins, both of structural and non-structural origin, or of peptides derived from these proteins such as the peptide called apoptoM has demonstrated their cytotoxic capacity [30–33]. Unfortunately, the exact mechanisms of their pro-apoptotic action remain poorly understood. One assumption is that some of them may be more specifically responsible for the UPR response by initiating the formation of misfolded aggregates in the ER lumen.

The literature on virus-induced apoptosis frequently reports that viruses can change the dominant relationship between pro- and anti-apoptotic factors. It has been shown that Dengue virus (DENV2) induces apoptosis via the expression of XIAP associated factor 1 (XAF1), an inhibitor of the anti-caspase activity of the XIAP protein [34]. Additionally, several viruses are known to upregulate the expression of pro-apoptotic factors. West Nile virus (WNV), for example, induces apoptosis via increased transcription of the pro-apoptotic factor BAX [35] (Figure 1).

Furthermore, it is increasingly suggested that pattern recognition receptor (PRR) activation by viral compounds, in particular viral genomes in all their forms (DNA, cDNA, single-, and double-stranded RNA) and the subsequent innate immunity signaling, can result in apoptosis [36]. The mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS) recruitment by RIG-I and MDA5 sensing can disrupt the mitochondrial membrane potential and lead to caspase activation [37]. IRF3, an interferon response factor, can directly promote BAX oligomerization at the outer mitochondrial membrane or act as a transcription factor able to upregulate the expression of BH3-only NOXA [38,39]. Of note, activation of PRRs, in addition to promoting the immune response with inflammatory cytokine production, seems to lead to various forms of cell death such as pyroptosis and necroptosis [40]. This diversity of signaling pathways in response to viral infections has led to the emergence of a PANoptosis concept, based on the crosstalk between key molecules of each type of PCD [41].

3. Zika Infection

3.1. Zika Virus, Historical Data

Zika virus (ZIKV) is a pathogenic arbovirus, vectorized by mosquitoes of the genus *Aedes* (*Ae.*) [42]. It belongs to the *Flaviviridae* family and the *Flavivirus* genus such as DENV, WNV, and many others. It was initially isolated in 1947 from a sentinel rhesus monkey during a study on the circulation of the Yellow Fever virus (YFV) in Uganda and found later in *Ae. Africanus* mosquitoes [43]. The first human case was described in 1952 [44], but little research on ZIKA arbovirology has been conducted over the past century as only a few outbreaks and sporadic cases have been reported, with only mild characteristics evoked for the symptoms. This has changed over the last twenty years with the re-emergence of ZIKV, associated with major epidemics and severe forms of ZIKA diseases. ZIKV returned to the spotlight in 2007 in Micronesia [45], then the virus reached French Polynesia in 2013 [46], and affected Brazil in 2015, where an estimated 1.5M people were infected [47]. This epidemic emergence led the World Health Organization (WHO) to declare ZIKA disease as a public health emergency in February 2016. Analysis of circulating viruses revealed the existence of two lineages, an African lineage and an Asian-American lineage containing all the strains that have led to the epidemic outbreaks [48]. Today, the virus circulates endemically in several regions and outbreaks are occasionally observed such as in Jaipur in India [49]. Further emergences could lead to sporadic outbreaks in certain places described as being at high risk of introduction [50,51].

3.2. Zika Virus Transmission and Clinical Outcomes

Associated with the virus's emergence, new modes of transmission have been discovered. Several hypotheses have been put forward to explain the extent and rapid expansions of the last outbreaks. Among them was the switch from historical African and sylvatic species of mosquitoes to more urban vectors, mainly *Ae. Aegypti*, but also *Ae. Albopictus*, *Ae. Polynesiensis*, *Ae. Vittatus*, *Ae. Unilineatus*, and *Ae. Hensilli* [52]. More unusual among flaviviruses, non-vector modes of transmission have been reported for ZIKV such as sexual transmission. This has led the Centers for Disease Control (CDC) and the WHO to recommend the use of condoms or avoidance of sex for at three months [53,54]. Maternal–fetal vertical transmissions were also reported during pregnancy [55].

Clinical forms are in most cases common to many arbovirosis and include fever, rash, arthralgia, and sometimes conjunctivitis due to direct eye infection [56]. The febrile state usually resolves in less than a week [45].

However, serious complications have occurred after infection with ZIKV. The most outstanding ones have been neurodevelopmental injuries during mother-to-fetus transmission, but peripheral nervous system disorders such as Guillain-Barré syndrome in adults have also alerted the international scientific community. High levels of anti-ganglioside antibodies in affected patients with this syndrome may be linked to this pathology [57,58].

Numerous cases of congenital Zika syndrome (CZS) including microcephaly due to arrested development of the cerebral cortex [59], brain calcifications, intrauterine growth restriction, and fetal death were reported during the 2013 Polynesian and 2015 Brazilian epidemics and among imported cases all over the world [9,59]. The case fatality rate for microcephalic infants is estimated to be around 10%, with the worst outcomes seen in late preterm and/or low birth weight newborns [60,61].

Another surprising feature of Zika infection was the discovery that viral RNA could be found until 40 days in serum and until 120 days in semen after the onset of symptoms [62,63]. Moreover, a recent report suggests that viremia could be found three years after infection, probably due to genetic susceptibility [64]. All these data suggest that ZIKV can persist in the host body after the acute phase of the viral infection.

3.3. Zika Virus Structure and Life Cycle

The ZIKV genome is composed of a positive 11 kb single-stranded RNA that encodes 10 proteins. Among these proteins, three are structural (C, prM, E) and seven are non-structural (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5) as shown in Figure 2A and reviewed by Petersen et al. [65]. In classical vector transmission, an infected mosquito will deliver the virus to the epidermis of the host during its blood meal. ZIKV will further enter its target cells and move along the endocytic pathway to reach the endosome. Fusion of the viral envelope and decapsidation will release the viral genome into the cytoplasm where it will be directly translated into a polyprotein further cleaved by viral proteases (NS2B/NS3) and host proteases of the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus. The envelope protein (E) is involved in virus entry and receptor recognition. The membrane (prM) protein present in the immature virion prevents premature fusion during egress; it is further cleaved in M protein. The nucleocapsid protein (C) holds the viral RNA. The non-structural proteins participate mainly in viral replication. The NS5 protein implements genome replication platforms at the ER membrane, with cofactor proteins such as NS1, NS4A, and NS4B. NS1 is a singular flaviviral protein that can be secreted and found circulating in the bloodstream. Its role in Zika disease is not clearly identified, but it is known to be highly immunogenic and potentially involved in metabolic modifications [66]. After incorporation of neo-synthesized viral genomes in capsids, and budding from the ER membrane, virions move to the Golgi apparatus where the host furins lead to a mature virion. The non-coding regions of the viral RNA (3'UTR), which leads to the production of small flavivirus RNA (sfRNA) that accumulate in infected cells, are known to be important in modulating cell responses [67].

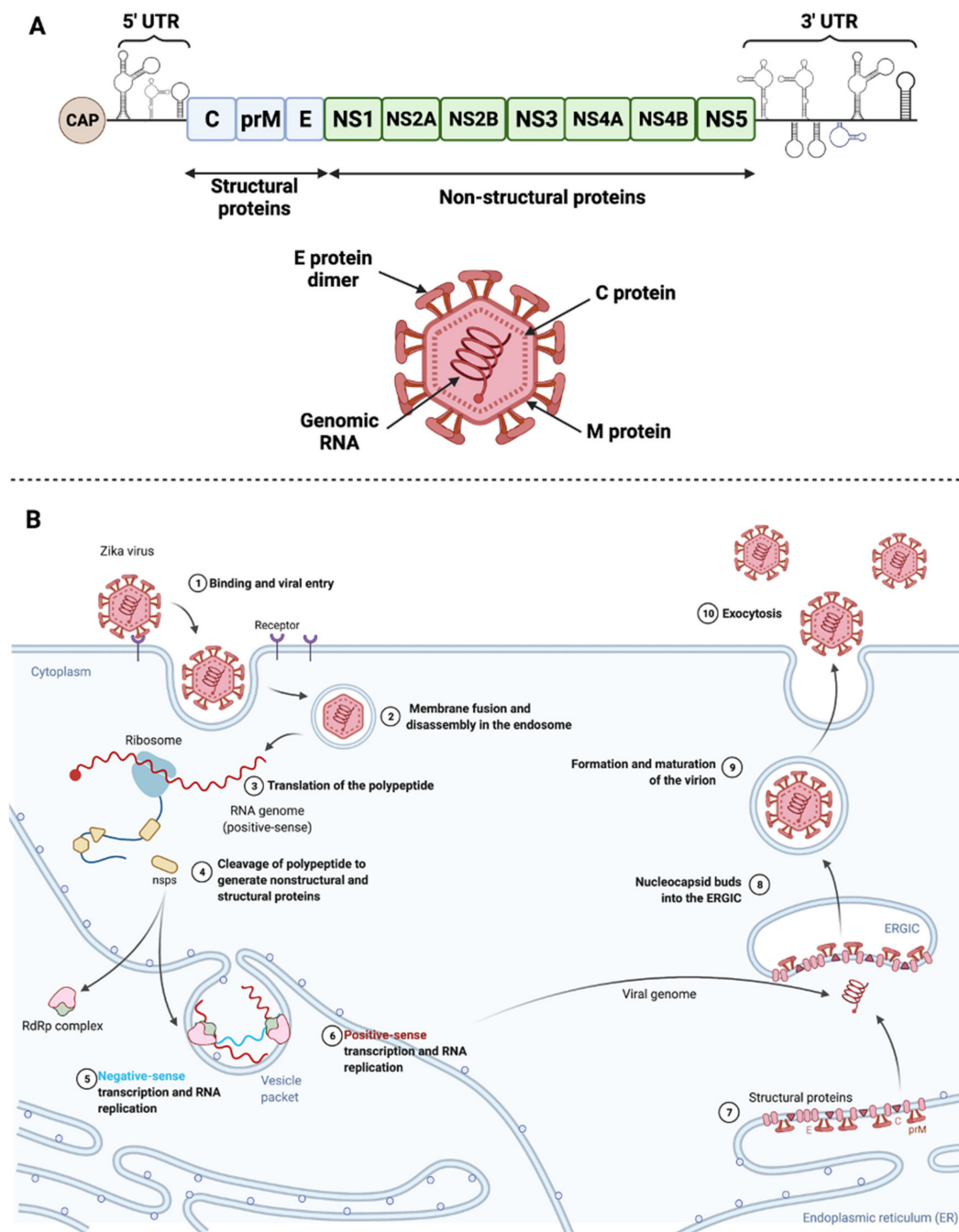


Figure 2. Zika virus structure and life cycle. (A) Scheme of Zika virus genome and structure. Zika virus genome encodes 10 viral proteins, three structural, and seven non-structural. 5' and 3' UTR refer to untranslated regions [65]. (B) ZIKV binds its specific receptors and is subsequently internalized into the target cell via clathrin-mediated endocytosis (1). Viral RNA is released into the cytoplasm following virus fusion with the endosomal membrane and capsid disassembly (2). Upon release, positive-sense RNA is translated into a polypeptide incorporated in the endoplasmic reticulum (ER) membrane and cleaved by proteases into structural and non-structural proteins (3,4). It will also be transcribed into negative-sense RNA that will serve as a template for RNA replication that takes place in ER vesicle packets (5,6). Viral proteins are accumulated and structured at the level of the ER (7). Virus assembly, budding, and maturation then occur in the ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) and in the Golgi apparatus, respectively (8,9). New viruses are released by exocytosis (10). Adapted from Lebeau et al. [66].

3.4. Zika Virus Tropism and Pathogenesis

Although not classified as an encephalitic flavivirus, ZIKV has been responsible for debilitating CNS disorders in neonates in the severe forms of infection described from 2013 in Polynesia and 2015 mainly in Brazil [68]. Most of the documented CZS mention hypoplasia of the cerebellum, delayed myelination, calcifications, and many cortical abnormalities [69]. ZIKV infection during the first or second trimesters of pregnancy also resulted in hearing loss and blindness in newborns [70]. In-vitro, ex-vivo, and in-vivo study models have been developed to understand the pathological processes behind these clinical outcomes.

Multiple strains of ZIKV of African or Asian-American origin have been isolated and used for the study of ZIKV tropism and pathogenesis. Some studies have used recent epidemic clinical isolates and other infectious clones for the analysis of (i) viral tropism and (ii) molecular determinants of pathogenesis [71]. Some teams [72,73] have reported in their reviews that ZIKV infection in mouse models (neonatal wild-type mice, adult immunocompromised *Ifnar1*^{-/-} mice) had reproduced the main features of the human disease including infection of the placenta and neuro-invasiveness, leading to reduced brain development and fetus size. Many studies have shown that in these models, the virus could accumulate in various organs such as the brain with associated damages, in the spinal cord, in eye associated tissues, male and female reproductive tracts, gonads, and kidneys. Neurotropic pathogenesis has been attributed to the depletion of neural progenitor cells; however, their infection does not appear to be the only cause of their loss [74–76]. In non-human primate models, infection also resulted in fetal brain lesions and ZIKV RNA was found in saliva and seminal fluids for at least three weeks after the end of viremia [76].

In the field of in-vitro models to investigate the interaction of the virus with its human host, Marazzo and colleagues recently reviewed how the development of neurosphere organoid cultures has provided insights into the specific neuropathological mechanisms of ZIKV [77]. The different studies that have been carried out using these models have confirmed that neuronal and neural progenitor cells were susceptible to ZIKV [78].

Finally, ZIKV was shown able, in-vitro and in-vivo, to infect trophoblasts, fetal endothelial cells of the placenta, placental macrophages (Hofbauer cells), and perivascular cells [79,80]. It has also been shown to infect a variety of cultured cells and cell lines of both fibroblast and epithelial origin [81].

4. Zika Virus and Apoptosis

As the cytopathic activity of the virus may explain the pathogenic processes and some clinical outcomes, many studies have evaluated the viral-induced forms of PCD in in-cellulo, ex-vivo, in-vivo, and in animal models of ZIKV infection. The onset timing of cytopathic effects and the search for markers specifying the virally mediated cell death were conducted and compared to the course of infection and completion of the viral cycle. Various apoptosis data obtained for different ZIKV strains and infection models have been compiled in Table 1. Hence, the main protagonists of apoptosis that are under the control of ZIKV are highlighted in Figure 3.

Table 1. Apoptotic induction in different biological models infected by ZIKV.

Virus Strain	Cellular Model	Apoptotic Cues	Apoptosis and ZIKV Infection Interplay	Reference
MR766: East African strain isolated from sentinel rhesus in Uganda in 1947 (Dick, Kitchen, and Haddow 1952)	HT1080 (Human epithelial cells derived from fibrosarcoma)	Apoptotic cell death markers were cleavage of Caspase 3 and PARP.	Apoptosis was shown to be delayed by inhibition of the JAK-STAT pathway by ZIKV NS2B/3 proteins.	[82]
Brazil 2015 (KU940228) Brazilian strain 2015 (Calvet et al., 2016)	hNPCs (Human Neural Progenitor cells)	Early apoptosis was induced at 24 h.p.i. with caspase 8, 9, and 3 activation. This viral strain was found to be highly deleterious to human neural progenitor cells.	Apoptosis was shown to limit viral production. This was reversed by the use of Z-VAD which induced an increase in intracellular viral RNA.	[83]
MR766	hNPCs	Apoptotic cell death was induced at 72 h.p.i. Caspase 3 expression was highly increased 3 d.p.i.	N.D.	[84]
cDNA encoding the E, prM-E and M-E proteins of the Haitian ZIKV strain (KU509998.3) isolated in 2014 (Lednicky et al., 2016)	PC12 cells (Rat pheochromocytoma cells)	Intrinsic mitochondrial pathway.	Envelope viral protein induces apoptosis by increasing BAX expression and decreasing Bcl-2 expression at the transcriptional and translational levels at 48 h.p.t.	[85]
H/PF/2013: French Polynesian 2013 clinical isolate (Cao-Lormeau et al., 2014)	A549 (Human Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell)	ZIKV induces mitochondrial apoptosis 48 h.p.i. by activating caspase 9 and 3.	Apoptosis is detected when the viral progeny reaches the peak.	[81]
MR766	HuH7 (Human hepatoma cell lines) and BCLX ^{KO} HuH7 cells	MCL1 expression decreases in cells infected with ZIKV while BCLXL expression is not affected. BCLXL down-regulation induces cell apoptosis.	Decreased MCL1 expression during ZIKV infection promotes viral replication in vitro.	[86]
H/PF/2013 MR766 and Brazil 2015 BeH819015 (molecular clones)	A549, U251MG (derived from a human malignant glioblastoma), HEK293 (Human embryonic kidney 293 cells)	ZIKV infection leads to mitochondrial apoptosis when most of the ZIKV progeny is released by the infected cells. (48 h.p.i),	ZIKV delays apoptosis in infected cells and confers protection against exogenous apoptosis induced by either intrinsic or extrinsic pathways.	[87]
PLCal ZV: Asian strain isolated in 2013 in Thailand (Ellison et al., 2016) PRVABC-59: Asian strain isolated in Puerto Rico in 2015 (Lanciotti et al., 2016)	HFAs (Human fetal astrocytes), A549	Late apoptosis was induced in ZIKV HFA infected cells. Under 50% of the infected HFAs exhibited apoptosis compared to more than 90% for A549 5 d.p.i. This indicates that HFAs are remarkably resistant to apoptosis induced by ZIKV.	Although HFAs have a strong antiviral response, it has been shown that they keep excreting ZIKV for up to 28 d.p.i.	[88]

Table 1. Cont.

Virus Strain	Cellular Model	Apoptotic Cues	Apoptosis and ZIKV Infection Interplay	Reference
MR766 (molecular clone) PRVABC-59	Primary human Sertoli cells	Less than 10% of Sertoli PRVABC59 infected cells are apoptotic versus around 70% of A549 infected cells at 72 h.p.i. These percentages are half as low when cells are infected with the MR766 strain. The low level of ZIKV-induced apoptosis detected in Sertoli cells explains the persistence of both American and African ZIKV strains in these cells.	The limited percentage of apoptosis observed in ZIKV-infected Sertoli cells allows the virus to replicate furthermore. The peak of viremia was detected between 3 and 4 d.p.i.	[89]
r-MRV (recombinant MR766 strain) PRVABC-59	HTR-8 cells (Human immortalized first-trimester placental trophoblast cells), JEG-3 and JAR (choriocarcinoma-derived third-trimester placental trophoblast cell lines)	Apoptosis was induced in all three cell lines at 48 h.p.i. CHOP upregulation and nuclear translocation were observed 24 h.p.i. Trophoblast induced-apoptosis involved activation of caspases, ER-Stress markers and most importantly JNK protein.	Apoptosis was strongly inhibited by the use of JNK inhibitors.	[90]
MR766, SZ01 (Asian strain, isolated in China in 2016)	hRPTEpiCs human renal proximal tubular epithelial cells	MR766 induced a higher degree of cell apoptosis (48 h.p.i.) compared to SZ01 (9 d.p.i.)	ZIKV persisted for more than 30 d.p.i within the hRPTEpiCs.	[91]

h.p.i.: hours post-infection. d.p.i.: days post-infection h.p.t.: hours post-transduction N.D.: not determined.

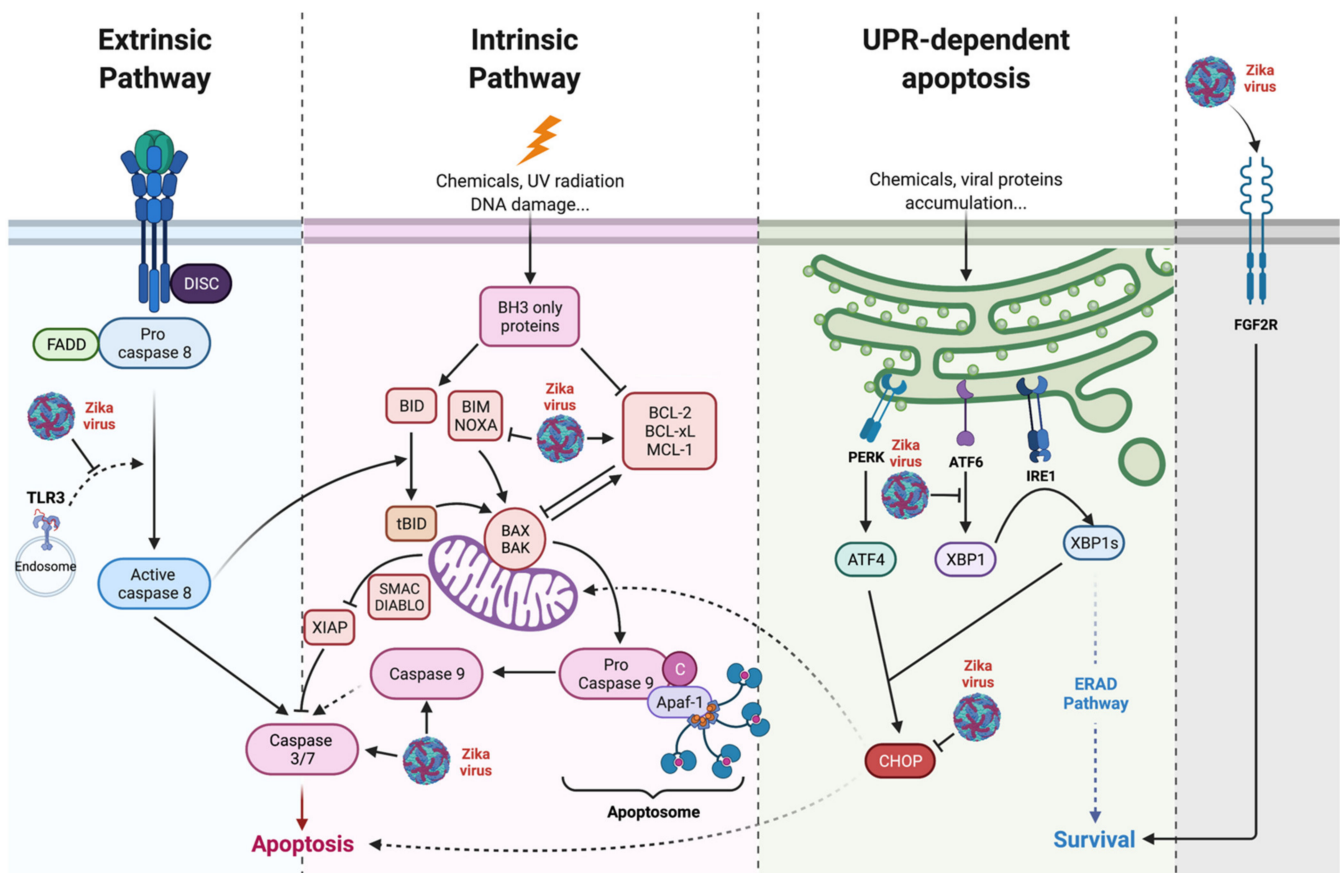


Figure 3. Zika virus controls apoptosis. ZIKV acts on anti-apoptotic factors such as Bcl-2 or Bcl-xL mainly through an effect mediated by the non-structural proteins. ZIKV controls CHOP activity during UPR, limiting its pro-apoptotic activity [92]. DsRNA/TLR3 induced apoptosis is controlled by ZIKV through NS2B/3 [82]. ZIKV also stimulates the expression of pro survival factors such as fibroblast growth factor 2 (FGF2) [88,93].

4.1. Is Early Apoptosis in Development Responsible for the Irreversible Damage Produced by ZIKV Infection?

Most of the studies carried out suggest that ZIKV elicits apoptosis *in vitro*, around 48- or 72-h post-infection in cultured cell models. We and others have thus evidenced the mitochondrial events typical of PCD by apoptosis and the implication of BAX and caspases in fibroblast HT1080, in epithelial cell lines such as A549, HEK 293 [81,94], in glioblastoma astrocytoma U-251 MG [95], and in neuroblastoma cell line SH-SY5 [96] and neural crest cells PC-12 [85].

Cells that may be key players in the unique pathogenic process of ZIKV, which depends on maternal–fetal transmission, blood–brain barrier crossing, or important points in the neurodevelopment, were specifically studied.

One of the main issues raised by the CZS observed during the last outbreaks was how ZIKV spread into the fetal compartment early in gestation and whether apoptosis could be involved in the process. The mechanisms of crossing the uterine–placental interface (UPI) by ZIKV have been extensively studied and reviewed. Many cell types of the UPI support ZIKV replication. Placental infection, associated cytopathic effects and injury were characterized *ex vivo*, in villus explants from the first-trimester of pregnancy, in primary cells isolated from placental tissues, and in several relevant cell-lines [97–100].

Santara et al. found that in the first-trimester placenta, infected trophoblasts under severe ER stress were being destroyed, particularly through direct killing by maternal decidual natural killer cells (dNK) [101]. Thus, Muthuraj et al. showed that human immortalized placental trophoblasts and human choriocarcinoma-derived cell lines responded

to infection by implementing an UPR-dependent apoptosis, with activation of JNK and that this feature could contribute in the dissemination of ZIKV from mother to fetus [90]. As above-mentioned (Section 2.2), virus-induced apoptosis may be the result of ER stress and unresolved UPR. During ZIKV infection, not all PERK, ATF6, and IRE1 pathways of the UPR are activated in the same way in all models [102,103]. It was found that ZIKV was actually able to control these responses during infection, acting *de facto* on the downstream UPR-dependent apoptosis. Thus, the ATF6 pathway appears to be little or not active, depending on the model and potentially inhibited during ZIKV infection [87,104–106]. If it is admitted that the IRE-1 pathway of UPR could activate apoptosis through JNK phosphorylation [107], an important factor in UPR-dependent-apoptosis is the transcription factor CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP), whose expression is directly linked to the PERK pathway [108]. However, if we and others have noticed a significant increase in the transcriptional expression of CHOP [104], there is a lack of information concerning the CHOP protein presence in ZIKV infected cells. Thus, in the A549 model, we showed that the CHOP factor and its pro-apoptotic translational program were not induced [92]. Assessment of its role in the virally induced UPR-dependent apoptosis is therefore difficult. Furthermore, the control that the virus may exert over this factor instead suggests that ZIKV deploys strategies to inhibit or delay apoptosis.

To complete the available data on the mechanisms of maternal–fetal transmission, it is also worth mentioning that a pro-inflammatory context, likely to alter the physical placental barrier function, a cell-to-cell infection process, and a Trojan horse role for infected Hofbauer cells would be the major causes of viral dissemination through the placenta and then to the fetus. It is therefore interesting to note that primary Hofbauer cells have been shown to be resistant to virus-induced cell death [109]. Furthermore, in contrast to the African strains, the Asian-American epidemic strains showed more frequent replication in Hofbauer cells, increased dissemination, and longer viremia, but with lower viral titers. It was then proposed that the African strains, which were found to be more cytotoxic, might induce a better immune response and less accessibility to crossing the maternal–fetal barrier [110]. The timing or extent of apoptosis in placental tissue could be an example of the dual action of ZIKV on cell death to improve its dissemination strategy.

To gain an insight into the pathophysiology of ZIKV in neurodevelopment, infections have been conducted in neuronal models. Apoptosis was then shown to be induced in human neural progenitors (hNPC) and associated with P53 and cell cycle impairments [111]. In addition, *in vitro* models of hNPC derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) were found to be susceptible to infection with mitosis abnormalities and cytopathic effects marked by caspase-3 activation [83].

Among the studies conducted *ex vivo*, sliced human fetal brain tissues from 14 to 21 weeks of gestation were infected with ZIKV. Activated caspase 3 and DNA fragmentation could be found in numerous infected and non-infected cells. Targeted cells were intermediate progenitor cells (IPCs) and post-mitotic neurons, confirming that ZIKV-induced neuropathogenesis could be the consequence of the disappearance of these cell populations [112].

Several *in vivo* study models support this assertion. In a mouse model of intracranial infection at different stages of embryonic development, co-immunoreactivity throughout the brain of cleaved caspase-3 and ZIKV are indicators of deleterious cell death [8]. In a recent study, oligodendrocyte loss in spinal cord and white matter has been linked to neurodevelopmental defects and perinatal ZIKV induced pathogenesis in mice [113]. In another chick embryo model, virus-induced apoptosis of cranial neural crest cells was shown to be responsible for aberrations in cranial osteogenesis and to lead to birth defects [114]. Finally, studies in pregnant non-human primate infection models revealed that neuroprogenitor apoptosis followed placental and fetal vascular compromise [115].

It should be noted that the study of ZIKV-induced patho-neuro-physiology has greatly benefited from the development of complex neurosphere and brain organoid models. Organoids are 3D cell cultures of self-organized progenitor cells that mimic the tissue

architecture and development [116]. Several studies on these models have shown a size reduction in ZIKV infected neurospheres and brain organoids and a depletion in neural progenitors [75,78,110].

Transcriptome analyses performed on infected hNPCs, SH-SY5Y neuroblastoma cells or brain organoids revealed that ZIKV modified the expression of several factors related to apoptosis, neuronal development, and differentiation [75,84,96,117,118]. ZIKV infection resulted in increased expression of BAX, BID, and APAF1 in SH-SY5Y [96,117]. Caspase-3 gene was overexpressed in hNPCs [84] such as BAX, Bcl-2, and genes involved in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) signaling and TRAIL-mediated apoptosis such as death receptors DR4 and DR5 [119]. ZIKV infection could increase cell susceptibility to extrinsic death, suggesting that a bystander cytotoxic effect in developing brain tissue should not be minimized. Among the molecular mechanisms that could lead to cell death, it has been shown that ZIKV was able to induce p53 activation and to inhibit the mTOR pathway with an early switch from glycolysis to oxidative phosphorylation [120]. The changes in cellular metabolism initiated by the virus at a vulnerable period of neuronal development would then be responsible for the defects in differentiation of immature neural stem cells and their exhaustion. Another study showed that an epidemic strain of ZIKV provoked cell cycle arrest in neural stem cells by activating the p53-p21 signaling pathway [121]. This suggests that in addition to cell death, ZIKV-induced neuropathogenesis could also be due to proliferation and differentiation failures.

As a first look at all the data linking cell death and post-infection pathophysiology, it seems that a consensus has emerged on the capacity of ZIKV to induce an excess of apoptosis too soon during the particular situation of gestation and fetal development. This cell death would occur at the level of placental cells, which would facilitate the dissemination of the virus to the fetus. Apoptosis would then concern the neuronal progenitors and astrocytes. It would be responsible for a depletion of neuronal populations and for definitive damage during the development of the fetal brain.

4.2. Is Delayed and Impaired Apoptosis Responsible for ZIKV Persistence and Unusual Transmission Pathways?

A delayed apoptosis controlled by ZIKV was supported by mathematical models [122] and experimental approaches. By comparing studies describing the onset of in vitro virus-induced apoptosis in different cell models (Table 1), it appears that ZIKV triggers a delay of this cellular response and that this delay is to its own benefits. In in vitro infection models of epithelial cells, the first cytopathic effects occur after the completion of the viral cycle and the release of the viral progeny [81,87]. This timing is very different from that produced by infection with other arboviruses of the alphavirus family such as Chikungunya virus (CHIKV) or Ross River virus (RRV) [87,123]. At equivalent multiplicities of infection in the same cell types, the latter induced apoptosis as early as 6h post-infection, whereas with ZIKV, the first signs of PCD were only visible 48 h post-infection. In their studies, Limonta and colleagues argued that astrocytes were infected by ZIKV with reduced cytopathic effects including apoptosis, probably through FGF-2 upregulation during infection [88,93]. Therefore, they hypothesized that a ZIKV-driven anti-apoptotic activity was correlated with long-term infection and with the persistence of replicating virus in astrocytes.

A body of evidence points to the ability of ZIKV to manipulate cell death in order to limit the antiviral action produced by the cell auto-destruction. Thus, several studies have shown that apoptosis has an antiviral effect on ZIKV. Addition of the pan-caspase inhibitor, zVAD-FMK during infection leads to an intracellular increase in viral RNA [83]. The use of inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 family proteins, triggered an earlier apoptosis in infected cells by ZIKV [86]. In the same publication, Suzuki and colleagues reported that HuH7 cells that were knocked out for the anti-apoptotic gene BclXL underwent an accelerated apoptosis with a suppressed viral dissemination. This was observed with ZIKV and other flaviviruses such as DENV and JEV. BclXL gene suppression led to a reduction in the viral loads in cells and animal models. Last but not least, this apoptosis remediation also

increased animal survival in JEV infected mouse models. Suzuki and co-authors concluded from their study that delayed apoptosis was associated with high viral pathogenicity, whereas early apoptosis combined with accelerated efferocytosis inhibited viral spread in the body and limited pathogenicity.

In the case of ZIKV infection and its unique pathogenesis with neurological complications, the role of anti-apoptotic factors and the control of their expression or activity by the virus have been examined. A clinical study of cases of fatal microcephaly found that the parenchyma of infected newborns had a two-fold increase in the anti-apoptotic Bcl-2 protein. This feature appears to be specific to CZS as microcephalies of other origin do not have variation in Bcl-2 expression [124]. Based on the observation that ZIKV seemed to be able to counteract apoptosis, our team had the idea of testing the protection that the virus could offer to cells against an exogenously induced apoptosis. Surprisingly, cell death hallmarks could not be observed in A549 cells when apoptosis was artificially induced two hours after infection with ZIKV. Inhibition of cell death in the presence of ZIKV was achieved whether the induction of apoptosis was extrinsic, with TNF-alpha, or intrinsic, with etoposide or blasticidin. This protection from exogenous apoptosis was potentially dependent on the presence of ZIKV non-structural proteins [87]. In addition, another study indicates that double-stranded RNA (Poly I:C) induced apoptosis is reduced by overexpressing the ZIKV NS2B/3 non-structural proteins [82].

We investigated which protagonists of apoptosis ZIKV was able to act upon and also observed that the amount of anti-apoptotic protein Bcl-2 was increased during in vitro infection. A privileged role for the Bcl-2-family of anti-apoptotics was confirmed by the use of the inhibitor ABT-737, which abrogated ZIKV-mediated protection, led to restoration of apoptosis, and reduced viral infection [87]. As previously mentioned, we also found that ZIKV was able to subvert the CHOP pro-apoptotic program and thus override ER-dependent apoptosis [92].

This viral ability to inhibit one of the main cellular defense responses to infection legitimately raises the question of its effect on the outcome of infection and, if unsuccessful, the possibility that the virus will not be properly eliminated. There is an extensive literature on the strategies developed by infectious agents to manipulate apoptosis and the link between impaired apoptosis, deficiencies in viral clearance, and viral persistence in privileged niches [125–128]. Numerous studies on the mechanisms and issues of ZIKV infection have revealed that the virus can indeed persist for a long time after the primary infection.

Initially puzzling to the scientific community, a first case of sexual transmission of ZIKV was reported in 2011 [129]. The confirmation that this route of transmission was far from anecdotal, and observed with both Asian and African strains of ZIKV raised the possibility that ZIKA could persist in the male reproductive organs [10]. Indeed, viral RNA have been detected in semen for up to six months post infection, suggesting that men may therefore act as potential reservoirs of ZIKV [130]. Reproductive tract and testis certainly offer a suitable immune-privileged environment for ZIKV persistence.

High-level and persistent viremia could also be observed for up to 15 days after the onset of infection symptoms. Several cell types of the infected renal tissue such as glomerular cells or renal proximal tubular epithelial cells (hRPTEpiCs) may be susceptible as reservoirs for long-term excretion of ZIKV in urine [91,131].

The maintenance of viral replication in these different cells, whether or not associated with their survival and incomplete apoptosis, deserves further investigation.

Then, the first clinical indications that the virus might also persist in the CNS were given when worrying cases of neurological complications were reported in infants a long time after their birth and their in-utero exposure to ZIKV [132,133].

In conclusion, a body of evidence indicates that ZIKV manipulates apoptosis, which is an adverse response of the cell to virus multiplication. This ability could account for the persistence of the virus in immunoprivileged niches. Inhibited or delayed apoptosis and viral persistence could influence pathogenesis and could explain the unique features of

ZIKV infection. These main singularities are the non-vectorial routes of transmission and the ability to induce neuropathogenesis long after infection.

4.3. Apoptosis in the Mosquito Vectors

In mosquito cells, arbovirus infections rarely cause cytopathic effects, and the limited data currently available assessing the role of apoptosis in vector competence suggests that apoptosis is detrimental to the virus. Virus/vector interactions appear to have co-evolved by limiting apoptosis, probably to an initial regulation by non-retroviral integration RNA virus sequences (NIRVS) and the piRNA antiviral pathway [134]. In invertebrate cells infected with Zika virus, very few, if any, cytopathic effects are observed [135]. Furthermore, it seems that sfRNA from ZIKV could inhibit apoptosis whereas sfRNA mutants showed increased TUNEL positive cells in-vivo. Adding caspase inhibitors rescued a 'wild type' virus transmission rate in a sfRNA mutant, showing that apoptosis decreases the transmission rate in mosquitoes [136]. This confirms previous studies on arboviruses and apoptosis in mosquitoes [137].

Infection with ZIKV leads, in particular, to a reprogramming of cellular glucose metabolism in a human cell model by enhancing ATP production via the use of the tricarboxylic acid cycle [26]. In contrast, during infection of mosquitoes' cells, ZIKV increased the use of glucose through the pentose phosphate pathway. Thus, this differential reprogramming of glucose metabolism changes the cellular ratio of AMP/ATP, which leads to the differential status of the AMPK phosphorylation level between mosquitoes and humans during ZIKV infection. The AMPK activation in human cells contributes to caspase-mediated cell death, and conversely, low activation of AMPK in mosquitoes' cells prevents apoptosis [26].

All of these different apoptosis control mechanisms are important for vector competence, and thus virus spread between mosquitoes and humans.

5. Therapeutics Related to ZIKV, A Role for Apoptosis?

In addition to preventive measures, which mainly involve personal protection against mosquito bites, it is essential to respond to the Zika threat by developing treatments and vaccines. Currently, we have neither one nor the other, although a vaccine candidate using mRNA technology has recently shown promising results in mice [138]. The development of anti-ZIKV drugs must take into consideration several specificities such as the passage of the virus in immune-privileged sites (central nervous system, placenta, gonads) and it must be adapted for the particularly fragile target of pregnant women or women planning a pregnancy.

One approach to containing the infection is to fight the virus early by acting on the virus particle itself or at a particular stage of the viral cycle (entry, replication). Unfortunately, although many studies have been carried out and have proposed molecules with promising effects in vitro, no validated treatment has yet been improved [139–141].

Alternative strategies focus on enhancing the natural antiviral responses of host cells by repurposing already known active therapeutic molecules. Trials using the proteasome inhibitor bortezomib have demonstrated antiviral activity in in vivo models and have provided some hope [142,143]. The advantage of targeting host responses is to limit the risk of the emergence of treatment-resistant viral variants, as has been observed with nucleotide analogues [144,145].

5.1. Antiviral Treatment through Apoptosis Remediation

Based on the observation that many viruses, and this is the case of ZIKV, manipulate the cell death response and that this capacity contributes to infectious processes (outcome, pathogenesis, viral persistence), therapeutic options using apoptosis remedial action have been explored. The underlying idea is that restoring apoptosis can improve or accelerate the resolution of infection and free the body from potential virus persistence [146]. Apoptosis sensitizers such as inhibitors of the Bcl-2 family or molecules mimicking suppressors

of apoptosis inhibitors (synthetic SMAC/DIABLO proteins) have thus been tested as antiviral candidates [147]. From this theory of a 'functional reactivation of apoptosis' during infection, an antiviral strategy caused a sensation in 2011. By combining the double-stranded RNA recognition domain of the PKR protein and the caspase interaction domain (CARD) of the Apaf1 protein, the technology called double-stranded RNA (dsRNA) activated caspase oligomerizer (DRACO) showed broad-spectrum antiviral activity and lack of toxicity in murine, human, and in vivo non-human primate cells [148]. It resulted in an 80% reduction in mortality in a mouse model of H1N1 A/PR/8/34 infection. Following the same idea, the antiviral therapeutic potential of molecules known to act by reactivating apoptosis in cancer pathologies was tested on ZIKV infection, with the project of a possible drug repositioning. One study successfully evaluated the anti-ZIKV activity of the anti-cancer obatoclax or GX15-070, a pan-blocker of the Bcl-2 family of proteins [149]. It should be noted that the use of inhibitors of Bcl-2 family proteins had previously been validated for their capacity to inhibit several viruses other than ZIKV, in in vitro and in vivo studies [147].

5.2. ZIKV as Oncolytic Virotherapy

Interestingly, ZIKV has been considered as an oncolytic candidate, notably for therapy of brain cancer [150]. The modes of action of ZIKV on the tumor and the advantages and disadvantages of using this virus, which may be genetically modified, are summarized in Figure 4. Briefly, oncolytic viruses are replicative viruses capable of specific replication in cancer cells. These biological agents have cancer therapeutics potential due to their ability to induce selective tumor cell death through direct cytopathic effects. They induce an immunogenic cell death similar to apoptosis, which releases cell debris and viral antigens. Dendritic cells from the microenvironment will then allow the immune system to be educated against the tumor [151,152]. Countering the frequent immune escape phenomena induced by the tumor microenvironment is therefore one of the major goals of new anti-cancer therapies. Showing the important potential of this type of treatment, the FDA already approved the use of Talimogene Laherparepvec (T-VEC), a modified herpes simplex virus type I, for metastatic melanoma management [151].

As aforementioned, ZIKV has a privileged tropism for neuronal cells in which it produces cytopathic effects [83,111]. This specificity is due to the high level of neuronal expression of the main known ZIKV membrane receptors such as AXL or CD24. Interestingly, these receptors are overexpressed in cancer cells. Due to this ability, ZIKV has been proposed as a promoter of tumor mass reduction for some brain cancers (e.g., glioblastoma multiforme (GBM) and neuroblastoma). Indeed, in 2017, a selective oncolytic activity was shown against glioma stem cells (GSCs) [153], which are therapy-resistant self-renewing tumor precursor cells responsible for the local recurrence of cancer. ZIKV infection in these cells leads to a loss of self-renewal and proliferation due to increased apoptosis, whereas no detrimental effects were observed on normal cells. However, this feature is not a general property of neurotropic flaviviruses, since WNV causes the cell death of GSCs and normal cells. In order to confirm these promising results and show the usefulness of ZIKV as a therapy to treat brain cancer, the authors used a mouse model of glioma. Mice receiving ZIKV injection showed prolonged survival in comparison to mock-infected mice due to extensive tumor cell death.

Consistent with these results, intracerebral injection of a live attenuated Zika virus (ZIKV-LAV) in a mouse model of human GBM significantly reduced intracerebral tumor growth and prolonged animal survival by selectively killing SOX2+ GSCs within the tumor [154]. Recently, the same team reported some details on the mechanism underlying ZIKV oncolytic activity against GSCs [155]. They found out that SOX2 expression in GSCs leads to downregulation of the IFN signaling pathway, this being essential for ZIKV infection and replication in GSCs. Indeed, SOX2 is a core regulator of antiviral response and apoptosis, and is found to be highly expressed in GSCs, which partly explains the preferential lytic effect on GSCs. Moreover, SOX2 has also been associated with the regulation of Integrin α V expression. Integrin α V forms heterodimers, notably with Integrin

$\beta 5$, whose blockade with specific antibodies has led to reduced ZIKV-induced oncolytic effects on GSCs. Thus, the SOX2–Integrin $\alpha V\beta 5$ axis seems to be crucial for oncolytic activity against GSCs, and therefore GBM treatment.

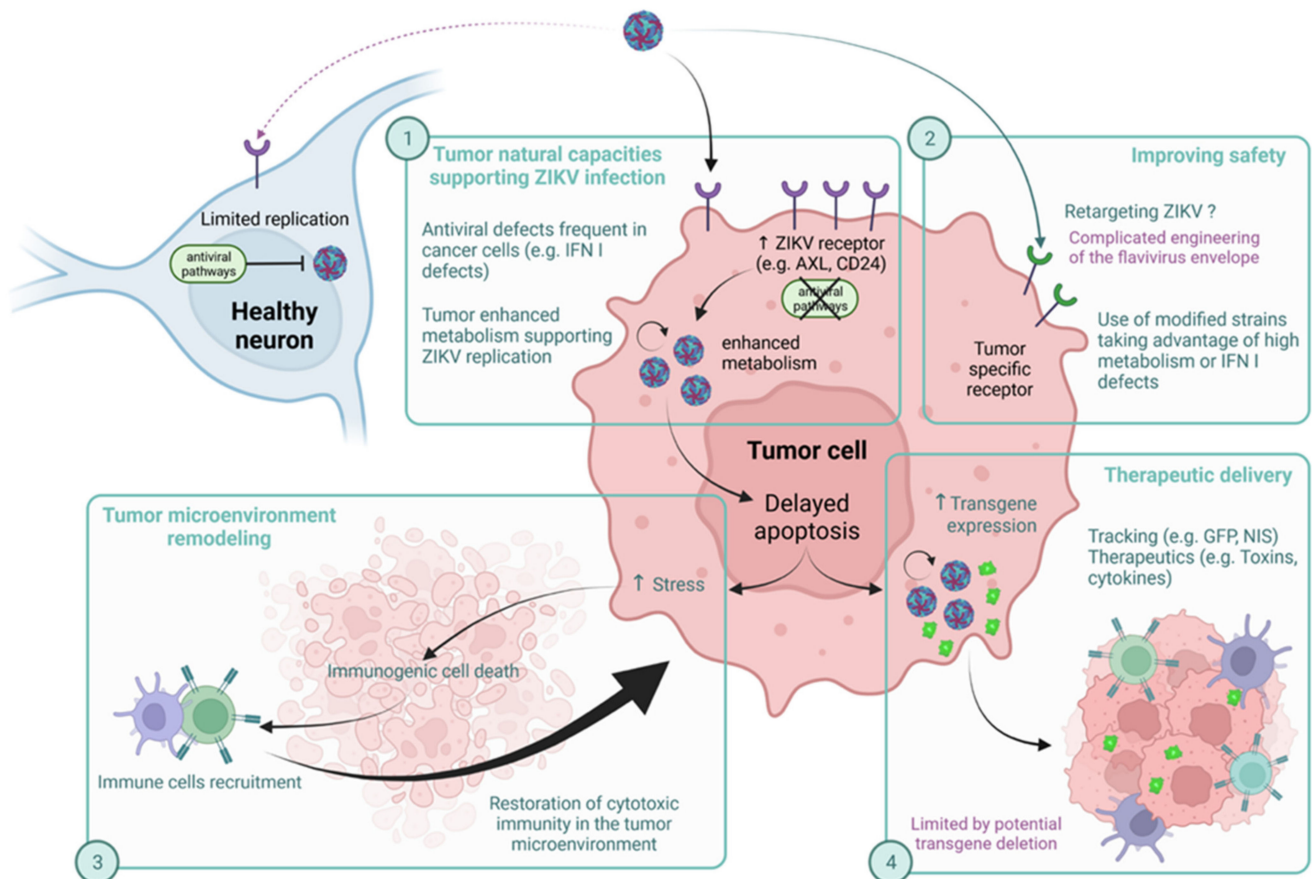


Figure 4. Zika as an oncolytic agent, pros and cons. ZIKV has natural tropism for neurons but its replication is counteracted by antiviral pathways. Tumor cells overexpress receptors for viral entry, have a high metabolism that efficiently supports ZIKV replication, and have frequent defects in antiviral pathways. These natural capacities enhance viral infection (1). To further improve its tropism toward the tumor, ZIKV could be modified to specifically target tumor cell receptors or to be more dependent on the tumor's singular properties (2). Delayed apoptosis induced by ZIKV replication allows for a more immunogenic cell death, which can turn an immunosuppressive tumor microenvironment into an immunoactivating one (3). Delayed apoptosis also promotes transgene expression allowing for more efficient delivery of therapeutics (4).

It has also been shown that ZIKV oncolytic activity requires CD8⁺ T cell recruitment to the tumor microenvironment, as the survival benefits are lost if CD8⁺ T cells are depleted [156]. ZIKV infection enhances immune infiltration, which is favorable for combination with an anti-PD1, an immune checkpoint inhibitor to remove microenvironment-induced T-energy. Moreover, this education of CD8 by ZIKV-induced tumor cell death persists over time. Hence, they protect mice against syngeneic tumor rechallenge. Additionally, neuroblastoma cells' permissiveness for Zika virus has been reported [157]. In neuroblastoma cells, ZIKV-induced cytopathic effects lead to a decrease in tumor cell viability. Nevertheless, not all neuroblastoma cell lines were sensitive to ZIKV oncolytic activity. It was shown that CD24 expression, a receptor expressed on the surface of metabolically active cells including cancer cells [158] is essential to ZIKV oncolytic activity [157]. Restoring CD24 (SK-N-AS) expression in a low-permissive neuroblastoma cell line restores ZIKV oncolytic activity, unlike the CD24-deficient cell line. CD24 is rather a brake on

apoptosis, which could promote ZIKV replication in metabolically active cells and consequently induce a better immunogenicity [152,158]. Therefore, ZIKV seems to be a powerful tool for the treatment of brain cancers that are of critical concern. As raised by several teams [151,154,155], the use of ZIKV as oncolytic therapy can only be considered if the safety conditions are met. Data currently available from these studies indicate that viral RNA remained localized to the tumor until two weeks after treatment, showing the absence of viral spread following injection [153].

However, as discussed above, ZIKV can persist in the body and has a broad tissue tropism. There is therefore concern that it may affect several organs other than the target tumor. These issues could be circumvented by improving ZIKV specificity to tumor cells. Indeed, receptors essential for ZIKV entry such as AXL and CD24 that are overexpressed in glioblastoma and neuroblastoma cancer cells, respectively, are also present on many other cell types [158,159]. Thus, addressing ZIKV to a specific receptor on tumor cells would reduce its entry into healthy cells. Technically, modifications can be made to the viral genome to fine-tune its oncolytic capabilities. However, engineering the viral envelope to control the interaction of the viral particle with the cell surface is difficult to design and implement. If retargeting is not possible or not sufficient, another option is to increase the dependence of the virus on the singular properties of the tumor cells. Indeed, it would be possible to make the virus more conditional on the specific enhanced metabolism of the tumor cell, as is the case for the vaccinia virus TK-RR- [160] (or the measles virus vaccinal strain [161]). Genetically-modified ZIKV strains should then be envisaged to further improve the safety of a ZIKV based oncolytic virotherapy [153,154].

Finally, and regarding the ambiguity revealed by our literature review on the ability of ZIKV to promote apoptosis too early or too late, it would appear that delayed or attenuated cell death is not a pitfall, but may be an advantage in oncolytic therapy. Thus, cytolytic effects on infected cells, by being delayed, will promote immunogenicity with a progressive and sustained recruitment of immune cells [156,162]. This mechanism is decisive in overcoming immunosuppression induced by the tumor environment, one of the main strengths of virotherapy. It should also be noted that the possibilities of manipulating oncolytic viruses have led to their proposal as vectors for therapeutic agents such as T-VEC, which encodes for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to increase its immunostimulant properties [163]. In this context, a virus with persistent replication still has an advantage in that it can increase the production of the therapeutic protein over time. In addition, delayed apoptosis becomes an advantage for this vectorization process. Whether strictly for oncolytic purposes or as a genetic backbone for the delivery of a recombinant therapeutic agent, this ability of ZIKV to induce delayed cell death makes it a potentially good vector for antitumor therapy. However, these beneficial effects may be mitigated by the ability of ZIKV to persist in some tissues, with detrimental effects on patients. Despite this, studies have shown that, in dogs with glioblastoma, the use of a Brazilian ZIKV reduced tumor size and did not induce clinical side effects [164]. Further research is needed to decipher the potential of ZIKV as an oncolytic treatment for brain cancers [153,154].

6. Discussion and Conclusions

In the last decade, a series of epidemics has put global human health at risk. This pressure is due to the threat of mainly viral pathogens that do not spare any region, regardless of the economic levels or medical capacities of countries. In this context, better knowledge of infectious agents, their mechanisms of dissemination/transmission in the environment, and their interactions with their hosts, particularly humans, is essential. This is necessary to face the risks of viral emergence or re-emergence as well as current and future epidemics and pandemics. Understanding the mechanics of host–pathogen interactions at the cellular and molecular levels is also essential for the development of preventive and/or therapeutic strategies. Among the cellular and molecular responses that are crucial for eliminating the pathogen, but that may also be involved in pathological

processes is cell death by apoptosis. Just as humans evaluate the benefits and risks of an action, the cell must make a choice between survival and self-killing to resolve an infection. The decision to commit suicide is based on a precise control of pro-apoptotic and anti-apoptotic factors. The process of ZIKV infection seems to be a wonderful example of manipulation of this pro-death or survival balance of the host cell.

ZIKV, similar to other flaviviruses (such as JEV, DENV or WNV), is capable of inducing apoptosis in various types of infected cells. Therefore, an excess of placental cell apoptosis, early in gestation, seems to be one of the main causes of horizontal maternal–fetal transmission. Dissemination of the virus into fetal tissues, infection of the brain, and early apoptosis of neuronal progenitors seem to be involved in Zika pathology and SCZ development (Figure 5).

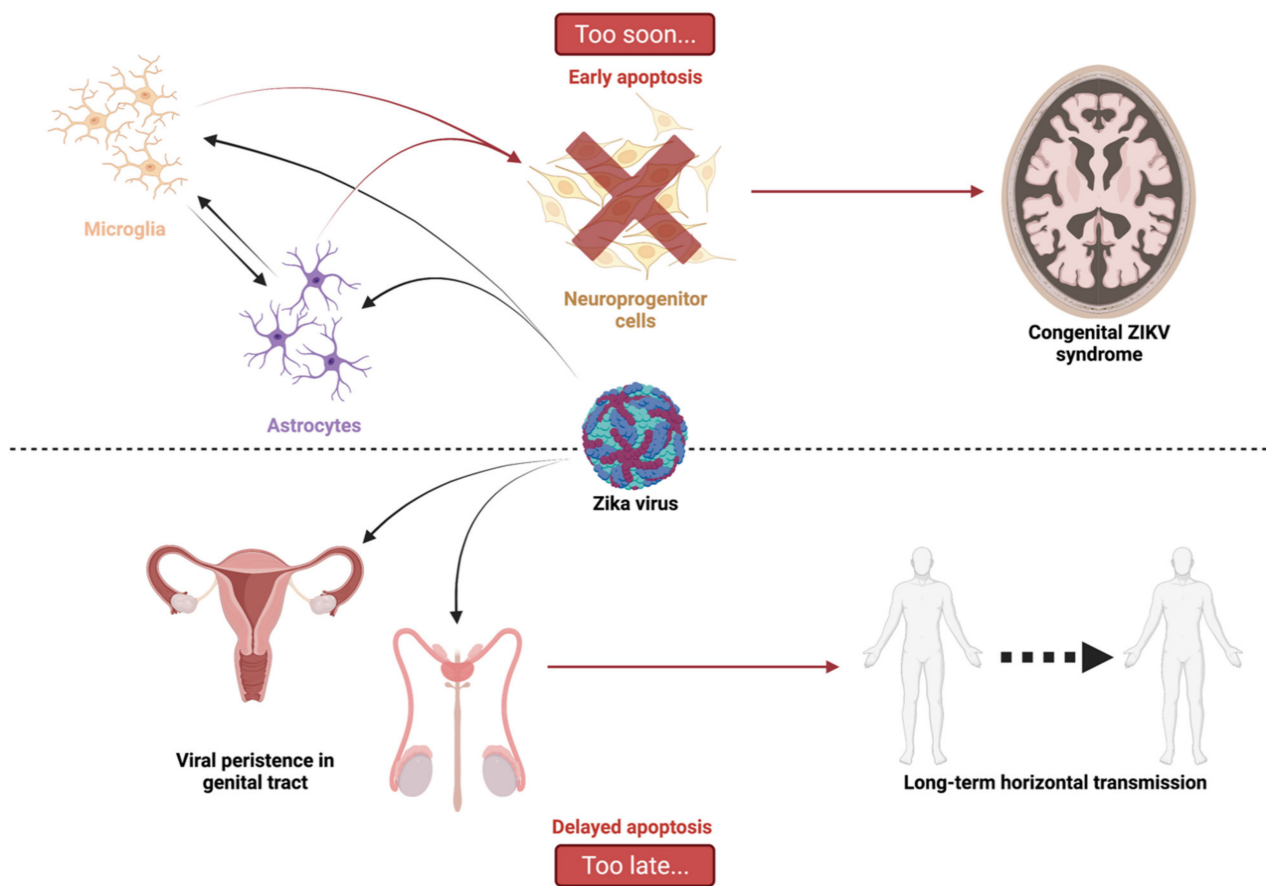


Figure 5. Too soon or too late, graphical abstract. ZIKV-related apoptosis is ambivalent. On one hand, the virus transmission to the central nervous system via microglia and astrocytes induces early apoptosis of neuroprogenitor cells. This leads to a set of symptoms and defects grouped under the term of ZIKV congenital syndrome. On the other hand, ZIKV has been shown to persist for a while in infected organisms due to delayed apoptosis. Persisting in the genital tract could lead to sexual transmission that is unusual for an arbovirus.

Conversely, cell death by apoptosis has been shown to occur late in many cell types. This delay in the onset of cell death involves anti-apoptotic proteins such as Bcl-2, whose stability and half-life are increased by a mechanism that remains to be defined. It also involves a defect in the induction of the expression of pro-apoptotic factors (BIM, PUMA, NOXA...) that are cruelly lacking to tip the balance. This defect is in part due to the ability of ZIKV to ‘hack’ the communication pathway between ER stress, UPR, and apoptosis by inhibiting the CHOP factor. Other studies have described that paraptosis is sometimes induced by ZIKV, with hyper vacuolation of cells without caspase activation. This could be

in place of apoptotic death and apparently allows the virus to replicate more abundantly in the cell [165]. This confirms that apoptosis is detrimental to the virus and this raises the question of the impact of delayed apoptosis on pathophysiological processes and viral persistence following ZIKV infection. A persistence capacity of ZIKV is established. The virus, which remains in the genital tract and is secreted for a long time in the semen, is the cause of sexual transmission (Figure 5). In addition to the complications observed in newborns, the evidence of neuropathologies in children after birth [132] raises questions about the mechanisms involved long after the acute infection. Recent work also suggests that ZIKV exposure may contribute to the development of neurodegenerative pathologies in adults in the longer term [103,166]. Of note, data on microcephalic brains of ZIKV-infected neonates have shown an increase in Bcl-2 protein, opening up the hypothesis of viral persistence mediated by overexpression of anti-apoptotic proteins [124]. Taken together, these insights into ZIKV infection confirm the interest in understanding the mechanisms of apoptosis control. This understanding is important for the development of antiviral therapies based on the restoration of the ability of infected cells to die. It could also be useful in the fight against late-onset forms of Zika. This understanding is ultimately important for considering the use of this singular virus in oncolytic virotherapy.

Author Contributions: Conceptualization, P.K.-T. and W.V.; Methodology; resources; writing—original draft preparation, J.T., D.E.S., G.L., M.K. and C.C.; Figure drawings, G.L., M.K. and C.C.; Writing—review and editing, P.K.-T.; Visualization, P.K.-T. and W.V.; Supervision, P.K.-T.; Funding acquisition, P.D., P.K.-T. and W.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the ZIKAlert project (European Union-Région Réunion program under grant agreement no. SYNERGY: RE0001902, with P.D. as project leader) and was supported by the Federation BioST from Reunion Island University by the Zikapone project (with P.K.-T. as project leader). J.T. has a PhD degree scholarship from Réunion University (Ecole doctorale STS) funded by DIREC/2021-0161. G.L. and D.E.S. hold a fellowship from the Regional Council of Reunion Island (European Union-Région Réunion). C.C. and M.K. have a PhD degree scholarship from Nantes University (Ecole doctorale BS) funded by the French ministry MEESR.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

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

Abbreviations

ZIKV	Zika virus
PCD	Programmed cell death
CNS	Central Nervous System
ER	Endoplasmic Reticulum
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
APAF-1	Apoptosis protease activating factor 1
PARP	Poly ADP-ribose polymerase
DISC	Death inducing signaling complex
UPR	Unresolved unfolded protein response
CHOP	C/EBP HOMologous Protein
BHV	Bovine herpesvirus 1
DENV	Dengue virus
WNV	West Nile virus
JEV	Japanese encephalitis virus
HSV	Herpes simplex virus HSV
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein
WHO	World Health Organization

CDC	Center for disease control
CZS	Congenital Zika syndrome
sfRNA	Small flavivirus RNA
CHIKV	Chikungunya virus
RRV	Ross River virus

References

- Weaver, S.C.; Costa, F.; Garcia-Blanco, M.A.; Ko, A.I.; Ribeiro, G.S.; Saade, G.; Shi, P.-Y.; Vasilakis, N. Zika Virus: History, Emergence, Biology, and Prospects for Control. *Antivir. Res.* **2016**, *130*, 69–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Krauer, F.; Riesen, M.; Reveiz, L.; Oladapo, O.T.; Martínez-Vega, R.; Porgo, T.V.; Haefliger, A.; Broutet, N.J.; Low, N.; Group, W.Z.C.W. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review. *PLOS Med.* **2017**, *14*, e1002203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Plourde, A.R.; Bloch, E.M. A Literature Review of Zika Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jorgensen, I.; Rayamajhi, M.; Miao, E.A. Programmed Cell Death as a Defence against Infection. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 151–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Thomson, B.J. Viruses and Apoptosis. *Int. J. Exp. Pathol.* **2001**, *82*, 65–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gregory, C.D.; Devitt, A. The Macrophage and the Apoptotic Cell: An Innate Immune Interaction Viewed Simplistically? *Immunology* **2004**, *113*, 1–14. [[CrossRef](#)]
- Thimme, R.; Oldach, D.; Chang, K.-M.; Steiger, C.; Ray, S.C.; Chisari, F.V. Determinants of Viral Clearance and Persistence during Acute Hepatitis C Virus Infection. *J. Exp. Med.* **2001**, *194*, 1395–1406. [[CrossRef](#)]
- Huang, W.-C.; Abraham, R.; Shim, B.-S.; Choe, H.; Page, D.T. Zika Virus Infection during the Period of Maximal Brain Growth Causes Microcephaly and Corticospinal Neuron Apoptosis in Wild Type Mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34793. [[CrossRef](#)]
- Ximenes, R.; Ramsay, L.C.; Miranda, R.N.; Morris, S.K.; Murphy, K.; Sander, B. Health Outcomes Associated with Zika Virus Infection in Humans: A Systematic Review of Systematic Reviews. *BMJ Open* **2019**, *9*, e032275. [[CrossRef](#)]
- Stassen, L.; Armitage, C.; van der Heide, D.; Beagley, K.; Frentiu, F. Zika Virus in the Male Reproductive Tract. *Viruses* **2018**, *10*, 198. [[CrossRef](#)]
- Meier, P.; Finch, A.; Evan, G. Apoptosis in Development. *Nature* **2000**, *407*, 796–801. [[CrossRef](#)]
- Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **1972**, *26*, 239–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shalini, S.; Dorstyn, L.; Dawar, S.; Kumar, S. Old, New and Emerging Functions of Caspases. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 526–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bender, T.; Martinou, J.-C. Where Killers Meet—Permeabilization of the Outer Mitochondrial Membrane during Apoptosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a011106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kale, J.; Osterlund, E.J.; Andrews, D.W. BCL-2 Family Proteins: Changing Partners in the Dance towards Death. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 65–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhou, M.; Li, Y.; Hu, Q.; Bai, X.; Huang, W.; Yan, C.; Scheres, S.H.W.; Shi, Y. Atomic Structure of the Apoptosome: Mechanism of Cytochrome c—And DATP-Mediated Activation of Apaf-1. *Genes Dev.* **2015**, *29*, 2349–2361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Malladi, S.; Challa-Malladi, M.; Fearnhead, H.O.; Bratton, S.B. The Apaf-1•procaspase-9 Apoptosome Complex Functions as a Proteolytic-Based Molecular Timer. *EMBO J.* **2009**, *28*, 1916–1925. [[CrossRef](#)]
- Tummers, B.; Green, D.R. Caspase-8: Regulating Life and Death. *Immunol. Rev.* **2017**, *277*, 76–89. [[CrossRef](#)]
- Stennicke, H.R.; Jürgensmeier, J.M.; Shin, H.; Deveraux, Q.; Wolf, B.B.; Yang, X.; Zhou, Q.; Ellerby, H.M.; Ellerby, L.M.; Bredesen, D.; et al. Pro-Caspase-3 Is a Major Physiologic Target of Caspase-8. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27084–27090. [[CrossRef](#)]
- Wang, C.; Youle, R.J. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* **2009**, *43*, 95–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sano, R.; Reed, J.C. ER Stress-Induced Cell Death Mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* **2013**, *1833*, 3460–3470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Xu, X.; Zhang, K.; Huang, Y.; Ding, L.; Chen, G.; Zhang, H.; Tong, D. Bovine Herpes Virus Type 1 Induces Apoptosis through Fas-Dependent and Mitochondria-Controlled Manner in Madin-Darby Bovine Kidney Cells. *Virol. J.* **2012**, *9*, 202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- El-Bacha, T.; Midlej, V.; Pereira da Silva, A.P.; Silva da Costa, L.; Benchimol, M.; Galina, A.; Da Poian, A.T. Mitochondrial and Bioenergetic Dysfunction in Human Hepatic Cells Infected with Dengue 2 Virus. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* **2007**, *1772*, 1158–1166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jordan, T.X.; Randall, G. Flavivirus Modulation of Cellular Metabolism. *Curr. Opin. Virol.* **2016**, *19*, 7–10. [[CrossRef](#)]
- Thaker, S.K.; Ch'ng, J.; Christofk, H.R. Viral Hijacking of Cellular Metabolism. *BMC Biol.* **2019**, *17*, 59. [[CrossRef](#)]
- Wang, Q.; Xin, X.; Wang, T.; Wan, J.; Ou, Y.; Yang, Z.; Yu, Q.; Zhu, L.; Guo, Y.; Wu, Y.; et al. Japanese Encephalitis Virus Induces Apoptosis and Encephalitis by Activating the PERK Pathway. *J. Virol.* **2019**, *93*, e00887-19. [[CrossRef](#)]
- Johnston, B.P.; McCormick, C. Herpesviruses and the Unfolded Protein Response. *Viruses* **2019**, *12*, 17. [[CrossRef](#)]

29. Mukherjee, S.; Singh, N.; Sengupta, N.; Fatima, M.; Seth, P.; Mahadevan, A.; Shankar, S.K.; Bhattacharyya, A.; Basu, A. Japanese Encephalitis Virus Induces Human Neural Stem/Progenitor Cell Death by Elevating GRP78, PHB and HnRNPC through ER Stress. *Cell Death Dis.* **2018**, *8*, e2556. [[CrossRef](#)]
30. Cateau, A.; Roué, G.; Yuste, V.J.; Susin, S.A.; Desprès, P. Expression of Dengue ApoptoM Sequence Results in Disruption of Mitochondrial Potential and Caspase Activation. *Biochimie* **2003**, *85*, 789–793. [[CrossRef](#)]
31. Vanwalscappel, B.; Haddad, J.G.; Almokdad, R.; Decotter, J.; Gadea, G.; Desprès, P. Zika M Oligopeptide ZAMP Confers Cell Death-Promoting Capability to a Soluble Tumor-Associated Antigen through Caspase-3/7 Activation. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Pan, Y.; Cheng, A.; Wang, M.; Yin, Z.; Jia, R. The Dual Regulation of Apoptosis by Flavivirus. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 654494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Okamoto, T.; Suzuki, T.; Kusakabe, S.; Tokunaga, M.; Hirano, J.; Miyata, Y.; Matsuura, Y. Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. *Viruses* **2017**, *9*, 243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Long, X.; Li, Y.; Qi, Y.; Xu, J.; Wang, Z.; Zhang, X.; Zhang, D.; Zhang, L.; Huang, J. XAF1 Contributes to Dengue Virus-Induced Apoptosis in Vascular Endothelial Cells. *FASEB J.* **2013**, *27*, 1062–1073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Del Carmen Parquet, M.; Kumatori, A.; Hasebe, F.; Morita, K.; Igarashi, A. West Nile Virus-Induced Bax-Dependent Apoptosis. *FEBS Lett.* **2001**, *500*, 17–24. [[CrossRef](#)]
36. Maelfait, J.; Liverpool, L.; Rehwinkel, J. Nucleic Acid Sensors and Programmed Cell Death. *J. Mol. Biol.* **2020**, *432*, 552–568. [[CrossRef](#)]
37. Yu, C.-Y.; Chiang, R.-L.; Chang, T.-H.; Liao, C.-L.; Lin, Y.-L. The Interferon Stimulator Mitochondrial Antiviral Signaling Protein Facilitates Cell Death by Disrupting the Mitochondrial Membrane Potential and by Activating Caspases. *J. Virol.* **2010**. [[CrossRef](#)]
38. Vince, J.E.; Tschopp, J. IRF-3 Partners Bax in a Viral-Induced Dance Macabre. *EMBO J.* **2010**, *29*, 1627–1628. [[CrossRef](#)]
39. Knowlton, J.J.; Dermody, T.S.; Holm, G.H. Apoptosis Induced by Mammalian Reovirus Is Beta Interferon (IFN) Independent and Enhanced by IFN Regulatory Factor 3- and NF-KB-Dependent Expression of Noxa. *J. Virol.* **2012**, *86*, 1650–1660. [[CrossRef](#)]
40. Valadão, A.L.C.; Aguiar, R.S.; de Arruda, L.B. Interplay between Inflammation and Cellular Stress Triggered by Flaviviridae Viruses. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1233. [[CrossRef](#)]
41. Nguyen, L.N.; Kanneganti, T.-D. PANoptosis in Viral Infection: The Missing Puzzle Piece in the Cell Death Field. *J. Mol. Biol.* **2021**, 167249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Boyer, S.; Calvez, E.; Chouin-Carneiro, T.; Diallo, D.; Failloux, A.-B. An Overview of Mosquito Vectors of Zika Virus. *Microbes Infect.* **2018**, *20*, 646–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dick, G.W.A.; Kitchen, S.F.; Haddow, A.J. Zika Virus (I). Isolations and Serological Specificity. *Trop. Med. Hyg.* **1952**, *46*, 509–520. [[CrossRef](#)]
44. Smithburn, K.C. Neutralizing Antibodies Against Certain Recently Isolated Viruses in the Sera of Human Beings Residing in East Africa. *J. Immunol.* **1952**, *69*, 223–234. [[PubMed](#)]
45. Duffy, M.R.; Chen, T.-H.; Hancock, W.T.; Powers, A.M.; Kool, J.L.; Lanciotti, R.S.; Pretrick, M.; Marfel, M.; Holzbauer, S.; Dubray, C.; et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2536–2543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Cao-Lormeau, V.-M.; Roche, C.; Teissier, A.; Robin, E.; Berry, A.-L.; Mallet, H.-P.; Sall, A.A.; Musso, D. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1084–1086. [[CrossRef](#)]
47. Campos, G.S.; Bandeira, A.C.; Sardi, S.I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1885–1886. [[CrossRef](#)]
48. Ye, Q.; Liu, Z.-Y.; Han, J.-F.; Jiang, T.; Li, X.-F.; Qin, C.-F. Genomic Characterization and Phylogenetic Analysis of Zika Virus Circulating in the Americas. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *43*, 43–49. [[CrossRef](#)]
49. Yadav, P.D.; Malhotra, B.; Sapkal, G.; Nyayanit, D.A.; Deshpande, G.; Gupta, N.; Padinjaremathathil, U.T.; Sharma, H.; Sahay, R.R.; Sharma, P.; et al. Zika Virus Outbreak in Rajasthan, India in 2018 Was Caused by a Virus Endemic to Asia. *Infect. Genet. Evol.* **2019**, *69*, 199–202. [[CrossRef](#)]
50. Giron, S.; Franke, F.; Decoppet, A.; Cadiou, B.; Travaglini, T.; Thirion, L.; Durand, G.; Jeannin, C.; L’Ambert, G.; Grard, G.; et al. Vector-Borne Transmission of Zika Virus in Europe, Southern France, August 2019. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1900655. [[CrossRef](#)]
51. Information for Travellers Visiting Countries with Zika Virus Transmission. Available online: <https://www.who.int/publications/m/item/information-for-travellers-visiting-countries-with-zika-virus-transmission> (accessed on 21 December 2021).
52. McKenzie, B.A.; Wilson, A.E.; Zohdy, S. Aedes Albopictus Is a Competent Vector of Zika Virus: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Counotte, M.J.; Kim, C.R.; Wang, J.; Bernstein, K.; Deal, C.D.; Broutet, N.J.N.; Low, N. Sexual Transmission of Zika Virus and Other Flaviviruses: A Living Systematic Review. *PLoS Med.* **2018**, *15*, e1002611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. WHO | Sexual Transmission of Zika Virus: Current Status, Challenges and Research Priorities. Available online: <http://www.who.int/reproductivehealth/zika/sexual-transmission-experts-meeting/en/> (accessed on 21 December 2021).
55. Chan, J.F.W.; Choi, G.K.Y.; Yip, C.C.Y.; Cheng, V.C.C.; Yuen, K.-Y. Zika Fever and Congenital Zika Syndrome: An Unexpected Emerging Arboviral Disease. *J. Infect.* **2016**, *72*, 507–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Noorbakhsh, F.; Abdolmohammadi, K.; Fatahi, Y.; Dalili, H.; Rasoolinejad, M.; Rezaei, F.; Salehi-Vaziri, M.; Zahra SHAFIEI-JANDAGHI, N.; Shamsi GOOSHKI, E.; Zaim, M.; et al. Zika Virus Infection, Basic and Clinical Aspects: A Review Article. *Iran. J. Public Health.* **2019**. [[CrossRef](#)]

57. Cao-Lormeau, V.-M.; Blake, A.; Mons, S.; Lastère, S.; Roche, C.; Vanhomwegen, J.; Dub, T.; Baudouin, L.; Teissier, A.; Larre, P.; et al. Guillain-Barré Syndrome Outbreak Associated with Zika Virus Infection in French Polynesia: A Case-Control Study. *Lancet* **2016**, *387*, 1531–1539. [[CrossRef](#)]
58. Rivera-Correa, J.; de Siqueira, I.C.; Mota, S.; do Rosário, M.S.; Pereira de Jesus, P.A.; Alcantara, L.C.J.; Ernst, J.D.; Rodriguez, A. Anti-Ganglioside Antibodies in Patients with Zika Virus Infection-Associated Guillain-Barré Syndrome in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007695. [[CrossRef](#)]
59. Mlakar, J.; Korva, M.; Tul, N.; Popović, M.; Poljšak-Prijatelj, M.; Mraz, J.; Kolenc, M.; Resman Rus, K.; Vesnaver Vipotnik, T.; Fabjan Vodušek, V.; et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 951–958. [[CrossRef](#)]
60. Da Cunha, A.J.L.A.; de Magalhães-Barbosa, M.C.; Lima-Setta, F.; Medronho, R.; de Andrade, R.; Prata-Barbosae, A. Microcephaly Case Fatality Rate Associated with Zika Virus Infection in Brazil: Current Estimates. *Pediatric Infect. Dis. J.* **2017**, *36*, 528–530. [[CrossRef](#)]
61. Costa, M.C.N.; Cardim, L.L.; Teixeira, M.G.; Barreto, M.L.; Carvalho-Sauer, R.d.C.O.; Barreto, F.R.; Carvalho, M.S.I.; Oliveira, W.K.; França, G.V.A.; Carmo, E.H.; et al. Case Fatality Rate Related to Microcephaly Congenital Zika Syndrome and Associated Factors: A Nationwide Retrospective Study in Brazil. *Viruses* **2020**, *12*, 1228. [[CrossRef](#)]
62. Paz-Bailey, G.; Rosenberg, E.S.; Doyle, K.; Munoz-Jordan, J.; Santiago, G.A.; Klein, L.; Perez-Padilla, J.; Medina, F.A.; Waterman, S.H.; Adams, L.E.; et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids—Final Report. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 1234–1243. [[CrossRef](#)]
63. Campos, G.S.; Hughes Carvalho, R.; Bandeira, A.C.; Reboredo-Oliveira, L.; dos Santos Costa, R.; Figueiredo, C.A.; Sardi, S.I. New Challenge for Zika Virus Infection: Human Reservoirs? *Viral Immunol.* **2020**, *33*, 489–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Stone, M.; Bakkour, S.; Lanteri, M.C.; Brambilla, D.; Simmons, G.; Bruhn, R.; Kaidarova, Z.; Lee, T.-H.; Orlando Alsina, J.; Williamson, P.C.; et al. Zika Virus RNA and IgM Persistence in Blood Compartments and Body Fluids: A Prospective Observational Study. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 1446–1456. [[CrossRef](#)]
65. Petersen, L.R.; Jamieson, D.J.; Powers, A.M.; Honein, M.A. Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 1552–1563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Lebeau, G.; Lagrave, A.; Ogire, E.; Grondin, L.; Seriacaroupin, S.; Moutoussamy, C.; Mavingui, P.; Hoarau, J.-J.; Roche, M.; Krejbich-Trotot, P.; et al. Viral Toxin NS1 Implication in Dengue Pathogenesis Making It a Pivotal Target in Development of Efficient Vaccine. *Vaccines* **2021**, *9*, 946. [[CrossRef](#)]
67. Mazeaud, C.; Freppel, W.; Chatel-Chaix, L. The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Front. Genet.* **2018**, *9*, 595. [[CrossRef](#)]
68. Lowe, R.; Barcellos, C.; Brasil, P.; Cruz, O.; Honório, N.; Kuper, H.; Carvalho, M. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *IJERPH* **2018**, *15*, 96. [[CrossRef](#)]
69. de Aragao, M.F.V.; van der Linden, V.; Brainer-Lima, A.M.; Coeli, R.R.; Rocha, M.A.; da Silva, P.S.; de Carvalho, M.D.C.G.; van der Linden, A.; de Holanda, A.C.; Valenca, M.M. Clinical Features and Neuroimaging (CT and MRI) Findings in Presumed Zika Virus Related Congenital Infection and Microcephaly: Retrospective Case Series Study. *BMJ* **2016**, *353*, i1901. [[CrossRef](#)]
70. Coyne, C.B.; Lazear, H.M. Zika Virus—Reigniting the TORCH. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 707–715. [[CrossRef](#)]
71. Gadea, G.; Bos, S.; Krejbich-Trotot, P.; Clain, E.; Viranaicken, W.; El-Kalamouni, C.; Mavingui, P.; Desprès, P. A Robust Method for the Rapid Generation of Recombinant Zika Virus Expressing the GFP Reporter Gene. *Virology* **2016**, *497*, 157–162. [[CrossRef](#)]
72. Miner, J.J.; Diamond, M.S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe* **2017**, *21*, 134–142. [[CrossRef](#)]
73. Pena, L.J.; Miranda Guarines, K.; Duarte Silva, A.J.; Sales Leal, L.R.; Mendes Félix, D.; Silva, A.; de Oliveira, S.A.; Junqueira Ayres, C.F.; Júnior, A.S.; de Freitas, A.C. In Vitro and in Vivo Models for Studying Zika Virus Biology. *J. Gen. Virol.* **2018**, *99*, 1529–1550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Bayless, N.L.; Greenberg, R.S.; Swigut, T.; Wysocka, J.; Blish, C.A. Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 423–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Dang, J.; Tiwari, S.K.; Lichinchi, G.; Qin, Y.; Patil, V.S.; Eroshkin, A.M.; Rana, T.M. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell* **2016**, *19*, 258–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Osuna, C.E.; Lim, S.-Y.; Deleage, C.; Griffin, B.D.; Stein, D.; Schroeder, L.T.; Omange, R.; Best, K.; Luo, M.; Hraber, P.T.; et al. Zika Viral Dynamics and Shedding in Rhesus and Cynomolgus Macaques. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 1448–1455. [[CrossRef](#)]
77. Marrazzo, P.; Cricca, M.; Nastasi, C. Are the Organoid Models an Invaluable Contribution to ZIKA Virus Research? *Pathogens* **2021**, *10*, 1233. [[CrossRef](#)]
78. Garcez, P.P.; Loiola, E.C.; Madeiro da Costa, R.; Higa, L.M.; Trindade, P.; Delvecchio, R.; Nascimento, J.M.; Brindeiro, R.; Tanuri, A.; Rehen, S.K. Zika Virus Impairs Growth in Human Neurospheres and Brain Organoids. *Science* **2016**, *352*, 816–818. [[CrossRef](#)]
79. Tabata, T.; Pettitt, M.; Puerta-Guardo, H.; Michlmayr, D.; Wang, C.; Fang-Hoover, J.; Harris, E.; Pereira, L. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 155–166. [[CrossRef](#)]
80. Butsabong, T.; Felipe, M.; Campagnolo, P.; Maringer, K. The Emerging Role of Perivascular Cells (Pericytes) in Viral Pathogenesis. *J. Gen. Virol.* **2021**, *102*. [[CrossRef](#)]
81. Frumence, E.; Roche, M.; Krejbich-Trotot, P.; El-Kalamouni, C.; Nativel, B.; Rondeau, P.; Missé, D.; Gadea, G.; Viranaicken, W.; Desprès, P. The South Pacific Epidemic Strain of Zika Virus Replicates Efficiently in Human Epithelial A549 Cells Leading to IFN- β Production and Apoptosis Induction. *Virology* **2016**, *493*, 217–226. [[CrossRef](#)]

82. Wu, Y.; Liu, Q.; Zhou, J.; Xie, W.; Chen, C.; Wang, Z.; Yang, H.; Cui, J. Zika Virus Evades Interferon-Mediated Antiviral Response through the Co-Operation of Multiple Nonstructural Proteins in Vitro. *Cell Discov.* **2017**, *3*, 17006. [[CrossRef](#)]
83. Souza, B.S.F.; Sampaio, G.L.A.; Pereira, C.S.; Campos, G.S.; Sardi, S.I.; Freitas, L.A.R.; Figueira, C.P.; Paredes, B.D.; Nonaka, C.K.V.; Azevedo, C.M.; et al. Zika Virus Infection Induces Mitosis Abnormalities and Apoptotic Cell Death of Human Neural Progenitor Cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Tang, H.; Hammack, C.; Ogden, S.C.; Wen, Z.; Qian, X.; Li, Y.; Yao, B.; Shin, J.; Zhang, F.; Lee, E.M.; et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* **2016**, *18*, 587–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Liu, J.; Li, Q.; Li, X.; Qiu, Z.; Li, A.; Liang, W.; Chen, H.; Cai, X.; Chen, X.; Duan, X.; et al. Zika Virus Envelope Protein Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis via an Intrinsic Cell Death Signaling Pathway in Neuroendocrine PC12 Cells. *Int. J. Biol. Sci.* **2018**, *14*, 1099–1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Suzuki, T.; Okamoto, T.; Katoh, H.; Sugiyama, Y.; Kusakabe, S.; Tokunaga, M.; Hirano, J.; Miyata, Y.; Fukuhara, T.; Ikawa, M.; et al. Infection with Flaviviruses Requires BCLXL for Cell Survival. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Turpin, J.; Frumence, E.; Desprès, P.; Viranaïcken, W.; Krejbich-Trotot, P. The ZIKA Virus Delays Cell Death Through the Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins. *Cells* **2019**, *8*, 1338. [[CrossRef](#)]
88. Limonta, D.; Jovel, J.; Kumar, A.; Airo, A.; Hou, S.; Saito, L.; Branton, W.; Ka-Shu Wong, G.; Mason, A.; Power, C.; et al. Human Fetal Astrocytes Infected with Zika Virus Exhibit Delayed Apoptosis and Resistance to Interferon: Implications for Persistence. *Viruses* **2018**, *10*, 646. [[CrossRef](#)]
89. Kumar, A.; Jovel, J.; Lopez-Orozco, J.; Limonta, D.; Airo, A.M.; Hou, S.; Stryapunina, I.; Fibke, C.; Moore, R.B.; Hobman, T.C. Human Sertoli Cells Support High Levels of Zika Virus Replication and Persistence. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5477. [[CrossRef](#)]
90. Muthuraj, P.G.; Sahoo, P.K.; Kraus, M.; Bruett, T.; Annamalai, A.S.; Pattnaik, A.; Pattnaik, A.K.; Byrareddy, S.N.; Natarajan, S.K. Zika Virus Infection Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Placental Trophoblasts. *Cell Death Discov.* **2021**, *7*, 24. [[CrossRef](#)]
91. Chen, J.; Yang, Y.; Chen, J.; Zhou, X.; Dong, Z.; Chen, T.; Yang, Y.; Zou, P.; Jiang, B.; Hu, Y.; et al. Zika Virus Infects Renal Proximal Tubular Epithelial Cells with Prolonged Persistency and Cytopathic Effects. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*, 1–7. [[CrossRef](#)]
92. Turpin, J.; El-Safadi, D.; Lebeau, G.; Frumence, E.; Desprès, P.; Viranaïcken, W.; Krejbich-Trotot, P. CHOP Pro-Apoptotic Transcriptional Program in Response to ER Stress Is Hacked by Zika Virus. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3750. [[CrossRef](#)]
93. Limonta, D.; Jovel, J.; Kumar, A.; Lu, J.; Hou, S.; Airo, A.M.; Lopez-Orozco, J.; Wong, C.P.; Saito, L.; Branton, W.; et al. Fibroblast Growth Factor 2 Enhances Zika Virus Infection in Human Fetal Brain. *J. Infect. Dis.* **2019**, *220*, 1377–1387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Liu, H.; Liao, H.-M.; Li, B.; Tsai, S.; Hung, G.-C.; Lo, S.-C. Comparative Genomics, Infectivity and Cytopathogenicity of American Isolates of Zika Virus That Developed Persistent Infections in Human Embryonic Kidney (HEK293) Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Barnard, T.; Rajah, M.; Sagan, S. Contemporary Zika Virus Isolates Induce More DsRNA and Produce More Negative-Strand Intermediate in Human Astrocytoma Cells. *Viruses* **2018**, *10*, 728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Han, X.; Wang, J.; Yang, Y.; Qu, S.; Wan, F.; Zhang, Z.; Wang, R.; Li, G.; Cong, H. Zika Virus Infection Induced Apoptosis by Modulating the Recruitment and Activation of Proapoptotic Protein Bax. *J. Virol.* **2021**, *95*, e01445-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Auriti, C.; De Rose, D.U.; Santisi, A.; Martini, L.; Piersigilli, F.; Bersani, I.; Ronchetti, M.P.; Caforio, L. Pregnancy and Viral Infections: Mechanisms of Fetal Damage, Diagnosis and Prevention of Neonatal Adverse Outcomes from Cytomegalovirus to SARS-CoV-2 and Zika Virus. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2021**, *1867*, 166198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Chiu, C.-F.; Chu, L.-W.; Liao, I.-C.; Simanjuntak, Y.; Lin, Y.-L.; Juan, C.-C.; Ping, Y.-H. The Mechanism of the Zika Virus Crossing the Placental Barrier and the Blood-Brain Barrier. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 214. [[CrossRef](#)]
99. Pereira, L. Congenital Viral Infection: Traversing the Uterine-Placental Interface. *Annu. Rev. Virol.* **2018**, *5*, 273–299. [[CrossRef](#)]
100. Rabelo, K.; de Souza, L.J.; Salomão, N.G.; Machado, L.N.; Pereira, P.G.; Portari, E.A.; Basilio-de-Oliveira, R.; Dos Santos, F.B.; Neves, L.D.; Morgade, L.F.; et al. Zika Induces Human Placental Damage and Inflammation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 2146. [[CrossRef](#)]
101. Sen Santara, S.; Crespo, Â.C.; Mulik, S.; Ovies, C.; Boulenouar, S.; Strominger, J.L.; Lieberman, J. Decidual NK Cells Kill Zika Virus-Infected Trophoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2115410118. [[CrossRef](#)]
102. Ropidi, M.I.M.; Khazali, A.S.; Rashid, N.N.; Yusof, R. Endoplasmic reticulum: A focal point of Zika virus infection. *J. Biomed. Sci.* **2020**, *27*, 27. [[CrossRef](#)]
103. Alfano, C.; Gladwyn-Ng, I.; Couderc, T.; Lecuit, M.; Nguyen, L. The Unfolded Protein Response: A Key Player in Zika Virus-Associated Congenital Microcephaly. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Gladwyn-Ng, I.; Cordon-Barris, L.; Alfano, C.; Creppe, C.; Couderc, T.; Morelli, G.; Thelen, N.; America, M.; Bessières, B.; Encha-Razavi, F.; et al. Stress-Induced Unfolded Protein Response Contributes to Zika Virus-Associated Microcephaly. *Nat. Neurosci.* **2018**, *21*, 63–71. [[CrossRef](#)]
105. Tan, Z.; Zhang, W.; Sun, J.; Fu, Z.; Ke, X.; Zheng, C.; Zhang, Y.; Li, P.; Liu, Y.; Hu, Q.; et al. ZIKV Infection Activates the IRE1-XBP1 and ATF6 Pathways of Unfolded Protein Response in Neural Cells. *J. Neuroinflamm.* **2018**, *15*, 275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Turpin, J.; Frumence, E.; Harrabi, W.; Haddad, J.G.; El Kalamouni, C.; Desprès, P.; Krejbich-Trotot, P.; Viranaïcken, W. Zika Virus Subversion of Chaperone GRP78/BiP Expression in A549 Cells during UPR Activation. *Biochimie* **2020**, *175*, 99–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Chen, Y.; Brandizzi, F. IRE1: ER Stress Sensor and Cell Fate Executor. *Trends Cell Biol.* **2013**, *23*, 547–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

108. Zinszner, H.; Kuroda, M.; Wang, X.; Batchvarova, N.; Lightfoot, R.T.; Remotti, H.; Stevens, J.L.; Ron, D. CHOP Is Implicated in Programmed Cell Death in Response to Impaired Function of the Endoplasmic Reticulum. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 982–995. [[CrossRef](#)]
109. Quicke, K.M.; Bowen, J.R.; Johnson, E.L.; McDonald, C.E.; Ma, H.; O'Neal, J.T.; Rajakumar, A.; Wrammert, J.; Rimawi, B.H.; Pulendran, B.; et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 83–90. [[CrossRef](#)]
110. Tabata, T.; Pettitt, M.; Puerta-Guardo, H.; Michlmayr, D.; Harris, E.; Pereira, L. Zika Virus Replicates in Proliferating Cells in Explants From First-Trimester Human Placentas, Potential Sites for Dissemination of Infection. *J. Infect. Dis.* **2018**, *217*, 1202–1213. [[CrossRef](#)]
111. Ghouzzi, V.E.; Bianchi, F.T.; Molineris, I.; Mounce, B.C.; Berto, G.E.; Rak, M.; Lebon, S.; Aubry, L.; Tocco, C.; Gai, M.; et al. ZIKA Virus Elicits P53 Activation and Genotoxic Stress in Human Neural Progenitors Similar to Mutations Involved in Severe Forms of Genetic Microcephaly and P53. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2440. [[CrossRef](#)]
112. Lin, M.-Y.; Wang, Y.-L.; Wu, W.-L.; Wolseley, V.; Tsai, M.-T.; Radic, V.; Thornton, M.E.; Grubbs, B.H.; Chow, R.H.; Huang, I.-C. Zika Virus Infects Intermediate Progenitor Cells and Post-Mitotic Committed Neurons in Human Fetal Brain Tissues. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14883. [[CrossRef](#)]
113. Schultz, V.; Barrie, J.A.; Donald, C.L.; Crawford, C.L.; Mullin, M.; Anderson, T.J.; Solomon, T.; Barnett, S.C.; Linington, C.; Kohl, A.; et al. Oligodendrocytes Are Susceptible to Zika Virus Infection in a Mouse Model of Perinatal Exposure: Implications for CNS Complications. *Glia* **2021**, *69*, 2023–2036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Yan, Y.; Zhang, X.; Wang, G.; Cheng, X.; Yan, Y.; Fu, Y.; Yang, X.; Jiang, Z. Zika Virus Induces Abnormal Cranial Osteogenesis by Negatively Affecting Cranial Neural Crest Development. *Infect. Genet. Evol.* **2019**, *69*, 176–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Martinot, A.J.; Abbink, P.; Afacan, O.; Prohl, A.K.; Bronson, R.; Hecht, J.L.; Borducchi, E.N.; Larocca, R.A.; Peterson, R.L.; Rinaldi, W.; et al. Fetal Neuropathology in Zika Virus-Infected Pregnant Female Rhesus Monkeys. *Cell* **2018**, *173*, 1111–1122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Lancaster, M.A.; Knoblich, J.A. Generation of Cerebral Organoids from Human Pluripotent Stem Cells. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 2329–2340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. De Mendonça-Vieira, L.R.; Anibal-Silva, C.E.; Menezes-Neto, A.; de Azevedo, E.A.N.; Zanluqui, N.G.; Peron, J.P.S.; de Oliveira Franca, R.F. Reactive Oxygen Species (ROS) Are Not a Key Determinant for Zika Virus-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Viruses* **2021**, *13*, 2111. [[CrossRef](#)]
118. Zhang, F.; Hammack, C.; Ogden, S.C.; Cheng, Y.; Lee, E.M.; Wen, Z.; Qian, X.; Nguyen, H.N.; Li, Y.; Yao, B.; et al. Molecular Signatures Associated with ZIKV Exposure in Human Cortical Neural Progenitors. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 8610–8620. [[CrossRef](#)]
119. Lee, J.K.; Kim, J.-A.; Oh, S.-J.; Lee, E.-W.; Shin, O.S. Zika Virus Induces Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL)-Mediated Apoptosis in Human Neural Progenitor Cells. *Cells* **2020**, *9*, E2487. [[CrossRef](#)]
120. Rothan, H.A.; Fang, S.; Mahesh, M.; Byrareddy, S.N. Zika Virus and the Metabolism of Neuronal Cells. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 2551–2557. [[CrossRef](#)]
121. Devhare, P.; Meyer, K.; Steele, R.; Ray, R.B.; Ray, R. Zika Virus Infection Dysregulates Human Neural Stem Cell Growth and Inhibits Differentiation into Neuroprogenitor Cells. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e3106. [[CrossRef](#)]
122. Bernhauerová, V.; Rezelj, V.V.; Vignuzzi, M. Modelling Degradation and Replication Kinetics of the Zika Virus In Vitro Infection. *Viruses* **2020**, *12*, 547. [[CrossRef](#)]
123. Krejbich-Trotot, P.; Denizot, M.; Hoarau, J.-J.; Jaffar-Bandjee, M.-C.; Das, T.; Gasque, P. Chikungunya Virus Mobilizes the Apoptotic Machinery to Invade Host Cell Defenses. *FASEB J.* **2011**, *25*, 314–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. De Sousa, J.R.; Azevedo, R.S.S.; Martins Filho, A.J.; Araujo, M.T.F.; Moutinho, E.R.C.; Baldez Vasconcelos, B.C.; Cruz, A.C.R.; Oliveira, C.S.; Martins, L.C.; Baldez Vasconcelos, B.H.; et al. Correlation between Apoptosis and in Situ Immune Response in Fatal Cases of Microcephaly Caused by Zika Virus. *Am. J. Pathol.* **2018**, *188*, 2644–2652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Mlera, L.; Melik, W.; Bloom, M.E. The Role of Viral Persistence in Flavivirus Biology. *Pathog. Dis.* **2014**, *71*, 137–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Benedict, C.A.; Norris, P.S.; Ware, C.F. To Kill or Be Killed: Viral Evasion of Apoptosis. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 1013–1018. [[CrossRef](#)]
127. Nagata, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2018**, *36*, 489–517. [[CrossRef](#)]
128. Quarleri, J.; Cevallos, C.; Delpino, M.V. Chapter One—Apoptosis in Infectious Diseases as a Mechanism of Immune Evasion and Survival. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*; Donev, R., Ed.; Apoptosis in Health and Disease—Part A; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2021; Volume 125, pp. 1–24.
129. Foy, B.D.; Kobylinski, K.C.; Foy, J.L.C.; Blitvich, B.J.; da Rosa, A.T.; Haddow, A.D.; Lanciotti, R.S.; Tesh, R.B. Probable Non-Vector-Borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 5. [[CrossRef](#)]
130. Nicastrì, E.; Castilletti, C.; Liuzzi, G.; Iannetta, M.; Capobianchi, M.R.; Ippolito, G. Persistent Detection of Zika Virus RNA in Semen for Six Months after Symptom Onset in a Traveller Returning from Haiti to Italy, February 2016. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, 30314. [[CrossRef](#)]
131. Alcendor, D.J. Zika Virus Infection of the Human Glomerular Cells: Implications for Viral Reservoirs and Renal Pathogenesis. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, 162–171. [[CrossRef](#)]

132. Van der Linden, V.; Pessoa, A.; Dobyns, W.; Barkovich, A.J.; van der Linden, H.L., Jr.; Filho, E.L.R.; Ribeiro, E.M.; Leal, M.; de Araújo, C.; de Maria, F.V.V.; et al. Description of 13 Infants Born During October 2015–January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth—Brazil. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 1343–1348. [[CrossRef](#)]
133. Mulkey, S.B.; Arroyave-Wessel, M.; Peyton, C.; Bulas, D.I.; Fourzali, Y.; Jiang, J.; Russo, S.; McCarter, R.; Msall, M.E.; du Plessis, A.J.; et al. Neurodevelopmental Abnormalities in Children With In Utero Zika Virus Exposure Without Congenital Zika Syndrome. *JAMA Pediatr.* **2020**, *174*, 269. [[CrossRef](#)]
134. Palatini, U.; Miesen, P.; Carballar-Lejarazu, R.; Ometto, L.; Rizzo, E.; Tu, Z.; van Rij, R.P.; Bonizzoni, M. Comparative Genomics Shows That Viral Integrations Are Abundant and Express PiRNAs in the Arboviral Vectors *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus*. *BMC Genom.* **2017**, *18*, 512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Offerdahl, D.K.; Dorward, D.W.; Hansen, B.T.; Bloom, M.E. Cytoarchitecture of Zika Virus Infection in Human Neuroblastoma and *Aedes Albopictus* Cell Lines. *Virology* **2017**, *501*, 54–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Slonchak, A.; Hugo, L.E.; Freney, M.E.; Hall-Mendelin, S.; Amarilla, A.A.; Torres, F.J.; Setoh, Y.X.; Peng, N.Y.G.; Sng, J.D.J.; Hall, R.A.; et al. Zika Virus Noncoding RNA Suppresses Apoptosis and Is Required for Virus Transmission by Mosquitoes. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Clem, R.J. Arboviruses and Apoptosis: The Role of Cell Death in Determining Vector Competence. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 1033–1036. [[CrossRef](#)]
138. Medina-Magües, L.G.; Gergen, J.; Jasny, E.; Petsch, B.; Lopera-Madrid, J.; Medina-Magües, E.S.; Salas-Quinchucua, C.; Osorio, J.E. mRNA Vaccine Protects against Zika Virus. *Vaccines* **2021**, *9*, 1464. [[CrossRef](#)]
139. Xie, X.; Zou, J.; Shan, C.; Shi, P.-Y. Small Molecules and Antibodies for Zika Therapy. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, S945–S950. [[CrossRef](#)]
140. Clain, E.; Sinigaglia, L.; Koishi, A.C.; Gorgette, O.; Gadea, G.; Viranaicken, W.; Krejbich-Trotot, P.; Mavingui, P.; Desprès, P.; Nunes Duarte dos Santos, C.; et al. Extract from *Aphloia Theiformis*, an Edible Indigenous Plant from Reunion Island, Impairs Zika Virus Attachment to the Host Cell Surface. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10856. [[CrossRef](#)]
141. Baz, M.; Boivin, G. Antiviral Agents in Development for Zika Virus Infections. *Pharmaceuticals* **2019**, *12*, 101. [[CrossRef](#)]
142. Bernatchez, J.A.; Tran, L.T.; Li, J.; Luan, Y.; Siqueira-Neto, J.L.; Li, R. Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 470–489. [[CrossRef](#)]
143. Han, Y.; Mesplède, T. Investigational Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection: A Preclinical and Clinical Update. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2018**, *27*, 951–962. [[CrossRef](#)]
144. Kumar, D.; Sharma, N.; Aarthy, M.; Singh, S.K.; Giri, R. Mechanistic Insights into Zika Virus NS3 Helicase Inhibition by Epigallocatechin-3-Gallate. *ACS Omega* **2020**, *5*, 11217–11226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Saiz, J.-C.; de Oya, N.J.; Blázquez, A.-B.; Escribano-Romero, E.; Martín-Acebes, M.A. Host-Directed Antivirals: A Realistic Alternative to Fight Zika Virus. *Viruses* **2018**, *10*, 453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Cooney, J.; Allison, C.; Preston, S.; Pellegrini, M. Therapeutic Manipulation of Host Cell Death Pathways to Facilitate Clearance of Persistent Viral Infections. *J. Leukoc. Biol.* **2018**, *103*, 287–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Bulanova, D.; Ianevski, A.; Bugai, A.; Akimov, Y.; Kuivanen, S.; Paavilainen, H.; Kakkola, L.; Nandania, J.; Turunen, L.; Ohman, T.; et al. Antiviral Properties of Chemical Inhibitors of Cellular Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins. *Viruses* **2017**, *9*, 271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Rider, T.H.; Zook, C.E.; Boettcher, T.L.; Wick, S.T.; Pancoast, J.S.; Zusman, B.D. Broad-Spectrum Antiviral Therapeutics. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22572. [[CrossRef](#)]
149. Kuivanen, S.; Bepalov, M.M.; Nandania, J.; Ianevski, A.; Velagapudi, V.; De Brabander, J.K.; Kainov, D.E.; Vapalahti, O. Obatoclax, Saliphenylhalamide and Gemcitabine Inhibit Zika Virus Infection in Vitro and Differentially Affect Cellular Signaling, Transcription and Metabolism. *Antivir. Res.* **2017**, *139*, 117–128. [[CrossRef](#)]
150. Su, K.Y.; Balasubramaniam, V.R.M.T. Zika Virus as Oncolytic Therapy for Brain Cancer: Myth or Reality? *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2715. [[CrossRef](#)]
151. Lawler, S.E.; Speranza, M.-C.; Cho, C.-F.; Chiocca, E.A. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. *JAMA Oncol.* **2017**, *3*, 841. [[CrossRef](#)]
152. Vandenabeele, P.; Vandecasteele, K.; Bachert, C.; Krysko, O.; Krysko, D.V. Immunogenic Apoptotic Cell Death and Anticancer Immunity. In *Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy*; Gregory, C.D., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; Volume 930, pp. 133–149. ISBN 978-3-319-39404-6.
153. Zhu, Z.; Gorman, M.J.; McKenzie, L.D.; Chai, J.N.; Hubert, C.G.; Prager, B.C.; Fernandez, E.; Richner, J.M.; Zhang, R.; Shan, C.; et al. Zika Virus Has Oncolytic Activity against Glioblastoma Stem Cells. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 2843–2857. [[CrossRef](#)]
154. Chen, Q.; Wu, J.; Ye, Q.; Ma, F.; Zhu, Q.; Wu, Y.; Shan, C.; Xie, X.; Li, D.; Zhan, X.; et al. Treatment of Human Glioblastoma with a Live Attenuated Zika Virus Vaccine Candidate. *mBio* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
155. Zhu, Z.; Mesci, P.; Bernatchez, J.A.; Gimple, R.C.; Wang, X.; Schafer, S.T.; Wettersten, H.I.; Beck, S.; Clark, A.E.; Wu, Q.; et al. Zika Virus Targets Glioblastoma Stem Cells through a SOX2-Integrin $\text{Av}\beta 5$ Axis. *Cell Stem Cell* **2020**, *26*, 187–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Nair, S.; Mazzocchi, L.; Jash, A.; Govero, J.; Bais, S.S.; Hu, T.; Fontes-Garfias, C.R.; Shan, C.; Okada, H.; Shresta, S.; et al. Zika Virus Oncolytic Activity Requires CD8⁺ T Cells and Is Boosted by Immune Checkpoint Blockade. *JCI Insight* **2020**, *6*, e144619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Mazar, J.; Li, Y.; Rosado, A.; Phelan, P.; Kedarinath, K.; Parks, G.D.; Alexander, K.A.; Westmoreland, T.J. Zika Virus as an Oncolytic Treatment of Human Neuroblastoma Cells Requires CD24. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0200358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

158. Altevogt, P.; Sammar, M.; Hüser, L.; Kristiansen, G. Novel Insights into the Function of CD24: A Driving Force in Cancer. *Int. J. Cancer* **2021**, *148*, 546–559. [[CrossRef](#)]
159. Zwernik, S.D.; Adams, B.H.; Raymond, D.A.; Warner, C.M.; Kassam, A.B.; Rovin, R.A.; Akhtar, P. AXL Receptor Is Required for Zika Virus Strain MR-766 Infection in Human Glioblastoma Cell Lines. *Mol. Ther.-Oncolytics* **2021**, *23*, 447–457. [[CrossRef](#)]
160. Delaunay, T.; Nader, J.; Grard, M.; Farine, I.; Hedwig, V.; Foloppe, J.; Blondy, T.; Violland, M.; Poulliquen, D.; Grégoire, M.; et al. High Oncolytic Activity of a Double-Deleted Vaccinia Virus Copenhagen Strain against Malignant Pleural Mesothelioma. *Mol. Ther.-Oncolytics* **2020**, *18*, 573–578. [[CrossRef](#)]
161. Delaunay, T.; Achard, C.; Boisgerault, N.; Grard, M.; Petithomme, T.; Chatelain, C.; Dutoit, S.; Blanquart, C.; Royer, P.-J.; Minvielle, S.; et al. Frequent Homozygous Deletions of Type I Interferon Genes in Pleural Mesothelioma Confer Sensitivity to Oncolytic Measles Virus. *J. Thorac. Oncol.* **2020**, *15*, 827–842. [[CrossRef](#)]
162. Lemos de Matos, A.; Franco, L.S.; McFadden, G. Oncolytic Viruses and the Immune System: The Dynamic Duo. *Mol. Ther.-Methods Clin. Dev.* **2020**, *17*, 349–358. [[CrossRef](#)]
163. Andtbacka, R.H.I.; Kaufman, H.L.; Collichio, F.; Amatruda, T.; Senzer, N.; Chesney, J.; Delman, K.A.; Spitler, L.E.; Puzanov, I.; Agarwala, S.S.; et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 2780–2788. [[CrossRef](#)]
164. Kaid, C.; Madi, R.A.D.S.; Astray, R.; Goulart, E.; Caires-Junior, L.C.; Mitsugi, T.G.; Moreno, A.C.R.; Castro-Amarante, M.F.; Pereira, L.R.; Porchia, B.F.M.M.; et al. Safety, Tumor Reduction, and Clinical Impact of Zika Virus Injection in Dogs with Advanced-Stage Brain Tumors. *Mol. Ther.* **2020**, *28*, 1276–1286. [[CrossRef](#)]
165. Monel, B.; Compton, A.A.; Bruel, T.; Amraoui, S.; Burlaud-Gaillard, J.; Roy, N.; Guivel-Benhassine, F.; Porrot, F.; Génin, P.; Meertens, L.; et al. Zika Virus Induces Massive Cytoplasmic Vacuolization and Paraptosis-like Death in Infected Cells. *EMBO J.* **2017**, *36*, 1653–1668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Beys-da-Silva, W.O.; Quincozes-Santos, A.; Tureta, E.F.; Rosa, R.L.; Berger, M.; Bobermin, L.D.; Souza, D.O.; Guimarães, J.A.; Santi, L. Association between Zika Virus and Future Neurological Diseases. *J. Neurol. Sci.* **2020**, *409*, 116617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Review

Exosome-Mediated Antigen Delivery: Unveiling Novel Strategies in Viral Infection Control and Vaccine Design

Daed El Safadi ¹, Alexandre Mokhtari ¹, Morgane Krejbich ², Alisé Lagrave ^{1,3}, Ugo Hirigoyen ² ,
Grégoire Lebeau ^{1,4} , Wildriss Viranaicken ^{1,4}  and Pascale Krejbich-Trotot ^{1,*} 

¹ Unité Mixte Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Université de la Réunion, INSERM U1187, CNRS UMR 9192, IRD, Plateforme Technologique CYROI, 94791 Sainte Clotilde, La Réunion, France; daed.el-safadi@univ-reunion.fr (D.E.S.); alexandre.mokhtari@universite-paris-saclay.fr (A.M.); alagrave@pasteur-cayenne.fr (A.L.); gregorie.lebeau@univ-reunion.fr (G.L.); wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr (W.V.)

² Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Intégrée Nantes-Angers, CRCI2NA, INSERM U1307, CNRS UMR 6075, Université de Nantes, Université d'Angers, 8 Quai Moncoussu, P.O. Box 70721, Cedex 1, 44007 Nantes, France; morgane.krejbich@etu.univ-nantes.fr (M.K.); ugo.hirigoyen@inserm.fr (U.H.)

³ National Reference Center for Arboviruses, Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne 97300, French Guiana

⁴ Unité Mixte Diabète Athérombose Réunion Océan Indien (DÉTROÏ), Université de La Réunion, INSERM U1188, Campus Santé de Terre Sainte, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

* Correspondence: pascale.krejbich@univ-reunion.fr

Abstract: Exosomes are small subtypes of extracellular vesicles (EVs) naturally released by different types of cells into their environment. Their physiological roles appear to be multiple, yet many aspects of their biological activities remain to be understood. These vesicles can transport and deliver a variety of cargoes and may serve as unconventional secretory vesicles. Thus, they play a crucial role as important vectors for intercellular communication and the maintenance of homeostasis. Exosome production and content can vary under several stresses or modifications in the cell microenvironment, influencing cellular responses and stimulating immunity. During infectious processes, exosomes are described as double-edged swords, displaying both beneficial and detrimental effects. Owing to their tractability, the analysis of EVs from multiple biofluids has become a booming tool for monitoring various pathologies, from infectious to cancerous origins. In this review, we present an overview of exosome features and discuss their particular and ambiguous functions in infectious contexts. We then focus on their properties as diagnostic or therapeutic tools. In this regard, we explore the capacity of exosomes to vectorize immunogenic viral antigens and their function in mounting adaptive immune responses. As exosomes provide interesting platforms for antigen presentation, we further review the available data on exosome engineering, which enables peptides of interest to be exposed at their surface. In the light of all these data, exosomes are emerging as promising avenues for vaccine strategies.



Citation: El Safadi, D.; Mokhtari, A.; Krejbich, M.; Lagrave, A.; Hirigoyen, U.; Lebeau, G.; Viranaicken, W.; Krejbich-Trotot, P. Exosome-Mediated Antigen Delivery: Unveiling Novel Strategies in Viral Infection Control and Vaccine Design. *Vaccines* **2024**, *12*, 280. <https://doi.org/10.3390/vaccines12030280>

Academic Editor: Amine A. Kamen

Received: 5 February 2024

Revised: 1 March 2024

Accepted: 4 March 2024

Published: 7 March 2024

Keywords: exosomes; extracellular vesicles; cargoes; pathological biomarkers; infection; viruses; flaviviruses; antigen presentation; exosome engineering; vaccine design



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cellular communication is an essential aspect of multicellular organism physiology. It relies on signals emitted by cells, capable of circulating to reach target cells specifically equipped to receive the message. Signal production and reception require complex cellular and molecular networks. By implementing multiple biological programs, these networks enable a wide range of coordinated cellular responses. Responses vary from phenotypic and metabolic changes to the control of movement and cell migration, the modification of gene expression, and the determination of cell survival, division, differentiation, or death. Therefore, communication systems condition the constant adaptability of cells to their

environment. The underlying mechanisms have been extensively explored for decades, notably in the field of immune cell interactions, where coordinated immune responses are required to eliminate pathogens or tumor cells. Intercellular signaling between immune cells was initially thought to occur either through cell–cell contact or soluble factors, such as cytokines, until the late 1990s when it was identified that extracellular vesicles (EVs) were involved in dendritic and T cell crosstalk [1,2] and constituted antigen-presenting devices [3,4]. This discovery marked a turning point in the understanding of immune cells crosstalk. It demonstrated that EVs produced by immune cells could encapsulate cytokines, circulate, contact, or deliver their content to recipient cells, thus priming or immunomodulating other immune cells [5]. Since then, EVs have emerged as key players in intercellular communication, and their nature and biological functions have been increasingly documented. Owing to their membrane-bound nature, EVs provide a unique facility for transporting a wide variety of signaling molecules and driving their precise targeting to recipient cells.

In recent years, the study of EVs has been greatly facilitated by the development of new and improved methods. These methods enable their detection and purification from a variety of biological fluids, as well as their imaging, size measurement, and content analysis through lipidomics, proteomics, and genomics studies [6,7]. It is worth highlighting that major technological advances now enable specific analysis at the level of single vesicles. These significant developments, regularly reviewed, make it possible to collect extremely valuable precision biometric and molecular information on EVs [8]. Research in the field has revealed that EVs and their cargoes are highly diverse in nature. From this observation ensued a need for a classification, which first put emphasis on the membrane origin: vesicles derived from the plasma membrane are considered as ‘ectosomes’, whereas vesicles that originate from an endosomal biogenesis pathway are named ‘exosomes’ [9,10]. Moreover, their biogenesis, production, and content differ according to a plethora of parameters, such as cell type, metabolic activity, and physiological and pathological conditions. This plasticity complexifies the understanding of the biological activities of EVs. At the same time, their morphological and molecular signatures make them powerful biomarkers and indicators of the progression of numerous diseases.

In this review, we have chosen to highlight exosomes as important actors in the context of viral infections and as potential biological tools that could pave the way for new strategies to combat these infections. Our emphasis on exosomes among all EVs is grounded in the notable ability of viruses to corrupt the exosome biogenesis pathway, and the extensive data related to the transport of viral components by exosomes. Their use as biomarkers in the context of viral infections is also an area of study that is becoming well documented. In addition, their ability to present antigens and the development of engineering methods to tailor their content make them interesting therapeutic tools, and especially promising immunogenic tools for vaccine development.

In light of the latest data in the literature, our aim was firstly to provide insight into the known features of exosomes. We sought to understand how their biogenesis, specific loading, and interaction with targeted cells can lead to specific physiological responses. We then provided an overview of what is known about exosomes in the biology of viral infection, notably that of flaviviruses. In doing so, we sought to unveil the dual roles of exosomes, which are powerful players in the immune response, permitting the resolution of infections and viral clearance. Conversely, exosomes are often hijacked to promote virus dissemination or the vectorization of viral factors, contributing to infectious pathophysiology. We then focused on the potential of exosomes to be reliable indicators of health and disease, turning them into valuable biomarkers. After a brief overview of the potential of exosomes as diagnostic tools, we also addressed their interest as therapeutic tools. This involves engineering methods aimed at controlling exosome content to deliver drugs. In line with the abundant literature examining the function of exosomes in mounting adaptive immune responses during viral infections, our main goal was ultimately to explore the capacity of exosomes to vectorize immunogenic viral antigens. As exosomes provide

interesting platforms for antigen presentation, we reviewed the available data on exosome engineering, which allows peptides of interest to be addressed at their surface. In the light of all these data, we propose exosomes as emerging and promising avenues for vaccine strategies. Figure 1 provides an overall diagram outlining the different goals of our review, with a particular focus on exosomes in the context of viral infections. Additionally, it highlights their role as manipulable tools for infection control and vaccine design.

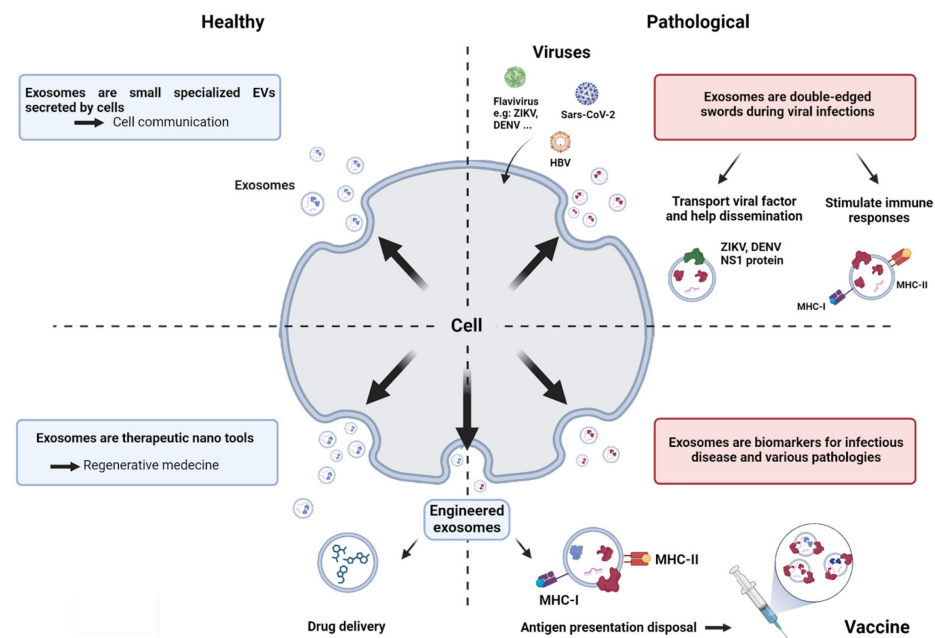


Figure 1. Overall diagram outlining the different aims of the present review, with a particular focus on exosomes in the context of viral infection, as antigen presentation disposals, and as antigen-presenting devices in vaccine strategies.

2. Exosomes Are Small, Specialized Extracellular Vesicles (EVs)

Extracellular vesicles (EVs) refer to all lipid vesicles released by cells. Despite an ever-changing nomenclature, EVs are distinguished by their biogenesis pathways, morphology, molecular composition, and size [11,12]. According to a substantial body of literature, the size of EVs serves as a reliable indicator in determining their nature and origin. This led to the identification of three subcategories of EVs: first, blebs and apoptotic bodies, with sizes reaching up to 5 μm ; then, microvesicles, also called ectosomes, ranging between 100 and 500 nm, and sometimes even up to 1000 nm; lastly, exosomes, which exhibit diameters varying between 30 and 150 nm [13,14]. The first two subcategories are produced by shedding from the cell surface, with blebs being generated in the late stages of apoptosis. Their membranes derive from the plasma membrane of the donor cell. In contrast, exosomes proceed from biogenesis pathways and derive from endosomal membranes. They are released through exocytosis and follow cell secretion pathways.

EVs are constitutively produced by a wide variety of cell types. The capacity of cells to release vesicles appears to be a highly conserved mechanism throughout evolution, and has even been observed in bacterial communities [15,16]. As a consequence, large quantities of EVs can be detected in extracellular compartments. In humans, exosomes can be found in almost all body fluids, including blood, cerebrospinal fluid, saliva, breast milk, and urine [13,17–19]. When first discovered in the late 1980s, exosomes were initially considered as cellular waste. Nevertheless, it has been shown that EVs play a crucial role in intercellular communication, both in physiological and pathological conditions, and maintain homeostasis at cellular and systemic levels [20,21]. This role is fulfilled by their ability to encapsulate and transport diverse yet specific cargoes of complex biochemical composition: as it is, proteins, lipids, secondary metabolites, and nucleic acids have all

been found within exosomes. This characteristic positions them as true unconventional secretory systems [22].

The action of EVs has been described to either occur in the vicinity of their production site, thus promoting autocrine or paracrine signaling, or at a distance from their secretion site, serving as stable conveyors of signaling molecules with endocrine action [23]. Exosome interaction at the surface of recipient cells, and their potential uptake, may elicit pleiotropic responses and induce phenotypic changes [24]. The *in vitro* biological effects of exosome exposure have been extensively documented. However, the exact physiological or pathological roles of exosomes *in vivo* are yet to be fully understood, offering a significant area for further research. Their production and behavior in the biology of viral infections deserve particular attention, as detailed below. Indeed, their importance as molecular signatures and prognostic biomarkers in the evolution of infectious diseases and several other pathologies will be explored in subsequent paragraphs. Due to the close proximity between the intracellular sites of exosome production and those of viruses, a strong inter-relationship should necessarily be established in infected cells. Therefore, a comprehensive understanding of exosome biogenesis is particularly relevant for studying their role during viral infections.

2.1. Exosome Biogenesis

Exosomes are small EVs that have their own biogenesis pathway within cells, prior to their release into the extracellular environment. Krylova and Feng recently reviewed the extensive literature dealing with their biogenesis mechanisms [25]. Exosome formation occurs in cellular compartments called multivesicular bodies (MVBs), which proceed from the maturation of endosomal compartments [26]. This process is illustrated in Figure 2A. Endosomes are intracellular sites of convergence for vesicular trafficking originating mainly from the cell surface [27]. A broad range of substances can travel through the endomembrane compartments [28,29]. Following their internalization by receptor-dependent endocytic pathways, captured molecules reach early endosomes [30]. The endosomal compartment includes recycling components, which undergo centrifugal vesicular trafficking back to the plasma membrane. Alternatively, early endosomal components undergo maturation in late endosomes with more acidic content, closely related to autophagosomes. The remodeling of late endosomes into MVBs occurs after the invagination of their membrane. This results in the formation of a multitude of small vesicles called intraluminal vesicles (ILVs) [31,32]. In the course of this remodeling process, ILVs can be loaded with exceptionally diverse molecules ranging from cytosolic proteins to metabolites, lipids, and even nucleic acids. An exocytosis mechanism allows MVBs to fuse with the cell membrane, releasing ILVs into the extracellular compartment where they become exosomes. Otherwise, MVBs are routed to the lysosomes where their content is degraded, including membrane receptors [33,34]. The ILV genesis process relies on an intricate protein machinery called the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) which reshapes the endosomal membrane topology [35,36]. During MVB formation, the ESCRT allows the intraluminal budding of vesicles and the sorting of embedded cargo proteins. The ESCRT comprises around twenty proteins, including ALG-2-interacting protein X (ALIX), tumor susceptibility gene 101 (TSG101), and charged multivesicular body protein 4a (CHMP4). The molecular actors of ESCRT are organized into four cooperative complexes called ESCRT-0, -I, -II, and -III, which are conserved from yeast to mammals [37]. The ubiquitination of proteins located on the endosomal membrane drives the inward budding. ILVs containing ubiquitinated proteins are destined to be degraded into the lysosome. The de-ubiquitination of these proteins by the de-ubiquitylating enzymes (DUBs) will rescue the ILVs from degradation. Numerous studies have also shown that phosphoinositides, ceramides, and the lipid composition of the endosomal membrane as a whole are key factors in the biogenesis of ILVs [38,39]. It is also worth mentioning that ESCRT-independent mechanisms have been delineated as alternative systems for the formation of ILVs, and that vesicle release by cells could also occur from lysosomes [40–42]. In addition, a process involving tetraspanin enrichment appears

to be important for membrane remodeling and ILVs formation [43,44]. Tetraspanins are a family of transmembrane proteins including CD9, CD63, and CD81, which are abundantly found in MVBs and ILV membranes [45,46]. They are therefore frequently used as markers for identifying EVs of exosomal origin [47]. However, it is important to emphasize that the presence of CD9 and CD81 has also been observed on the plasma membrane. Hence, CD63 remains the most specific tetraspanin marker for exosomes [48]. Tetraspanins are known to participate in the cargo sorting process that occurs during ILV formation and could also play a role in determining the specificity of exosomes for particular recipient cells [44,49]. The selective process of cargo sorting and the specific components required for the biogenesis of exosomes have a tremendous impact on their final composition.

The final stage in the cellular production of exosomes is their release into the extracellular environment. Exosome secretion by cells appears to be a continuous mechanism but with quantitative and qualitative controls. It is known that specific interactions between Rab proteins and SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) complexes control the intracellular trafficking of MVBs and determine their subsequent destination [50–53]. An increase in the quantities of circulating exosomes has been particularly noticed in many pathological situations. The increased production and secretion of exosomes with modified content is indeed part of cellular responses to various stresses. This confirms the role of exosomes as vectors of mediators, assisting cell to cell communication in these stressful situations. The internal and environmental factors regulating MVB exocytosis are not yet fully understood. According to Xu et al., these include, but are not limited to, intracellular Ca^{2+} concentrations, MVB acidification processes, nutrient and oxygen availability, and oxidative metabolism. Additionally, various signaling pathways, including those of growth factors, contribute to this complex regulatory network [54].

In conclusion, the biogenesis and secretion of exosomes emerge as pivotal biological programs orchestrated by our cells to navigate through diverse physiological situations, environmental changes, and stresses. This program aims to emit vesicular communication devices that will complement the arsenal of soluble mediators. These vectored messages will in turn inform recipient cells, which will respond by adapting their biological activities. Various stimuli lead to the subsequent reprogramming of biogenesis mechanisms, resulting in the repackaging of exosomal cargo. Therefore, the molecular composition will determine the nature of the message and its targets.

2.2. Exosomes Composition

A non-exhaustive schematic representation of a canonical exosome, with some of its typical compounds and cargoes, is illustrated in Figure 2B. During their formation, ILVs are loaded with both membrane and soluble cytosolic proteins. Some components, mostly involved in their biosynthesis process, are common denominators further shared by all released exosomes. Tetraspanins, syntenin-1, TSG101, and ALIX are considered molecular signatures of exosomes and, in this regard, could serve as reliable markers, differentiating exosomes from other EVs [55]. Tetraspanins (i.e., CD9, CD63, and CD81), which are strongly represented in the membrane, play an important role in cell contact, uptake, and membrane fusion events [56]. Embedded within the membrane, various adhesion molecules (e.g., integrins, ICAM-1) have been identified [57]. Adhesion molecules could allow the docking of exosomes at the surface of recipient cells, prior to their internalization. The diverse nature of adhesion molecules, as well as their relative abundance at the exosome surface, are likely influencing their selectivity for recipient cells. Thus, depending on their relative abundance at the exosome surface, these membrane adhesion factors may reflect pathological situations. In cancer, for example, integrin display patterns have been closely associated with the organotropism of tumor exosomes, whose uptake contributes to tumorigenesis [58,59]. Additionally, major histocompatibility complex (MHC) type I molecules can be found in the membrane of exosomes, albeit in variable quantities according to cell type and local microenvironment. MHC class II and co-stimulatory molecules are more restricted to exosomes secreted by professional antigen-presenting cells (APCs). However,

both MHC-I and MHC-II are required for mature exosomes to prime naive T cells [60]. Interestingly, the presence of functional MHC–antigenic peptide complexes could confer exosomes with a prominent ability to initiate adaptive immune responses [4,21]. Regarding the protein content of exosomes, various chaperones are loaded into exosomes and use this alternative secretion pathway to join in extracellular networks. These include members of the heat-shock proteins (HSPs) and J-domain proteins [61]. In addition, positive correlations have been described between HSP70 levels in exosomes and cancer malignancy [62]. Of note, the presence of traditionally abundant proteins in exosomes, such as cytoskeletal proteins, GAPDH, and even HSPs, has become a topic of controversy. These uncertainties regarding exosome content arise from advances in techniques for separating small vesicles and the growing availability of powerful analytical methods, such as mass spectrometry, for studying their proteomes [63]. Other exosomal components are more specific and may be uniquely related to cell types and their physiological state [1,64,65]. Thus, the content of exosomes may reflect the molecular composition of the producing cell, and indicate the specific biological activities elicited in the recipient cells [66,67]. Importantly, cells are able to adjust their exosome production both qualitatively and quantitatively, further supporting the implication of EVs in intercellular communication. This also suggests that the content of ILVs is not the mere result of passive diffusion, the loading process being actively orchestrated by cells. As mentioned in the previous paragraph, the control of exosome release and packaging depends on a variety of stimuli, allowing the secretion of exosomes carrying fine-tuned messages [43].

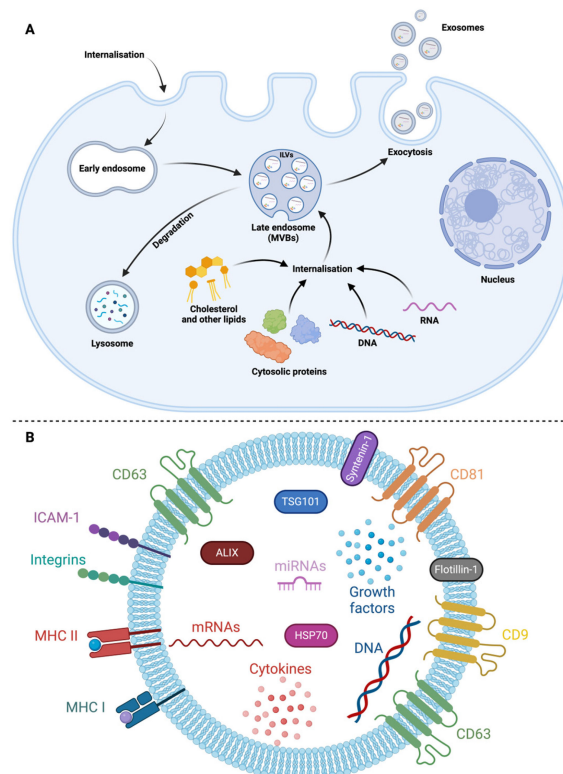


Figure 2. Insights into exosome biogenesis and composition. (A). Exosomes biogenesis. The early endosomes produced by the endocytic pathways can mature into multivesicular bodies (MVBs). During their formation, the intraluminal vesicles (ILVs) are loaded with cytosolic material like proteins, lipids, and nucleic acids. MVBs have two possible fates. They are either directed to lysosomes, enabling the degradation of ILV constituents, in particular membrane components, or released by exocytosis, enabling the externalization of ILVs, then called exosomes. (B). Schematic representation of an exosome and its standard cargo. Exosomes are delimited by a phospholipid bilayer membrane containing proteins from the tetraspanin family, such as CD9, CD63, or CD81.

The intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and major histocompatibility complex MHC I and/or II are detected in variable proportions in the membrane, depending on the emitting cells, and contribute to the biological or pathological functions of exosomes. The ALIX protein is identified within these vesicles, serving as one of the primary intravesicular markers. Additional intra-exosomal markers exist, such as the tumor susceptibility gene 101 (TSG101), which plays a critical role in exosome biogenesis and secretion. A variety of chaperones, including members of the heat shock protein 70 (HSP70) family, could use this unconventional secretion pathway. In addition to proteins, these vesicles can carry nucleic acids, including DNA and RNA such as miRNA. Adapted from Kowal et al. [57]. Created with [Biorender.com](#).

In response to specific contexts, cytokines and various mediators seem to be able to use the exosomal vectorization pathway. This has been documented for interleukin-1 β (IL-1 β), which can be loaded and transported via exosomes in inflammatory and pyroptotic contexts [68,69]. IL-6, IL-10, and TNF- α could also be transported in this way, giving these mediators a longer lifespan in body fluids and reinforcing exosomes as suitable markers for prognosis and diagnosis [70]. The broad diversity of exosomal content also suggests a trafficking between cellular compartments that remains poorly understood. For example, MVBs and autophagosomes have been shown to interact, allowing cargo exchange. This proximity may also favor the release of exosomes [71].

Besides proteins, exosomes contain lipids which shape their membrane and contribute to their biogenesis pathway [72]. Sphingomyelin, phosphatidylserine, glycosphingolipids, and regulated concentrations of cholesterol are the hallmarks of ILVs and exosome membranes. Thus, cholesterol-enriched MVBs appear more prone to lysosomal digestion, while lower cholesterol levels are more associated with the exocytosis pathway [73].

Exosomes also carry nucleic acids like short DNA molecules, small RNAs, and especially miRNAs [74,75]. Deep sequencing RNA techniques confirmed that many types of non-coding RNAs were loaded into ILVs. Their composition depended on cell types and cellular contexts. Several heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (HNRNPs) and RNA-binding proteins have been shown to promote RNA sorting and loading in ILVs. Additionally, they could play a role in RNA function in target cells. These mechanisms were extensively reviewed by Corrado et al. [76].

Remarkably, and in the light of numerous data in the literature, it is clear that exosome composition in terms of miRNAs undergoes significant changes under different physiological and pathological conditions. For instance, studies on the effects of exposure to a set of environmental factors, known as the 'exosome', on carcinogenesis processes have demonstrated an unexpected role for exosomes. Data recently reviewed by Kalita-de Croft et al. report that exosomes produced after the exposure of cells to various chemicals, including arsenite and other substances present in cigarette smoke, exhibited an altered miRNA content. This finding highlights exosomes as sensors of these exposures and as biological players ultimately participating in pathophysiological processes [77].

This variability is well regarded for its prognostic and diagnostic properties. Consequently, the quantity and content of exosomes derived from patients plasma emerge as a valuable tool for monitoring the progression of diverse pathologies [78], from autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis [79,80] to cancers [81]. These aspects will be elaborated further below. The observation of changes in exosome composition under pathological conditions also suggests that the molecular variability, as well as the way exosomes interact with their target cells, are at the origin of a broad range of biological responses in the recipient cells.

2.3. Exosome Biological Activities according to Their Mode of Interaction with Recipient Cells

The enrichment of exosomes with various components underscores their intricate nature and the potential for functional diversity. There is extensive literature on the messenger functions of exosomes, during immune responses or pathophysiological situations like tumor development or host–pathogen interactions [82]. Recipient cells may be near

or distant from the exosome-shedding cells and are reached because EVs can circulate in a wide range of biological fluids. It can naturally be inferred that the vesicle-mediated transport of biological mediators may protect them from degradation; however, this feature has not been fully verified *in vivo*. While EVs can remain stable in serum for days, their half-life in circulation is notably brief. Studies in mice indicate that exogenous EVs exhibit a very short half-life (2–10 min) in the blood circulation [83]. This brief circulation time could, however, be attributed to a rapid uptake of circulating EVs by scavenger cells like monocytes and endothelial cells. Indeed, several studies have shown that small EVs have no difficulty in crossing endothelial and blood–brain barriers, sometimes by transcytosis, and thus diffuse widely into tissues [84–86].

Exosomes appear to be able to interact with their target cells in various ways [53,64]. Firstly, they can act through direct contact with cell surfaces. This is the case for exosomes that carry MHC–peptide complexes and can induce the activation of TCR receptors on T lymphocytes [60]. Another example is given by exosomes produced by melanoma cells that are loaded with FasL ligand during their biogenesis. They can induce apoptosis in recipient lymphocytes by mere contact [87]. Although a simple contact between exosomes and their recipient cells is sometimes sufficient to trigger signaling pathways, effective phenotypic changes are more likely to be achieved through the transfer of exosome content into recipient cells. The ability of exosomes to deliver their cargoes has been a longstanding hypothesis, and it has been demonstrated only recently. The release of intra-exosomal molecules into the cytoplasm is achieved by membrane fusion, either directly with the plasma membrane or after endocytosis and transit through the endosome where a back-fusion process takes place. A functional assay has been developed to verify that membrane fusion, exposing the luminal face of the exosome to the cytoplasm, occurs following exosome uptake. The assay is performed using exosomes engineered to vectorize a transcription factor which enables the expression of a reporter gene upon its intracellular delivery [88]. Thanks to this demonstration, the ability of exosomes to deliver their protein content has been assessed and is regularly reviewed [89]. Similarly, it has been shown that small RNAs and miRNAs carried by exosomes can be transferred into recipient cells. Once inside, they retain full functionality and can modify the behavior of the recipient cells through gene expression modulation [90]. The growing body of data on the ability of exosomes to specifically vectorize and deliver various types of molecules to cells has clearly opened up tremendous new avenues for their use as nano-therapeutic tools.

Recipient cells can internalize exosomes through an uptake process that can be visualized through several imaging techniques [91]. The mechanisms by which recipient cells take up exosomes have been the subject of extensive research for over 20 years [92,93]. Although macropinocytosis may be a potential entry mechanism, the capture of exosomes appears to be quite specific. However, the recognition process by which exosomes are identified by their target cells remains poorly understood, and receptors specialized in exosome uptake have not been formally identified yet [94]. It has been proposed that T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule 4 (TIM4) could bind to exosomes through the phosphatidylserine exposed at their surface [95,96]. Other studies have suggested that exosome endocytosis may result from their interaction with heparan-sulfate proteoglycans [97], or syndecan 4 [98]. Once internalized, exosomes have several possible fates. They may follow a recycling path, and before being returned to the extracellular environment, acquire new cargoes. They may undergo lysosomal digestion, or release their cargo into a recipient cell cytoplasm through a pH-dependent fusion process with endosomal membranes [99]. The factors and mechanisms that govern the fate of exosomes after the internalization process remain to be fully elucidated.

Once they have reached their target cells, exosomes perform their messenger functions. As in intercellular communication based on soluble signal molecules and membrane signal receptors, these responses are behavioral or phenotypic. The biological effect of exosomes has been particularly well studied in pathological contexts, in order to elucidate their positive or negative role in disease progression, with a view to identify new therapeutic players

or targets. Their role in cancerous processes has notably received particular attention, enabling the scientific community to unravel the mechanisms of exosome capture and action. At the same time, the communication system driven by EVs in cancer revealed an extreme complexity of both pro- and anti-tumor effects [100–102]. For example, EVs derived from malignant cells, which differ in content from exosomes produced by healthy cells, have been shown to play a key role in liver pre-metastatic niche initiation during pancreatic cancer [58,59]. Moreover, exosome transfer from highly metastatic to poorly metastatic tumor models has been shown to increase the metastatic behavior of the latter model [103]. It remains to be elucidated how exosomes shape the microenvironment of those pre-metastatic niches. However, the selective uptake of exosomes by Kupffer cells in the liver was proposed to induce the activation of fibrotic pathways and a pro-inflammatory environment that supports metastasis formation [104]. Mechanisms such as vascular permeability impairment or local immunosuppression may be involved. Indeed, exosomal hepatocyte growth factor (HGF) receptor was shown to skew hematopoietic stem cells towards pro-vasculogenic phenotypes. Additionally, C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) facilitates the uptake of tumor exosomes by immune cells, which ultimately leads to the enrichment of myeloid suppressive cells at future metastatic sites [105,106]. The communication system woven through EVs appears to be particularly prevalent during carcinogenesis, suggesting that cancer cells have evolved exosome-based strategies to better adapt to their microenvironment. For example, it has been shown that the exosomal transfer of oncomir-like miRNAs by cancer cells induces the reprogramming of recipient cells and promotes prometastatic behavior [107]. Other exosomal miRNAs are suspected to be involved in immune escape by promoting the anergy (activation-induced non-responsiveness) of CD8+ T lymphocytes [108]. A decrease in cytokine production and granzyme B secretion was also observed after the internalization of tumor exosomes by lymphocytes. Moreover, exosome-mediated signaling may not only protect cancer cells from the host immune system, but also contribute to their resistance against anti-cancer therapies. This mechanism has been demonstrated in diverse cancer types, encompassing hematological malignancies, as well as colorectal, breast, prostate, liver, and lung cancers [109]. In their study on pancreatic cancer, Patel et al. demonstrated that gemcitabine-treated pancreatic cancer cell lines could produce exosomes that increased the IC50 (half maximal inhibitory concentration) of non-treated cancer cells [110]. Strikingly, cancer cells that had never been directly exposed to a drug could still display a significant resistance to it. Thus, in the context of cancer, exosomes could play a determinant role in the migration and proliferation of tumor cells, but also in the establishment of a complex communication network with their neighboring cells. This could actively contribute to angiogenesis, remodeling the tumor immune microenvironment by disrupting the conventional cross-talk between immune cells, thereby promoting the formation of tumor niches [111,112]. The dual function of exosomes in the tumor context, with their strong capacity to ensure communication but with adverse pro-tumor effects, has led to the development of two main types of exosome-based anti-cancer strategies. One is based on the inhibition of EV trafficking to improve new therapeutic combinations [113]. Another is based on the engineering of exosomes to use them as nano-vectors for therapies [114].

Considering the amount of research carried out on the cellular responses and phenotypic changes induced in cells exposed to exosomes, it is very challenging to give an exhaustive overview. Among other examples of phenotypic changes induced, exosomes were shown to contribute to the polarization of macrophages [115]. Exosomes have also been described as players in epithelial–mesenchymal transition (EMT) in a variety of pathological conditions, including fibrosis and cancer [116,117]. However, the miRNA content of exosomes, depending on the emitting cells, would mediate potentially antagonistic effects on EMT, revealing both the promotion and inhibition roles [118,119].

In conclusion, the vast amount of data on the biological effects of exosomes reveals the multifaceted nature of exosome-mediated cellular communication. The substantial development of research into their activities in the field of cancer confirms their key role

in the progression of these diseases. Meanwhile, this intensive research has also revealed the difficulty of exploring the fate of exosomes *in vivo*, leading to potential controversies and limitations. Despite the often ambiguous and challenging-to-delineate activities of exosomes, harnessing their knowledge could help find sustainable applications, including innovative diagnostic approaches and targeted therapeutic interventions. This paves the way for further exploration of personalized medicine and precision therapeutics.

Although the interest in exosomes in the field of infectious diseases is more recent, there is a constantly growing number of studies on the role they could play in the resolution of viral infections, in the clearance or persistence of viruses, and in the evolution of infectious pathophysiology. In addition, specific molecular signatures linked to the vectorization capacities of viral factors reveal that exosomes could serve as biomarkers for monitoring infectious diseases. A detailed overview of the data in this area deserves our attention.

3. Exosomes and Biology of Infection

The particular biological context arising from the infection of tissues has prompted scientists to investigate whether exosomes could exhibit a modified profile. Numerous studies have shown that exosome biogenesis in infected cells was altered, leading to increases in their production and modifications in their content. Such results were obtained for *in vitro* infections with several phylogenetically unrelated families of both RNA and DNA viruses, and confirmed by analyses of biological samples, e.g., patient plasma [120–125]. In particular, an increase in exosome quantity has been revealed in the case of infection with flaviviruses, notably Dengue (DENV) and Zika (ZIKV) viruses. This was observed *in vitro* during the first 24 h of infection and was accompanied by a change in EV size [126]. The ability of exosomes to move bidirectionally from the plasma membrane, and across the endosomal pathway, has aroused suspicions about their possible involvement in the dissemination and pathogenesis of intracellular pathogens (viruses, parasites, and intracellular bacteria). However, it is increasingly documented that exosomes play an active role in mounting the immune response, which commonly provides beneficial effects to the host in the course of an infection. In this paragraph, we will attempt to review the literature and expose the striking ambivalence of exosomes during viral infections, the main aspects of which are summarized in a schematic representation (Figure 3).

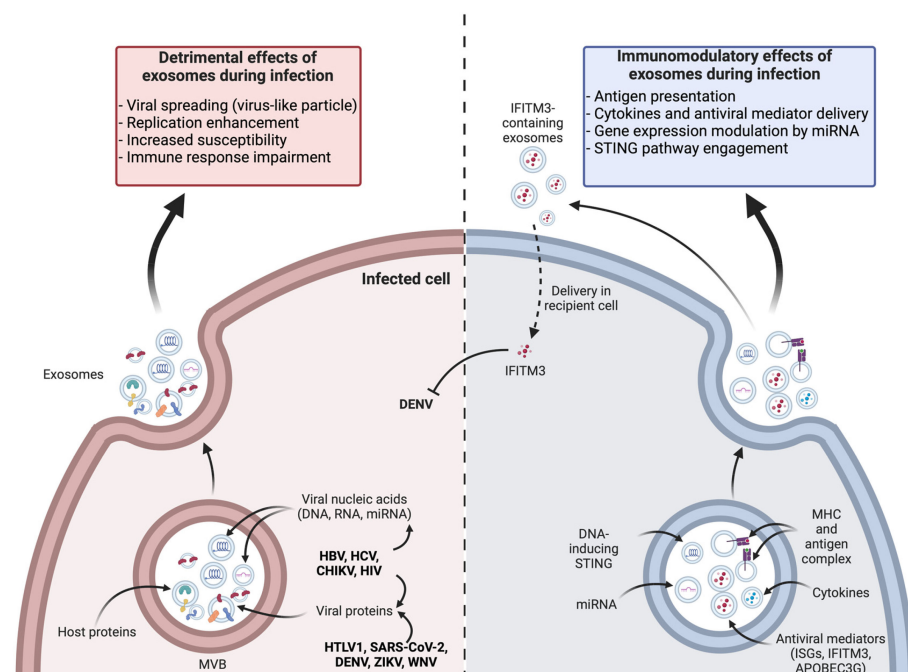


Figure 3. Exosomes are double-edged swords during infection. On the one hand, exosomes may have detrimental effects during infection by promoting viral replication, impairing immune response, and

increasing susceptibility, ultimately leading to enhanced viral spreading. On the other hand, exosomes can participate in controlling infection through their immunomodulatory effects, including antigen presentation, the delivery of cytokines and antiviral mediators, miRNA delivery, and the engagement of the stimulator of interferon genes. Created with [Biorender.com](https://biorender.com).

3.1. Exosomes May Contribute to Viral Dissemination

Many viruses exploit intracellular trafficking mechanisms to complete their multiplication cycle. They initially interact with the cell surface and commonly follow pathways leading to endosomes. The assembly and budding of enveloped viruses share many similarities with the biogenesis of small EVs, as both processes rely on cellular membranes. Consequently, it is unsurprising that some viruses may interfere with the biogenesis of MVBs and the production of exosomes. In particular, the ESCRT system, which is required for the formation of ILVs, has been found to be an essential tool for the production of enveloped viruses. Numerous studies have shown that many viruses hijack the ESCRT system to promote their own budding and, thus, the efficiency of their production and dissemination [127,128]. Flaviviruses are particularly concerned, and numerous studies have shown the dependence of their viral cycle on ESCRT-dependent membrane remodeling [129–131].

In line with these findings, it can be hypothesized that MVB formation and the release of exosomes are disrupted, and this defect may favor the virus at the expense of homeostasis control. The hijacking of exosome biogenesis might additionally confer the ability of viruses to target crucial components within exosomes, including their own viral nucleic acids, as well as viral proteins or even complete virions. This was notably shown with the hepatitis B virus (HBV) [132], and since the role of EVs in infections has been studied, examples of viruses using host exosomes as transport systems for their factors have become widespread and are regularly and recently the subject of comprehensive reviews [133,134]. This ability has led to a Trojan Horse hypothesis that exosomes actively contribute to infectious pathogenesis, helping some viruses to evade immune system recognition and sometimes facilitating viral persistence [135]. Hence, the hepatitis C virus (HCV), like other *Flaviviridae* family members (e.g., flaviviruses like DENV, ZIKV, or West Nile virus), enters through endocytosis and releases its genome by a “back fusion” phenomenon which is comparable to the one observed for exosomes [136,137]. But a particularity of HCV is that its genome can be included in ILVs, following the endocytosis of the virus and its transit through endosomes. This viral genetic material is then released into exosomes [137]. Strikingly, these exosomes were shown to act as pseudo-viral particles that can efficiently infect recipient cells [138]. This alternative transport of viral material could even diversify the tropism of viruses, which is thought to be restricted by the display of appropriate receptors on permissive cells. In their recent review of the literature on EVs in *Flaviviridae* pathogenesis, Latanova et al. cite several studies supporting the ability of EVs to assist neurotropic flaviviruses such as ZIKV and WNV in their neuroinvasive capacities [139]. Similarly, exosomes derived from epithelial cells infected with the Chikungunya virus (CHIKV), a member of the alphavirus genus, have been shown to transport viral RNA and proteins. These exosomes were able to infect naive epithelial cells [140]. This unexpected mode of transmission raises questions about the general ability of viruses to use exosomes as alternative routes of entry into cells [141]. This mimicry with a physiological mode of EV transport and capture could indeed diversify the cellular tropism of viruses and contribute to their escape from the immune system.

Viruses could also use exosomes as a way to transport non-infectious subgenomic RNAs, thus promoting viral replication and dissemination. During human immunodeficiency virus (HIV) infection, HIV-associated RNAs (including TAR, trans-activation response element) have been detected in infected T cell-derived exosomes. These RNAs were able to down-regulate apoptotic signals in recipient cells, thus presenting an improved support of HIV replication [142]. Viral RNAs could also contribute to an accentuation of pro-tumor profiles, especially in Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma (HNSCC) cancers. Indeed, it has been shown that infected T cell-derived exosomes carrying TAR pro-

moted the proliferation of cancer cells and induced proto-oncogene expression in recipient cells [143].

In addition to viral RNAs transported in exosomes, virus-derived miRNAs could also exert numerous adverse effects in recipient cells. For example, miRNAs encoded by the Epstein–Barr virus (EBV) and produced by infected cells are able to inhibit genes involved in antiviral activities and inflammation in neighboring non-infected cells through exosomal transfer [144]. During Japanese encephalitis virus (JEV) infection, activated microglial cells release let-7a/b miRNAs through extracellular vesicles [145]. These miRNAs activate caspases in uninfected neuronal cells, potentially contributing to bystander neuronal death. Additionally, in COVID-19 patients, SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) RNA was detected in plasma-derived exosomes, with a distinct proteomic signature. Based on the proteomic analysis, these circulating exosomes could potentially contribute to various processes like coagulation, inflammation, and immuno-modulation during SARS-CoV-2 infection [146].

Viral proteins also use exosomes as effective delivery systems. For example, during HIV infection, the viral membrane protein Gag and the virulence factor Nef have been identified in exosomes derived from infected cells [147,148]. Of note, exosomal Nef was shown to restore the infectivity of Nef-deficient HIV virions in recipient cells. Exosomal Nef also triggers apoptosis in CD4+ T cells and endothelial cells, contributing to the pathophysiology of the infection [149]. On further note, Nef attenuates the effect of RNA interference in recipient cells due to a modification of the miRNA content of exosomes [150]. Other viruses are known to promote the incorporation of their proteins into exosomes, which facilitates their replication or enhances the susceptibility of recipient cells. Such mechanism has notably been reported for the glycoprotein B of cytomegalovirus (CMV) [151], as well as the E2 protein of HCV [138]. Mishra et al. reviewed the data concerning the role of exosomes during Dengue fever. As it appears, exosomes produced in response to DENV infection are also thought to facilitate the cell-to-cell transmission of viral particles by spreading various viral factors that enhance the susceptibility of cells and promote immune evasion. The various cargoes carried by exosomes could modulate immunity in T lymphocytes and platelets, and their action on endothelial cells may contribute to the pathophysiology of Dengue fever, notably vascular permeabilization during hemorrhagic forms of the disease [152].

The enclosure of viral factors in exosomes supports the Trojan Horse hypothesis, since the hijacking of exosomes by viruses seems an excellent means of promoting their incognito trafficking. Their capacity for prolonged circulation, as well as their nano-size and consistent shape give them access to extracellular spaces, thus explaining the efficient diffusion of their cargo. Moreover, exosomes can act as an effective platform to circumvent immune surveillance. As such, exosomes from APCs were shown to express membrane regulators of complement (CD46, CD55, and CD59) on their surface, preventing the activation of opsonin and coagulation factors [153]. Exosomes are thus protected from destruction by the complement cascade, warranting their stability and large-scale distribution in biofluids. In general, EVs have demonstrated their ability to regulate complement activity, albeit with variable effects, but contributing to the pro- and anti-inflammatory immune balance [154,155].

Finally, some infectious agents have the ability to corrupt exosome biogenesis to influence the localization of host-specific proteins, either by addressing them to exosomes, promoting their display at the cell surface, or concealing them in endosomal compartments. These mechanisms are mostly favorable to viruses and their ability to escape the immune system. For instance, HIV has been shown to promote the availability of its major entry receptors, CCR5 and CXCR4, on exosomes secreted by infected cells. The transfer of these receptors into recipient cells is associated with increased viral susceptibility [156]. Studies on EBV-infected cells have shown that they secrete exosomes with high levels of galectin-9, which triggers the apoptosis of CD4+ T cells and limits Th-1 responses [157,158]. Finally, the escape of herpes simplex virus 1 (HSV-1) from the immune system is due to its

ability to hijack the addressing of viral peptide/HLA-DR complexes by promoting their sequestration in MVBs [159].

Fortunately, the ability of viruses to exploit exosomes is sometimes auspicious from a therapeutic standpoint. Indeed, oncolytic viruses have been introduced as a novel treatment strategy against malignancies. Interestingly, it has been observed that oncolytic adenoviruses could induce a systemic anti-tumor immunity, despite specifically and locally targeting malignant cells. The systemic effect was achieved when infected cells secreted exosomes loaded with viral genomes. Similar to the HCV pseudo-virions mentioned earlier, these exosomes could act as pseudo-viral particles and deliver the oncolytic genomes to other cancer cells. Their ability to circulate in body fluids and infiltrate tissues is in complete accordance with the systemic anti-cancer effect that has been documented for adenoviruses [160,161]. Although it was previously unknown that they could hijack exosomes, those findings may further explain how oncolytic viruses achieve the targeting of distant tumor cells, all the while evading the antiviral immune response.

The study of exosomes in infection biology provides many examples of their proviral effects, which mostly come as a consequence of exosome hijacking. However, many studies have contributed to cast a different light on exosomes, as they also appear to take part in the antiviral cellular responses and seem actively involved in the host response to pathogen intrusion.

3.2. Exosomes Contribute to Infection Resolution

Although their hijacking contributes to viral replication and dissemination, exosomes are canonically known for their aptitude to induce immune responses and their participation in immunomodulatory mechanisms. These functions have been extensively described in tumor processes [162]. The exosomes released during infection could play a similar role in modulating immune responses [163].

First, as stated above, exosomes from infected cells were shown to carry viral nucleic acids. This may lead to the stimulation of pattern recognition receptors in recipient cells (PRRs), such as cyclic GMP-AMP synthase stimulator of interferon genes (cGAS-STING) or RIG-I like receptors (RLRs), as demonstrated in the case of cancer-derived exosomes [164]. The downstream signaling pathways of these PRRs are part of the innate immune system, triggering the expression of inflammatory genes and type I interferon response, which are deleterious for pathogen replication and dissemination [165]. Such mechanisms were notably reported during HCV infection, illustrating the dual role played by exosomes that can have proviral and antiviral activities [166]. Secondly, exosomes can participate in antigen presentation, influencing the adaptive immune response [3]. This ability will be developed further below, as it contributes to the suitability of exosomes for vaccine development.

Supporting their ability to perform antiviral signaling, exosomes have been identified as carriers of various chemokines and cytokines important for infection resolution, like IL2, IL4, IL17, IL21, IL22, IL33, IFN α , IFN γ , TGF β , TNF α , and other antiviral mediators [167,168]. This ability of cytokine encapsulation by exosomes is a feature shared by many viral infections and has even been achieved *in vitro* when stimulating keratinocytes with Poly(I:C) [169]. An exosome-mediated antiviral activity has been reported in the case of HBV [170] and HIV infections, through the delivery of IFN α and other antiviral mediators [171]. Exosomes produced during DENV infection carry the interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3), which promotes antiviral activities from cell to cell [172]. The cells that release such exosomes in response to infection are of several types, and this activity follows the stimulation of innate immunity pathways. In the case of HIV, IFN α -stimulated macrophages have been shown to produce exosomes enriched with the antiviral mediator apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G), which hinders viral replication in recipient cells and confers them with resistance against HIV [171]. In addition, exosomes produced by TLR3-activated human brain microvascular endothelial cells were shown to carry mRNA and proteins of several interferon-stimulated genes (ISG), ISG15, ISG56, and Mx2, which could be transferred to re-

recipient macrophages [173]. As final examples, exosomes derived from respiratory syncytial virus (RSV)-infected cells and carrying viral proteins were shown to trigger the production of various chemokines like monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interferon gamma-induced protein (IP-10), and (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) RANTES by monocytes [120]. Moreover, EVs released by DENV-infected macrophages that were characterized by the encapsulation of viral proteins and various miRNAs elicited an increased production of ICAM, TNF- α , IP-10, IL-10, RANTES, and MCP-1, triggering an antiviral defense program in endothelial cells [174].

As previously discussed, many viruses can exploit exosome biogenesis pathways to their advantage, and exosome production is often augmented during viral infections. Nevertheless, type I interferon was found to attenuate exosome secretion both in vitro and in vivo, thereby inhibiting their proviral effects. The mechanism is linked to the induction of ISG15, an ubiquitin-like protein that can bind to key actors of exosome biogenesis, notably TSG101, in a process termed ISGylation. This post-translational modification leads to the aggregation and degradation of TSG101, which is sufficient to significantly reduce exosome secretion by promoting the lysosomal degradation of MVBs [175,176].

Ultimately, an increasing number of studies have explored the capacity of exosomal miRNAs to modulate gene expression in recipient cells and improve their ability to reduce infection. For instance, exosomes derived from human trophoblast cells carry miRNAs inducing recipient cells to display higher levels of autophagy. Autophagy is a physiological process of protein and organelle turnover that is tightly linked with endosomal compartments and vesicular trafficking. As the production of viral progenies exclusively relies on the cell machinery, autophagy could impair the replication of various viruses through the sequestration of essential replication factors, the disruption of viral factories and replication platforms, or the addressing of newly synthesized viral particles to lysosomes [177]. Similarly, miR-483-3p, which is found in high levels in the serum of H5N1 influenza virus-infected mice, has been shown to mediate the expression of proinflammatory cytokines in vascular endothelial cells [178]. This could perhaps establish a systemic antiviral state that promotes the resolution of the infection. These examples illustrate how exosomes can globally alter cellular metabolism and provide cells with effective defense mechanisms to fight against viruses.

In conclusion, numerous studies attest that viral infections lead to a quantitative and qualitative modification of exosomes. Exosome signaling must be considered as a fully-fledged response, having a bidirectional regulatory effect on host–pathogen interaction. The hijacking of the exosome machinery enables pathogens to spread viral material and escape immune surveillance, whereas bona fide exosomes negatively regulate pathogen replication by transmitting antiviral mediators or immunomodulators and orchestrating immune defenses. The role of exosomes in facilitating the exchange of molecules and promoting their effective diffusion in tissues has inspired scientists to develop exosome-based therapies. These therapies have found applications in the fields of regenerative medicine, pharmacology, and vaccinology, as shall be discussed in the following section. Moreover, the quantitative increase in circulating exosomes observed during viral infections often correlates with the severity of the disease, as illustrated by flavivirus infections, notably with Dengue virus [139,179]. Exosomes are thus biomarkers of viral disease progression. This clinical use of exosomes to monitor the progression of a pathology is a new avenue being explored in human medicine. We shall provide a brief outline of this topic in the next section.

4. Exosomes as Biomarkers of Pathologies in Human Medicine

In the past few years, the use of exosomes as biomarkers and diagnostic tools has surged. Exosomes can be easily isolated from almost all body fluids, such as blood, urine, saliva, and even amniotic fluid [180]. The use of exosomes as indicators of physiological conditions is anecdotal. For example, they are a potential tool for fetal sex determination [181]. Most importantly, the quantity of circulating exosomes can serve as an indicator of patho-

logical conditions. Exosome production has been reported to increase in the aftermath of a variety of cancers, in viral infections, as well as in acute kidney and cardiovascular diseases. Notably, this increase occurs simultaneously with the onset of the disease, reinforcing the potential of exosomes as early biomarkers [182].

In pathophysiological conditions associated with neurological diseases, viral infections, or cancer, the content of exosomes may undergo significant alterations. Many cancer studies now focus on circulating EVs in an attempt to establish correlations between the quantity or content of EVs and treatment responses, the presence of metastasis, or disease progression [183–185]. The analysis of EVs has emerged as a promising tool for cancer surveillance, surpassing traditional biopsy methods. EVs can be harvested in a minimally invasive manner from multiple biofluids, employing a technique known as liquid biopsy [182]. To meet clinical expectations for the use of exosomes as biomarkers, techniques for the ultrasensitive detection of exosomes from biopsy samples have been developed over the past ten years. Innovative systems based on optical, electrochemical, and electrical biosensors, widely discussed in several recent reviews, have enabled major advances in methods for the high-throughput screening, rapid isolation, and analysis of exosomes [186–189]. Another of their significant advantages lies in the easily detectable and analyzable nucleic acids they enclose. For example, double-stranded DNA molecules in exosomes can be used as predictive clinical biomarkers for cancer diagnosis and prognosis, as they may harbor mutations like KRAS and TP53 in pancreatic cancer [190]. The other candidates on the scene of exosomal biomarkers are miRNAs. Indeed, circulating exosomal miR-17-5p and miR-92a-3p have been associated with the pathological stage and grade of colon cancers [191], whereas miR-21 found in the cerebrospinal fluid can serve as a biomarker for the development of numerous cancers such as glioblastoma [192]. Likewise, circular RNAs (circRNAs), which proceed from mRNA splicing, may also serve this purpose. Their circular structure provides effective protection from exonuclease degradation, thus conferring greater stability compared to miRNAs [193]. Their relevance in cancer diagnosis has been investigated in pancreatic cancers [194].

Exosomes have been recently proposed as interesting tools for therapeutic drug monitoring. Nephrotoxicity is a notorious side effect associated with numerous drugs, including antimicrobials, anti-cancer therapies, and non-steroidal anti-inflammatory drugs. Their deleterious effects on the kidneys are currently monitored through the dosage of plasmatic biomarkers, which, unfortunately, lack sensitivity and specificity. Urinary exosomes could offer a good alternative. Differences in their surface proteins and miRNA content may correlate with specific renal diseases, thus facilitating diagnosis and adequate care [195].

Although exosomes present irrefutable advantages, their use in the clinical setting is yet to be popularized. Indeed, several subtypes of EVs may be found in different quantities in body fluids. If clinically relevant EVs are present in lower abundance, they might go unnoticed by detection methods, leading to potential false-negative results [196]. It should be emphasized that characterizing EVs remains a challenge. The prevailing methods often struggle to distinguish effectively between sub-populations of vesicles. Contaminants, such as viral particles or macromolecules, sharing similar characteristics and sizes, may not be adequately discriminated by the most commonly employed techniques [197]. Because of these limitations, experimental data should always be interpreted with great caution. Moreover, isolation methods and cargo analysis are often labor-intensive. Current techniques not only lack standardization but also require costly laboratory equipment that needs precise stewardship. This constitutes a lack of practicability that is currently incompatible with widespread use. As mentioned above, the development of ultrasensitive methods like microfluidic technologies and ongoing miniaturization efforts may address these challenges [198]. It is noteworthy that exosome-based diagnostic tools have already been trialed in clinical settings, demonstrating promising results in guiding clinicians to establish proper therapeutic interventions, as illustrated in this study on high-grade prostate cancer [199].

Exosomes appear as valuable biomarkers in the diagnosis of diseases and therapeutic drug monitoring. Nevertheless, their clinical potential could stretch even further. Their propensity to transport diverse molecules, coupled with their malleability, could propel exosomes into becoming nano-vectors of therapeutic molecules. In addition to their diagnostic features, exosomes could therefore acquire curative properties, as we shall explore in the next section.

5. Exosomes as Therapeutic Tools

Beyond their role as a diagnostic tool, EVs have received particular attention as highly promising therapeutic tools. Exosomes naturally produced by stem cells have demonstrated properties in tissue regeneration that could be used for therapeutic purposes. The unique ability of exosomes to carry a variety of cargo makes them valuable candidates for the targeted delivery of biologically active compounds. Thus, exosomes that have been specially designed to carry therapeutic molecules could be directed to specific cell types or tissues, offering a level of precision that is not always attainable with conventional drug delivery methods. In addition, exosomes have demonstrated their ability to cross biological barriers, enhancing their ability to reach target sites. Their natural role in intercellular communication further enhances their therapeutic utility. Exosomes show promise in a wide range of medical applications, from the treatment of cancer and infectious diseases to neurological disorders. Current research aims to unlock the full therapeutic potential of exosomes, paving the way for innovative and personalized approaches. This section will delve into the roles of exosomes in regenerative medicine and drug delivery.

5.1. Exosomes from Mesenchymal Stromal Cells in Regenerative Medicine

In recent decades, there has been a concerted effort in the development of regenerative medicine to heal tissues, restore their function, and hinder their senescence. As it is, many debilitating affections like cancer, chronic inflammatory, or neurodegenerative diseases remain incurable, and the absence of effective therapies has too often left the medical community powerless. Fortunately, the flourishing field of regenerative medicine offers several therapeutic prospects. Among these, cell-based therapy is being thoroughly investigated, and many cell types are currently examined for their regenerative properties, such as chimeric antigen receptor-T cells, pluripotent stem cells, and adult stem cells (ASCs) [200]. Mesenchymal stromal cells (MSCs) are subtypes of ASCs that can be identified by their surface markers. They reside in a broad variety of tissues, such as the bone marrow, skin, adipose tissue, umbilical cord, Wharton's jelly, endometrium, and placenta. They are multipotent stem cells capable of differentiation into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes [201]. They were shown to display major immunoregulatory activities to control adverse inflammation and infection [202,203]. Their prominent contribution to immunomodulation and tissue homeostasis positions them as attractive regenerative cells.

However, cell-based strategies are facing several hurdles. First, MSCs constitutively express MHC class I molecules at their surface. Their inherent immunogenicity is problematic in the case of allogeneic injections and could trigger inflammation. Harvesting autologous MSCs could easily circumvent this issue, but the long cultivation process precludes their rapid implementation in patients suffering from acute diseases. Moreover, the use of MSCs has shown iatrogenic effects [204]. The injection of MSCs might alter their viability and result in the inoculation of necrotic byproducts, thereby exacerbating tissue inflammation [205]. Upon intravenous injection, transplanted MSCs are prone to senescence and, in some cases, have been reported as tumorigenic [206]. Finally, therapeutic MSCs are often collected from donor banks, posing ethical issues; their long-term culture could also favor the emergence of genetic and epigenetic mutations [207]. Consequently, the many challenges raised by cell-based therapies have incentivized scientists to design alternative solutions, namely, cell-free therapies.

Interestingly, the regenerative properties of MSCs are not primarily linked to their multipotency but rather proceed from their paracrine activity. The MSC secretome comprises

soluble molecules (e.g., cytokines, chemokines, and growth factors) and EVs (e.g., exosomes) [208]. Therefore, MSC-derived EVs are of great clinical relevance, especially as their content is readily manipulable. Indeed, MSC priming refers to the *in vitro* culture of MSCs in a pre-conditioned medium. It dramatically influences the composition of their secretome, allowing for the production of disease-specific exosomes [209]. Accordingly, they may display anti-inflammatory [210], pro-angiogenic [211], anti-apoptotic, or anti-oxidative properties [212]. Cell-free therapies offer many advantages over cell-based therapies: a higher scale of production, a lesser risk of contamination with CMV and HSV, the possibility for long-term storage and easier transportation, and fewer ethical considerations [213]. Notably, MSC-derived EVs are believed to express fewer MHC molecules, which could explain their attenuated immunogenicity.

The biological effects of MSC-sourced EVs have been studied *in vitro* and *in vivo*. They have been primarily ascribed to exosomal miRNA. Their prominence in regulating physiological responses and their therapeutic relevance have recently led Dos Santos et al. to term them an MSC-EV-miRNAome [214]. When transported in MSC-derived exosomes, miRNAs are potent elicitors of biological responses, exerting immunomodulatory responses and anti-apoptotic or anti-proliferative actions. Their action results from their interference with key signaling pathways, thus triggering metabolic changes in the recipient cell. In ischemia-reperfusion injuries, exosomal miRNAs have been shown to attenuate tissue damage in the lungs and heart by inhibiting pro-apoptotic pathways [215,216] and gasdermin D-dependent pyroptosis [217]. In inflammatory diseases, miRNAs have shown immunomodulatory properties by polarizing immune cells, which preferably acquire an immunosuppressive phenotype, such as T regulatory cells, tolerogenic dendritic cells, and M2 macrophages [218]. Interestingly, chronic inflammatory diseases are often associated with the accumulation of fibrotic tissues. Fibrosis refers to a state of excessive extracellular matrix deposition, notably of collagen proteins, which progressively replace functional cells. Fibrosis is often considered to be an irreversible impairment. In the liver, hepatic stellate cells (HSCs) orchestrate collagen deposition and are the main actors in the progression of cirrhosis [219]. Remarkably, MSC-derived exosomal miRNAs could inhibit the Wnt- β -catenin pathway to hinder the proliferation of HSCs and therefore reduce liver fibrosis [220]. Finally, MSC-derived exosomes could be used as favorable substitutes for synthetic skin grafts in wound healing. By mitigating inflammatory pathways and up-regulating pro-angiogenic pathways, they could contribute to proper tissue repair [205]. miRNAs may also diminish the excessive differentiation of myofibroblasts by inhibiting the TGF- β signaling pathway, thus tempering collagen deposition and tissue fibrosis [221]. The potentiality of MSC-EV-derived miRNAs is especially large, encompassing a broad range of diseases; an exhaustive delineation has been published elsewhere [222].

Despite their undeniable advantages, MSC-derived exosomes are far from being implemented as a routine treatment in clinical settings. As of now, current clinical trials have not yielded any commercially available exosome-based drug. This is compelling evidence that many issues remain unresolved. As underlined earlier, the production and isolation of exosomes lack a standardized procedure. Their intrinsic variability is commendable in the advent of personalized medicine, but in practice, it complicates the generation of reproducible batches, an inconvenience that is further accentuated by the coexistence of heterogeneous subpopulations of MSCs [223]. Hopefully, a recent secretome analysis has shown that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) could generate comparable batches, and secretome lyophilisates could remain stable over 6 months [224]. Therefore, the elaboration of an exosome-based drug that complies with the Good Manufacturing Practices posited by the World Health Organization appears achievable. However, many questions about their formulation, their administration route, and optimal therapeutic dose are left unanswered [225]. Additionally, despite their remarkable bioavailability, native exosomes spontaneously accumulate in the liver and spleen, where they are quickly removed from the blood flow by the mononuclear phagocyte system [226]. The artificial modification of exosome tropism could be an opportune solution to enhance their therapeutic efficacy.

Finally, even though MSC priming can predictably influence the cargo composition, it does not allow for fine-tuned adjustments. As a consequence, contamination with undesirable molecules cannot be ruled out and compromises their innocuity.

Regarding their plasticity, biocompatibility, and low immunogenicity, exosomes are auspicious therapeutic tools. However, native exosomes are perfectible from a pharmacological standpoint. Therefore, scientists are attempting to engineer exosomes, designed to control both their composition and their precise targeting to cells and tissues. The ultimate goal would be to contain their pharmacological effect and make exosome-based therapies more amenable to clinical usage.

5.2. Engineered Exosomes for Drug Delivery

In pharmacology, molecular targets with hydrophobic pockets or located extracellularly are considered “druggable”, as they harbor accessible drug interaction sites. However, this statement entails that a significant majority, namely, 85% of targets, are classified as “non-druggable” [227]. This further implies that a large portion of molecular targets lack suitable characteristics for conventional drug development, potentially limiting the scope of drug discovery efforts. Hence, finding alternative drug delivery systems arises as a necessity.

Exosomes are recognized as natural carriers for drugs, holding great promise as drug delivery platforms for the treatment of various diseases, notably cancer. Delivering therapeutics encapsulated in membrane-bound vesicles enhances their bioavailability, circumvents the non-selective activity of drugs, and thereby reduces damage to normal cells. This holds particular relevance in the context of cancer chemotherapies [228]. Moreover, exosome-targeted vectorization enables the reduction of treatment doses, protecting cells from the cytotoxic side effects associated with high doses in diverse diseases. Their ability to cross the blood–brain barrier allows them to transport drugs to intracerebral regions, presenting a potential avenue for treating central nervous system (CNS) disorders [86].

Exploring the drug delivery potential of exosomes begins with the high-yield extraction of high-purity exosomes. Traditional methods often fall behind, but microfluidic-based techniques (e.g., immune-affinity-based micro-devices) provide a comprehensive solution by integrating multiple steps into a single device [229]. This approach enables the efficient extraction, analysis, and quantification of exosomes from limited clinical samples with high throughput and sensitivity. Integrating these advanced methods is crucial for achieving the fundamental isolation of high-purity, high-yield exosomes, a key step in developing effective engineered exosomes.

The choice of loading method is primarily guided by the nature of the molecule. Passive loading involves the coincubation of small lipophilic molecules (e.g., natural active principles such as curcumin and specific anticancer drugs) with exosomes or the exosome-producing cells [230]. When incubated with cells, the drug diffuses through the cell membrane and then interacts with the exosome biogenesis pathway, leading to its encapsulation within exosomes [231]. However, this method only applies to lipophilic molecules, capable of interacting with cell membranes and exosomes. Thus, loading large and hydrophilic proteins is considered challenging. To overcome this limitation, active loading methods are employed, which offer a more controlled and targeted approach. Techniques such as sonication, freeze-and-thaw cycles, and the application of saponin, a detergent that removes cholesterol from membranes, are commonly used. These methods permeabilize the membranes of cells and exosomes, enhancing the diffusion of specific molecules and ensuring a high loading efficiency of exosomal carriers [232]. Additionally, electroporation and transfection can be employed to load purified exosomes with proteins and nucleic acids, particularly miRNA and siRNA, often used for targeting cancer cells [233]. The incorporation of mRNA in this manner has raised the prospect of utilizing exosomes as vectors for messenger RNA vaccines. Furthermore, active methods encompass the use of genetically modified cells, which are considered an effective approach for loading drugs into exosomes.

By applying one of the methods mentioned above, several studies have demonstrated the ability of exosomes to transport drugs and treat specific diseases. Exosomes derived from macrophages transfected with a plasmid DNA encoding therapeutic proteins, such as catalase or glial cell-derived neurotrophic factor, have been used for the treatment of neurodegenerative disorders [234,235]. In another study, a co-delivery system was employed through exosome electroporation, relying on engineered exosomes carrying a chemotherapeutic drug (5-FU) and a miR-21 inhibitor oligonucleotide (miR-21i). It is noteworthy that miR-21 is widely recognized for its high expression in colorectal cancer cells. This approach demonstrated a significant improvement in the cellular uptake of exosomes and a significant reduction in miR-21 expression within 5-FU-resistant colorectal cancer cells. The systemic administration of exosomes loaded with both 5-FU and miR-21i led to a decrease in tumor growth in mice. In addition, this delivery approach reversed drug resistance against 5-FU and decreased the drug-induced cytotoxicity [236]. Another study mentions the use of exosomes derived from modified DCs that were loaded with the chemotherapeutic drug doxorubicin, through electroporation. Upon intravenous administration in tumor-affected mice, these engineered exosomes selectively delivered doxorubicin to tumor tissues, effectively inhibiting tumor growth without causing adverse effects to normal cells [233]. Finally, the therapeutic potential of exosomes modified to deliver natural substances with antioxidant and anti-inflammatory properties was examined. Thus, exosomes obtained from curcumin-treated macrophages displayed the capacity to suppress inflammation by activating the Nrf2/ARE pathway. Additionally, they enhanced the expression of molecules related to wound healing, stimulated angiogenesis, and accelerated the healing process in diabetic rats [231]. Moreover, curcumin-loaded exosomes derived from embryonic stem cells (MESC-exo^{cur}) were generated through the simple incubation of exosomes and curcumin. MESC-exo^{cur} demonstrated the capacity to reduce inflammation and mitigate the expression of vascular ICAM and endothelial junction proteins. These exosomes have exhibited therapeutic potential in promoting neurovascular restoration following ischemia-reperfusion injuries in mice [230]. The promising outcomes of these studies not only underscore the versatility of EVs as drug carriers but also provide optimistic prospects for their therapeutic applications in diverse medical contexts.

Despite these positive aspects of using exosomes as drug vectors, their clinical application remains challenging. Difficulties in isolating and purifying exosomes pose significant hurdles. Moreover, the low efficiency in loading therapeutic cargoes, attributed to the intrinsic loading of exosomes with numerous proteins and nucleic acids, coupled with their rapid elimination from circulation, further complicates their clinical utility [237]. To address these challenges, consideration may be given to synthetic delivery systems, such as liposomes [238]. A notable advantage is the extended half-life of liposomes compared to exosomes, lasting several hours. However, synthetic drug delivery systems exhibit significantly lower targeting efficacy when compared to their natural counterparts [239]. Furthermore, liposomes primarily deliver drugs through passive accumulation in specific tissues, unless equipped with additional surface ligands [240]. In contrast, exosomes inherently possess targeting capabilities, potentially enabling drug delivery to specific cells [241]. This complexity sparks a debate on the effectiveness of using liposomes as a drug delivery system. In conclusion, while exosomes show promise as drug vectors, their clinical application still encounters significant challenges. These highlighted issues emphasize that the journey toward effective drug delivery systems still requires ongoing research and innovation.

6. Exosomes and Antigen Presentation: Perspectives in Vaccinology

While the therapeutic use of exosomes has become challenging, their unique ability to transport and present antigens to the immune system is of major interest in vaccinology, particularly in the field of virus control. Exosomes can display immunogenic viral antigens, acting as mediators that facilitate the recognition of these antigens by immune cells. The use of exosomes in antigen presentation has shown promise in stimulating robust immune

responses. In addition, their natural origin and ability to interact with immune cells make exosomes attractive candidates for the design of innovative vaccine strategies. Current research focuses on exploiting exosomes as platforms for antigen delivery, exploring ways of modifying them to optimize the presentation of specific antigens and improve vaccine responses. By exploring the complex mechanisms of antigen presentation by exosomes, we are gaining valuable insights that contribute to the advancement of more effective and targeted vaccine approaches.

6.1. Exosomes and Antigen Presentation

A particular feature of exosomes that is receiving increasing attention is their immunomodulatory functions and their involvement in the presentation of antigens to the adaptive immune system (Figure 4). Exosomes derived from mature dendritic cells (DCs) were found to be enriched in MHC class I and II molecules, as well as ICAM-1 and CD86 [242]. Mature DC-derived exosomes are known to carry MHC–peptide complexes at their surface, and, in comparison with immature DC-derived exosomes, conferred mature DCs with a greater potency in priming naive T cells [243]. The presentation of pathogen-derived peptides by exosomes has been demonstrated in the case of bacterial and viral antigens. For example, it has been shown that the interaction of LPS-activated DCs with non-cognate activated T-cells induced changes in DCs morphological characteristics. This led to the release of exosomes carrying MHC class II-peptide, ICAM-1, and a high amount of miR155a. miR155a is a well-established central regulator of T-cell responses, possessing the capacity to activate antigen-specific CD8+ T cells [244]. Another study demonstrated that upon encountering *Escherichia coli*, DCs generated a substantial quantity of EVs, carrying MHC class II molecules and antigens derived from the previously phagocytosed bacteria. The underlying mechanism could be the inward budding of ILVs from the phagosomal membrane, allowing the internalization of bacterial byproducts. This investigation emphasized the potential effectiveness of such exosomes in presenting antigens and triggering an adaptive immune response when specifically packed with pathogen-derived peptides loaded onto MHC molecules [245].

Interestingly, exosomes that carry MHC–peptide complexes or antigens may act as indirect antigen presentation platforms, following internalization by other cells [3]. Indeed, migrating and resident DCs were demonstrated to exchange antigens through exosomes, thereby allowing DCs that were not directly exposed to the antigen to participate in T-cell priming. Such a phenomenon is termed cross-priming [246]. Following EV capture, antigens could either be driven into the endosomal pathway, subsequently degraded, and loaded onto MHC class II molecules; or they could be released into the cytoplasm, subsequently degraded, and loaded onto MHC class I molecules. Greater capacity for antigen presentation and efficient T-cell activation can thus be achieved by transferring antigens to DCs via exosome capture [247].

This ability to participate in the establishment of a specific immune response via EVs may also occur during viral infections. As discussed above, exosomes that are produced by infected cells are frequently loaded with viral factors, which can be displayed outwards, thus enhancing their immunogenicity. Concerning flaviviruses, exosomes originating from ZIKV- and TBEV (tick-borne encephalitis virus)-infected cells were found to display the viral envelope protein at their surface, suggesting their ability to induce an immune response [reviewed in: [248]]. Furthermore, our research has revealed that the non-structural protein-1 (NS1) of both DENV and ZIKV was found at the surface of EVs produced during infection [126]. However, the ability of these vesicles, which abundantly circulate in the body, to stimulate an immune response against the NS1 of these two flaviviruses has not been investigated yet.

Besides DCs and infected cells, various cell types may produce exosomes capable of triggering an immune response. For example, infection with the HTLV-1 retrovirus is accompanied by the detection of exosomes carrying viral proteins in the cerebrospinal fluid, where viral particles are undetected. PBMCs and CD4+CD25+ T cells appear as the

principal producers of such exosomes, which contain the HTLV-1 Tax protein. Remarkably, these exosomes were shown to trigger a HTLV-1-specific immune response, and to induce the infiltration of HTLV-1 Tax-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) into the central nervous system of patients [249].

Antigen-loaded exosomes produced by infected cells could also exert immunostimulatory actions, thereby contributing to the establishment of a proper immune response. A study has shown that the composition of exosomes isolated from COVID-19 patients correlated with the severity of the disease. Their proteomic analysis revealed a correlation between the protein repertoire and the immune response signature. In mild patients, exosomes were shown to carry SARS-CoV-2 Spike glycoprotein-derived peptides, along with MHC class II molecules, CD86, T-cell regulators, and antigen-processing factors. These exosomes exhibited the ability to effectively regulate antigen-specific CD4⁺ T-cell responses and induce IL-2 secretion *in vitro*. Conversely, in severe patients, exosomes were enriched in proinflammatory factors and were associated with unregulated inflammation, thrombus formation, and intravascular coagulation [250]. These results suggest that exosomes could participate in antigen presentation and act as key regulators of adaptive immune responses, thus significantly influencing the disease outcome. The roles of exosomes in eliciting adaptive immune responses are increasingly delineated, paving the way for the development of exosome-based vaccines.

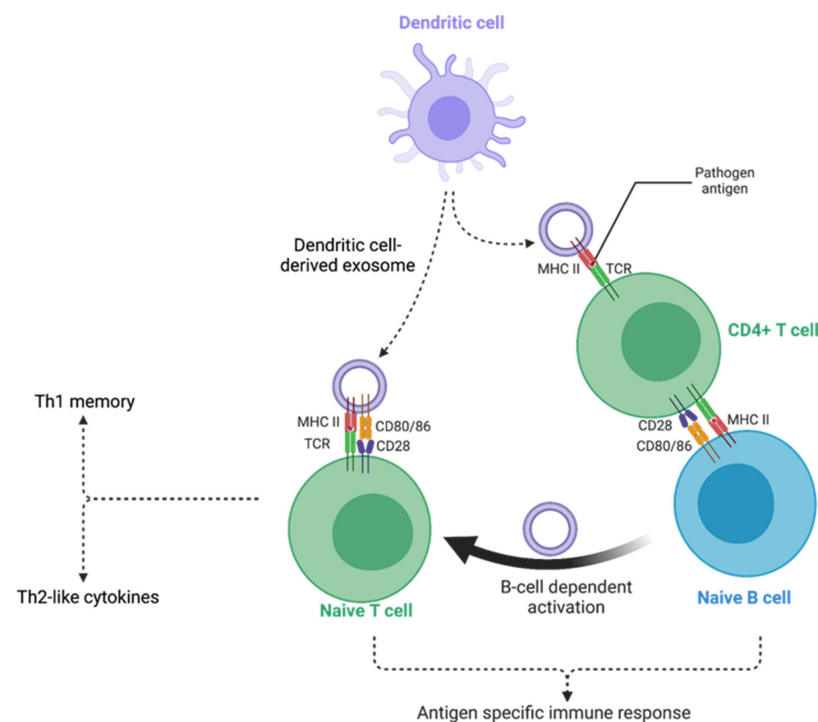


Figure 4. Antigen presentation by exosomes. Having been primed with non-self antigens, dendritic cells may emit exosomes wherein antigens have been enclosed. Upon interaction with naïve dendritic cells, exosomes may deliver the non-self antigens, in a process called cross-priming. Although recipient dendritic cells have never been directly exposed to them, they can now present the exosome-derived antigens to CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells. CD4⁺ T cells will further activate naïve B cells and induce clonal expansion and differentiation. Cellular immunity response will thus be set up, leading to Th1 memory and Th2-like cytokines. A particularity of exosome and antigen presentation is that B-cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells.

6.2. Exosomes in Vaccinology

The inclusion of exosomes in the development of next-generation vaccines seems to be a promising application, particularly in the fight against emerging viral infections [251,252]. Due to their natural ability to convey immunomodulatory mediators, exosomes have

been initially evaluated as potential nano-adjuvants in vaccine formulations. Indeed, to be effective, nano-adjuvants must be widely distributed. This is a clear advantage of exosomes over the various nanomaterials proposed for this role, such as graphene oxide, carbon nanotubes, various polymers, micelles, and liposomes [253]. The proof of concept for the use of exosomes as adjuvants was demonstrated during a trial of new vaccine strategies against HBV. Exosomes isolated from monocytic cells stimulated *in vitro* with lipopolysaccharide (LPS) endotoxin, that exhibited a non-specific immunostimulatory activity by themselves, were added to a vaccine formulation containing the classical HBV recombinant antigen (HBsAg). The subcutaneous administration of this combination to mice strengthened the immune response by increasing IFN- γ secretion [254].

Among the exosome-based vaccinal strategies against viruses, it has also been proposed to exploit the exosomes naturally produced during infection. This was the case for EBV after it was discovered that the infection of B cells induced the production of exosomes with the viral glycoprotein 130 (gp130) exposed at their surface. These exosomes have demonstrated interesting antiviral and vaccine properties against EBV *in vitro*. Exosomes exposing gp130 were shown to interact with CD21, a marker that is consistently expressed by B cells and follicular DCs. Then, the interaction of exosomal gp130 with uninfected B-cells protected them against EBV infection, due to the saturation of CD21 receptors which precluded the adsorption of viral particles. Moreover, it has been hypothesized that the exosomal delivery of gp130 to follicular DCs or uninfected B cells may trigger an effective adaptive response against this antigen, which could be compatible with the genesis of an EBV-specific immunological memory [255].

However, the development of exosome engineering techniques has paved the way for several new vaccine strategies. These are based firstly on the antigen-presenting capacity of exosomes, the content of which can be modified to turn them into tools for stimulating immunity. They also take advantage of the bioavailable nanocarrier characteristics of exosomes to vectorize and deliver nucleic acids, providing alternative solutions to the development of messenger RNA vaccines. For the first approach, exosomes offer several advantages, including a more stable conformation for vectorized antigens, compared with other formulations. Their broad distribution through their ability to circulate in biological fluids, enables exosomes to reach distant targets. Moreover, because of the adhesion molecules present on their surface, they offer the most effective biomimetic platforms to maximize association with antigen-presenting cells.

The engineering of exosomes for vaccine purposes is nonetheless challenging, at least as challenging as the drug delivery design discussed in Section 5.2. In order to make them suitable vaccination platforms, the assembly of targets of interest (DNA, RNA, or proteins) at the surface or within EVs is required. Several methods have been explored to date, each more or less efficient depending on the nature of the target to be incorporated.

6.3. Exploring Strategies for Loading Exosomes with Antigens

As highlighted earlier, exosomes serve as effective antigen-presenting devices, showcasing their capability to stimulate the immune system. Consequently, they are emerging as promising candidates for enhancing vaccine strategies. This section delves into various manufacturing techniques employed to precisely load exosomes, ensuring the production of exosomes carrying the desired antigenic determinants. These exosomes are likely to elicit a robust immune response.

Strategies for directing immune modulators or antigens to exosome membranes have primarily revolved around the concept of “exosome display,” a technique developed nearly two decades ago [256]. The aim is to introduce a transgene into cells, enabling the expression of a chimeric protein addressed to the membrane of ILVs during their biogenesis. The transgene construct results from the fusion of sequences from different origins: one encodes the antigen to be exposed, a second encodes a signal peptide promoting the membrane insertion of the protein, and a third encodes an exosome targeting domain (EDT). The C1C2 domains of lactadherin, known for their ability to direct the secretion of lactadherin-

containing exosomes, are among the most widely used EDTs (illustrated in Figure 5A). Positioned at the C-terminus of the fused sequence, the C1C2 domain directs the entire protein into secreted exosomes and places the N-terminal region outward at the exosome surface. This method has been successfully applied, using the monomeric enhanced green fluorescent protein (EGFP) as the antigen, fused to the C1C2 domain. This approach made it possible to extract exosomes produced by cells transfected *in vitro* with this plasmid construct, demonstrating the display of EGFP at the exosome surface. Most importantly, the intramuscular and intranasal administration of purified exosomes, in combination with a conventional vaccine based on an adenoviral expression vector for the EGFP antigen, significantly amplified the humoral immune response against EGFP in mice [257].

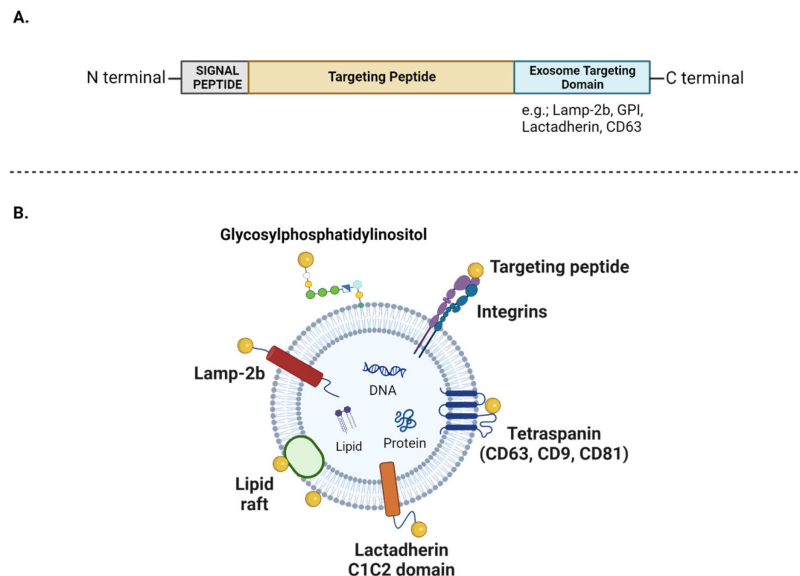


Figure 5. Various strategies of exosome display: Target peptide presentation and surface binding mechanisms. (A). A fusion gene model for targeting recombinant proteins to exosomes. To display proteins at the surface of exosomes, cells undergo transfection with plasmids encoding a chimeric protein. This chimeric protein exhibits a signal peptide present in the N-terminal region, the antigen of interest, and an exosome targeting domain generally positioned in the C-terminal region if the peptide is intended for display at the exosome surface. (B). Schematic diagram showing the presentation of a target peptide via different transmembrane domains of the exosome. Exosomes exhibit the presentation of target peptides on their surface through diverse exosomal transmembrane domains, showcasing the outcome of the exosome display strategy. Moreover, target peptides can bind to the exosome surface either through the cloaking strategy or by associating with the lipid rafts spanning the exosome membrane.

Another approach used for addressing antigens to exosomes involves tetraspanins. As mentioned in Section 2.1, these transmembrane proteins participate in the cargo sorting process that occurs during ILVs formation. Thus, they are considered highly suitable for displaying antigens at the surface of exosomes, either bound to their extravesicular or intravesicular domains [258]. A study employing several types of genetic constructs, consisting of chimeric fusions of the VSV-G gene fused to tetraspanin genes (CD9, CD63, or CD81), confirmed the effectiveness of this exosome manufacturing system. However, the collected exosomes revealed variable physicochemical properties, as well as differences in surface protein profiles and cellular uptake characteristics [259]. Additionally, some other transmembrane proteins like integrins, Prostaglandin F2 Receptor Negative Regulator (PTGFRN), brain abundant membrane attached signal protein-1 (BASP1), and Lysosome-associated membrane protein-2b (LAMP-2B), were shown to be able to bind antigens to the exosomal membrane, making them *de facto* proteins of interest for scaffold platforms of antigen presentation (illustrated in Figure 5B) [260,261]. Numerous studies have reported

the widespread use of LAMP-2B-based engineering for loading proteins of interest onto the surface of exosomes. Beyond its role in antigen exposure, this method has been employed to confirm the targeting capabilities of exosomes, depending on the selected protein for display. Thus, LAMP-2B constructs fused with a rabies viral glycoprotein peptide, known to direct rabies virus neurotropism, effectively enabled the production of exosomes that reached the brain [262]. If a ligand is yet to be identified for a tissue- or cell-specific receptor, protein libraries can be screened or biopanned using high-throughput phage display methods. Upon finding a peptide with adequate affinity for the target receptor, it can be fused to LAMP-2B and expressed on exosomes. Subsequent *in vivo* experiments can be performed to assess whether exosomes display the expected tropism. This strategy has been adopted to specifically target exosomes to hepatic stellate cells, which are relevant targets in liver fibrosis [263].

Numerous adaptations of exosome display, based on the expression of transgenes, have been developed. As previously discussed, specific viral proteins exploit the exosome biogenesis pathway to facilitate virus budding. It has been shown that transmembrane subunits of viral envelope proteins, including those of HIV, can interact with components of the ESCRT machinery, such as TSG101 [264]. These properties, which are found in the proteins of various viruses (e.g., the VSV-G protein or the Nef protein of HIV), have been exploited to direct proteins of interest to exosomes [265]. In order to assess the exosomal addressing capabilities of viral proteins, a vector encoding the CD8 ectodomain, used as a neutral reporter, fused with the cytosolic domain of the transmembrane envelope protein (CDTM-Env) derived from the bovine leukemia virus (BLV) was employed. Cells transfected with this construct successfully produced exosomes expressing the chimeric protein. This finding indicates the potential utilization of specific domains within certain viral proteins for directing antigens into exosomes [266]. Exosome engineering likely needs to be adapted to the specific type of antigen intended for expression. Comparisons of reproducibility and yields across various exosome display systems, depending on the constructs and techniques used to introduce transgenes into cells, should be conducted to identify the optimal technique.

In addition to surface display engineering of exosomes, another strategy termed “cloaking” has been developed to make exosomes presenting scaffolds for proteins of interest. This approach involves the *ex vivo* modification of exosome surfaces to enhance their targeting precision toward recipient cells. The proof of concept was put forth using cardiosphere-derived cells exosomes, cloaked with a phospholipid membrane anchor and streptavidin. The coating with streptavidin molecules enables the binding of any biotinylated molecule at the surface of exosomes, including tissue-specific antibodies and homing peptides. This technology could be beneficial for the development of exosome-based vaccines, as it would allow the precise targeting of antigens to APCs [267].

Furthermore, the lipid bilayer of exosomes holds substantial potential for anchoring lipid conjugates (Figure 5B). It is composed of different lipids like cholesterol, ceramide, and phosphatidylethanolamine derivatives that serve as lipid anchors in regions called lipid rafts, ensuring the attachment of functional entities to the exosome membrane. A recent study demonstrated that the incubation of fluorophore-bound dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE) with EVs leads to its effective anchoring to the EV membrane. This approach could be used to activate the immune response when the fluorochrome is replaced by an antigen of interest, which could subsequently be used as in a vaccine [268]. Furthermore, lipids of the exosomal membrane can be covalent protein-anchoring systems, which is the case for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. Thus, several studies have reported the possibility of efficiently addressing proteins of interest on the surface of exosomes by introducing in cells transgenes that drive the expression of chimeric (GPI)-anchored proteins [269,270].

The collective findings suggest that loading exosomes with tailored antigens through different strategies appears to be a viable approach for the development of vaccines targeting a range of diseases and pathogens, including flaviviruses.

6.4. Ongoing Exosome-Based Vaccine Strategies against Viruses

Thanks to the wide range of available techniques for engineering exosomes into antigen-presenting platforms, exosome-based candidate vaccines against several viruses have been researched and have undergone several phases of validation of their suitability. A trial was conducted with exosomes modified to carry HCV full-length NS3 protein. The modified exosomes proved immunogenic when injected into mice, which was confirmed by the detection of NS3-specific memory CD8⁺ T cells [271]. Anticoli et al. have also demonstrated the efficacy of engineering exosomes with DNA vectors expressing stable fusion products of viral antigens fused to an exosome-anchoring protein. Assayed viral antigens included those of the Ebola virus, influenza virus, Crimean–Congo hemorrhagic fever, and West Nile virus. Upon injection in mice models, these vectors have been shown to elicit a potent antigen-specific CD8⁺ T-cell response, which was further supported by their cytotoxic activity against antigen-expressing cells [272].

More recently, in the face of the global COVID-19 crisis, there has been a flurry of research into innovative vaccination strategies exploiting the exosome approach [273,274]. Two of these strategies are summarized in Figure 6. One strategy, following the popularization of mRNA vaccines, strove to turn exosomes into mRNA vectorization tools. The use of exosomes to vectorize mRNAs for vaccine purposes has been successfully tested and shown to promote an immune response [275]. Thus, for example, Popowski et al. developed a system based on lung-derived exosomes carrying SARS-CoV-2 Spike mRNA. These exosomes have shown extensive distribution in the bronchioles and parenchyma of mice. In addition, they elicited significant immunoglobulin G (IgG) and secretory IgA (SIgA) production, demonstrating the relevance of such an approach for obtaining a good adaptive immune response [276]. Other work showed that bovine-milk-derived exosomes loaded with mRNA encoding the SARS-CoV-2 receptor-binding domain (RBD) stimulated the production of neutralizing antibodies against RBD in mice [277].

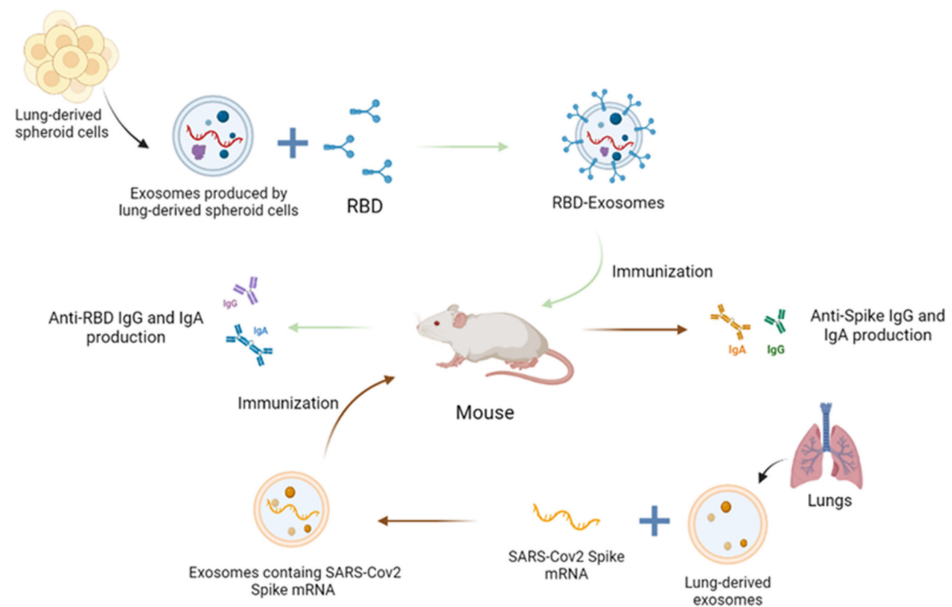


Figure 6. Exosomes modified according to two strategies' have been proposed as candidate vaccines against SARS-CoV-2. They are either designed to carry viral mRNA or engineered to expose a viral antigen, such as the Spike RBD. Both of these candidate vaccines demonstrated protection against SARS-CoV-2 infection in mice.

It is noteworthy that research on exosome-based vaccines against coronaviruses has been ongoing since 2007 [278]. Thus, it was demonstrated that exosomes containing the Spike (S) proteins of SARS-CoV, the transmembrane and cytoplasmic domains of which were replaced with those of the vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G), induced

high levels of neutralizing antibodies [278]. In the context of the COVID-19 pandemic, this strategy of modifying exosomes as antigen-presenting platforms has been relaunched by a growing number of start-ups and private or semi-private biotech companies worldwide, interested in developing extracellular vesicle-based therapies and virus- and adjuvant-free vaccines based on recombinant exosomes [279]. In this respect, an extremely promising vaccine candidate that has passed pre-clinical trials proposes the inhalation delivery of pulmonary exosomes, which carry the recombinant SARS-CoV-2 RBD. The process of this second strategy, related to the use of exosomes as an antigen-presenting device, is described in Figure 6. The engineered and purified exosomes had the advantage of being remarkably stable after lyophilization. They have been shown both to enhance RBD retention in the airways and lung parenchyma, and to induce the production of RBD-specific IgG antibodies in mice. They also enabled a mucosal IgA response and an effective T-cell response that was able to clear the virus in a challenge test [280]. To the best of our knowledge, this promising work has given new momentum to ongoing research by start-ups into exosome-based vaccine strategies against the Chikungunya, Zika, Dengue, and West Nile viruses.

Although vaccines confer the host with durable immunity, pathogens are notorious for evading the immune system through antigenic variation, a challenge that is usually overcome with the use of cocktails and multi-epitope vaccines. In this regard, exosomes could be engineered to present multiple antigens. During the SARS-CoV-2 epidemic, all commercially available vaccines targeted the S glycoprotein, which was consequently subjected to a strong selective pressure. The rapid mutation rate gave rise to numerous variants that could escape the vaccine-induced immunity, notably omicron variants. In contrast, other viral proteins, such as the nucleocapsid (N) protein, are less prone to mutations. In order to broaden immunity against coronaviruses, Cacciottolo et al. have devised a bivalent exosome-based vaccine against delta SARS-CoV-2. Using cell lines that stably expressed both S and N proteins, they produced S- and N-laden exosomes. Upon injection in mice and rabbits, these exosomes elicited a robust T-cell response and significant titers of neutralizing antibodies. Strikingly, these antibodies demonstrated cross-neutralization abilities against omicron variants. Interestingly, exosomes were injected without adjuvants, and low amounts of viral proteins sufficed to produce an efficient response. Finally, the vaccine was regarded as safe and only two shots were required to achieve immunity [274].

The aforementioned strategies exemplify the promising applications of exosomes in the field of vaccinology. However, exosome-based vaccines against viruses are still in their infancy and, so far, they have not produced any widely approved formulations. Further studies must be performed to assess their efficacy and innocuity, but current developments are nonetheless encouraging.

7. Challenges and Issues

Exosomes show promise in advancing medical treatments, such as cell-free therapies, drug nanocarriers, or vaccines, offering targeted and efficient options. However, there are still many difficulties to overcome.

Regarding exosome-based vaccines, a challenge arises in the formulation process, which requires the production of consistent batches of exosomes, each containing the adequate levels of antigen necessary for effective protection [281]. Moreover, a large-scale and efficient source of exosomes, such as high-throughput cellular systems, must be considered and carefully thought-out, to meet the growing demand. This consideration becomes particularly significant in light of the recent SARS-CoV-2 epidemic, emphasizing the urgency for swift and sustained vaccine availability to achieve effective herd immunity. Simultaneously, it is crucial to manage the immunogenicity of exogenous components, namely, those derived from the cell line used to produce exosomes. Another limitation is the heterogeneity of exosomes, which contain a large number of diverse proteins and materials from host cells, making it challenging to customize their cargoes compared to liposomes [282]. While immunogens and adjuvants can be easily packaged in liposomes, incorporating

desired components into exosomes has proven challenging at times [283]. In addition to the advantages afforded by standardized liposomes for the delivery of therapeutics, the “exosome” strategy is being challenged by other strategies for the custom development of delivery systems based, for example, on bacteriophage virus-like particles (VLPs) [284] or other biomimetic platforms [285]. Future research on exosomes for vaccine purposes will have to establish a comparison with these other types of nano-platforms, particularly in preclinical studies. Furthermore, when exosomes are injected into a patient, they may compete with their endogenous counterparts, potentially affecting the desired therapeutic effects [282], or interfering with intercellular communication networks. They may also bind to competitive ligands instead of cell receptors [286]. Exosomes harvested from DCs could hold the best vaccine potential, as they naturally express antigen-presentation molecules. This strategy has already proven its relevance in oncology, with DC exosome-based vaccines that have passed both preclinical and clinical phases, demonstrating good tolerance and safety [287,288]. On the downside, the many clinical trials carried out in recent years with exosome-based cancer immunotherapies have not always produced the expected results, prompting further research into the immune mechanisms controlled by exosomes *in vivo* [289].

Finally, ethical considerations surrounding safety, informed consent, and unpredictable consequences must be addressed. Rigorous testing, transparency in research, and clear patient communication are essential. Balancing innovation with ethical standards is paramount to harness the full potential of exosomes in medicine. The evolution of guidelines to ensure responsible and beneficial applications is strikingly evident.

8. Concluding Remarks

The global health crisis caused by SARS-CoV-2 has reinforced the need to diversify vaccine strategies against viral infections. This, in turn, has renewed interest in exosomes as particularly attractive nanocarriers. We therefore set out to review the literature on the biology of exosomes, which mediate signaling between cells and play a key role in both physiological and pathological processes. We pointed out their considerable relevance as potential biomarkers and diagnostic, and therapeutic tools in contemporary medicine. Their role in viral infections is increasingly studied, and we have pointed out that it is often dual, complicating the prospects for their therapeutic usage. However, significant advances in the engineering of these vesicles for the custom loading of proteins or RNAs confirm that they are interesting nano-vectors of new therapeutic molecules. Likewise, exosomes could benefit from the innovative design of vaccines, unveiling novel strategies for viral infection control. The recent demonstration of their efficacy in preclinical models strengthens their use as original platforms for antigen presentation or mRNA vectorization systems. However, uncertainties remain on several aspects such as the choice of exosome-producing cells, engineering methods, standardized production, the safety of administration, and ethical considerations. Nevertheless, this paves the way for the exploration of new approaches to control flavivirus infections, such as DENV or ZIKV, for which vaccine design has become challenging. The transition to clinical trials will, of course, be necessary to validate these approaches and, hopefully, propel exosome-based therapies from bench to bedside.

Author Contributions: Conceptualization, D.E.S., A.M., M.K., A.L., U.H., G.L., W.V. and P.K.-T.; Methodology, resources, and writing—original draft preparation, D.E.S., A.M., M.K., A.L., U.H., G.L., W.V. and P.K.-T.; Figure drawings, D.E.S., G.L. and M.K.; Writing—review and editing, D.E.S., A.M. and P.K.-T.; Visualization, P.K.-T. and W.V.; Supervision, P.K.-T.; Funding acquisition, W.V. and P.K.-T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: D.E.S. has PhD degree scholarships from Réunion University (Ecole doctorale STS) funded by DIREC/2021-1115 Région Réunion, and M.K. has a PhD degree scholarship from Nantes University (Ecole doctorale BS) funded by the French ministry MEESR. U.H. received financial support from ITMO Cancer of Aviesan on funds administered by Inserm.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing is not applicable.

Acknowledgments: All figures were created using [Biorender.com](https://biorender.com) (accessed on the 1 December 2023).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

ALIX	ALG-2-interacting protein X
APCs	antigen-presenting cells
APOBEC3G	apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G
BMDCs	bone marrow-derived dendritic cells
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
cGAS-STING	cyclic GMP-AMP synthase stimulator of interferon genes
CHIKV	Chikungunya virus
CHMP4	charged multivesicular body protein 4a
circRNAs	circular RNAs
CMV	cytomegalovirus
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DC	dendritic cell
DENV	Dengue virus
DUBs	de-ubiquitylating enzymes
EBV	Epstein–Barr virus
EMT	epithelial–mesenchymal transition
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EV	extracellular vesicles
HBsAg	hepatitis B antigen
HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
HGF	hepatocyte growth factor
HIV	human immunodeficiency virus
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen DR isotype
HNRNPs	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
HNSCC	Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma
HSP70	heat shock protein 70
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IC50	half maximal inhibitory concentration
IFITM3	interferon-induced transmembrane protein 3
IFN α	interferon alpha
IFN γ	interferon gamma
IgG	immunoglobulin G
IL-1 β	interleukin-1 β
ILVs	intraluminal vesicles
IP-10	interferon gamma-induced protein
ISGs	interferon-stimulated genes
JEV	Japanese encephalitis virus
L1	non-LTR retrotransposons LINE-1
LPS	lipopolysaccharides
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MEVs	multi-epitope vaccines
MHC	major histocompatibility complex
MSCs	mesenchymal stromal cells
mo-DCs	monocyte-derived dendritic cells
MVBs	multivesicular bodies
NS1	non-structural protein-1
PRRs	pattern recognition receptors
RANTES	regulated upon activation normal T cell expressed and secreted

RBD	receptor-binding domain
RLRs	RIG-I like receptors
RSV	respiratory syncytial virus
SIgA	secretory IgA
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
STING	stimulator of interferon genes
TAR	trans-activation response element
TBEV	tick-borne encephalitis virus
TGF β	Tumor Growth Factor β
TIM4	T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule 4
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TSG101	tumor susceptibility gene 101
VLPs	virus-like particles
VSV-G	vesicular stomatitis virus glycoprotein
WNV	West Nile virus
ZIKV	Zika virus

References

- Théry, C.; Zitvogel, L.; Amigorena, S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 569–579. [[CrossRef](#)]
- Théry, C.; Duban, L.; Segura, E.; Véron, P.; Lantz, O.; Amigorena, S. Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 1156–1162. [[CrossRef](#)]
- Lindenbergh, M.F.S.; Stoorvogel, W. Antigen Presentation by Extracellular Vesicles from Professional Antigen-Presenting Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2018**, *36*, 435–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Raposo, G.; Nijman, H.W.; Stoorvogel, W.; Liejendekker, R.; Harding, C.V.; Melief, C.J.; Geuze, H.J. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 1161–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Marar, C.; Starich, B.; Wirtz, D. Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression. *Nat. Immunol.* **2021**, *22*, 560–570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Coumans, F.A.W.; Brisson, A.R.; Buzas, E.I.; Dignat-George, F.; Drees, E.E.E.; El-Andaloussi, S.; Emanuelli, C.; Gasecka, A.; Hendrix, A.; Hill, A.F.; et al. Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 1632–1648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fan, S.; Poetsch, A. Proteomic Research of Extracellular Vesicles in Clinical Biofluid. *Proteomes* **2023**, *11*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhu, J.; Wu, F.; Li, C.; Mao, J.; Wang, Y.; Zhou, X.; Xie, H.; Wen, C. Application of Single Extracellular Vesicle Analysis Techniques. *Int. J. Nanomed.* **2023**, *18*, 5365–5376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Witwer, K.W.; Goberdhan, D.C.; O’Driscoll, L.; Théry, C.; Welsh, J.A.; Blenkiron, C.; Buzás, E.I.; Di Vizio, D.; Erdbrügger, U.; Falcón-Pérez, J.M.; et al. Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **2021**, *10*, e12182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bazzan, E.; Tinè, M.; Casara, A.; Biondini, D.; Semenzato, U.; Cocconcelli, E.; Balestro, E.; Damin, M.; Radu, C.M.; Turato, G.; et al. Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles’ Knowledge: From 1946 to Today. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6417. [[CrossRef](#)]
- Hendrix, A.; Lippens, L.; Pinheiro, C.; Théry, C.; Martin-Jaular, L.; Lötval, J.; Lässer, C.; Hill, A.F.; Witwer, K.W. Extracellular vesicle analysis. *Nat. Rev. Methods Primer* **2023**, *3*, 56. [[CrossRef](#)]
- Van Niel, G.; D’Angelo, G.; Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 213–228. [[CrossRef](#)]
- Doyle, L.M.; Wang, M.Z. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* **2019**, *8*, 727. [[CrossRef](#)]
- Kalluri, R.; LeBleu, V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* **2020**, *367*, eaau6977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cappe, B.; Vandenabeele, P.; Riquet, F.B. A guide to the expanding field of extracellular vesicles and their release in regulated cell death programs. *FEBS J.* **2023**; *early view*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Deatherage, B.L.; Cookson, B.T. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: A conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 1948–1957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- De la Torre Gomez, C.; Goreham, R.V.; Serra, J.J.B.; Nann, T.; Kussmann, M. “Exosomics”—A Review of Biophysics, Biology and Biochemistry of Exosomes with a Focus on Human Breast Milk. *Front. Genet.* **2018**, *9*, 92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yokoi, A.; Ochiya, T. Exosomes and extracellular vesicles: Rethinking the essential values in cancer biology. *Semin. Cancer Biol.* **2021**, *74*, 79–91. [[CrossRef](#)]
- Izadpanah, M.; Seddigh, A.; Barough, S.E.; Fazeli, S.A.S.; Ai, J. Potential of Extracellular Vesicles in Neurodegenerative Diseases: Diagnostic and Therapeutic Indications. *J. Mol. Neurosci. MN* **2018**, *66*, 172–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

20. Petroni, D.; Fabbri, C.; Babboni, S.; Menichetti, L.; Basta, G.; Del Turco, S. Extracellular Vesicles and Intercellular Communication: Challenges for In Vivo Molecular Imaging and Tracking. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1639. [[CrossRef](#)]
21. Théry, C. Exosomes: Secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol. Rep.* **2011**, *3*, 15. [[CrossRef](#)]
22. Meldolesi, J. Unconventional Protein Secretion Dependent on Two Extracellular Vesicles: Exosomes and Ectosomes. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 877344. [[CrossRef](#)]
23. van Niel, G.; Carter, D.R.F.; Clayton, A.; Lambert, D.W.; Raposo, G.; Vader, P. Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, *23*, 369–382. [[CrossRef](#)]
24. Mori, T.; Giovannelli, L.; Bilia, A.R.; Margheri, F. Exosomes: Potential Next-Generation Nanocarriers for the Therapy of Inflammatory Diseases. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Krylova, S.V.; Feng, D. The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Gruenberg, J. Life in the lumen: The multivesicular endosome. *Traffic* **2020**, *21*, 76–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Naslavsky, N.; Caplan, S. The enigmatic endosome—Sorting the ins and outs of endocytic trafficking. *J. Cell Sci.* **2018**, *131*, jcs216499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Norris, A.; Grant, B.D. Endosomal microdomains: Formation and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2020**, *65*, 86–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Solinger, J.A.; Spang, A. Sorting of cargo in the tubular endosomal network. *BioEssays* **2022**, *44*, 2200158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Sigismund, S.; Lanzetti, L.; Scita, G.; Di Fiore, P.P. Endocytosis in the context-dependent regulation of individual and collective cell properties. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 625–643. [[CrossRef](#)]
31. Pfitzner, A.-K.; Zivkovic, H.; Bernat-Silvestre, C.; West, M.; Peltier, T.; Humbert, F.; Odorizzi, G.; Roux, A. Vps60 initiates alternative ESCRT-III filaments. *J. Cell Biol.* **2023**, *222*, e202206028. [[CrossRef](#)]
32. Colombo, M.; Raposo, G.; Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, *30*, 255–289. [[CrossRef](#)]
33. Kuchitsu, Y.; Taguchi, T. Lysosomal microautophagy: An emerging dimension in mammalian autophagy. *Trends Cell Biol.* **2023**, S0962892423002386. [[CrossRef](#)]
34. Huotari, J.; Helenius, A. Endosome maturation: Endosome maturation. *EMBO J.* **2011**, *30*, 3481–3500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Carlton, J.G.; Baum, B. Roles of ESCRT-III polymers in cell division across the tree of life. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2023**, *85*, 102274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Schöneberg, J.; Lee, I.-H.; Iwasa, J.H.; Hurley, J.H. Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 5–17. [[CrossRef](#)]
37. Rivera-Cuevas, Y.; Carruthers, V.B. The multifaceted interactions between pathogens and host ESCRT machinery. *PLoS Pathog.* **2023**, *19*, e1011344. [[CrossRef](#)]
38. Jin, X.; Xia, T.; Luo, S.; Zhang, Y.; Xia, Y.; Yin, H. Exosomal lipid PI4P regulates small extracellular vesicle secretion by modulating intraluminal vesicle formation. *J. Extracell. Vesicles* **2023**, *12*, 12319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Crivelli, S.M.; Giovagnoni, C.; Zhu, Z.; Tripathi, P.; Elsherbini, A.; Quadri, Z.; Pu, J.; Zhang, L.; Ferko, B.; Berkes, D.; et al. Function of ceramide transfer protein for biogenesis and sphingolipid composition of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **2022**, *11*, e12233. [[CrossRef](#)]
40. Wei, D.; Zhan, W.; Gao, Y.; Huang, L.; Gong, R.; Wang, W.; Zhang, R.; Wu, Y.; Gao, S.; Kang, T. RAB31 marks and controls an ESCRT-independent exosome pathway. *Cell Res.* **2021**, *31*, 157–177. [[CrossRef](#)]
41. Horbay, R.; Hamraghani, A.; Ermini, L.; Holcik, S.; Beug, S.T.; Yeganeh, B. Role of Ceramides and Lysosomes in Extracellular Vesicle Biogenesis, Cargo Sorting and Release. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 15317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Tancini, B.; Buratta, S.; Delo, F.; Sagini, K.; Chiaradia, E.; Pellegrino, R.M.; Emiliani, C.; Urbanelli, L. Lysosomal Exocytosis: The Extracellular Role of an Intracellular Organelle. *Membranes* **2020**, *10*, 406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dixon, A.C.; Dawson, T.R.; Di Vizio, D.; Weaver, A.M. Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2023**, *24*, 454–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Perez-Hernandez, D.; Gutiérrez-Vázquez, C.; Jorge, I.; López-Martín, S.; Ursa, A.; Sánchez-Madrid, F.; Vázquez, J.; Yáñez-Mó, M. The Intracellular Interactome of Tetraspanin-enriched Microdomains Reveals Their Function as Sorting Machineries toward Exosomes. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 11649–11661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zheng, T.; Xu, S.; Xu, J. A Review of the Roles of Specialized Extracellular Vesicles, Migrasomes, and Exosomes in Normal Cell Physiology and Disease. *Med. Sci. Monit.* **2023**, *29*, e940118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Escola, J.-M.; Kleijmeer, M.J.; Stoorvogel, W.; Griffith, J.M.; Yoshie, O.; Geuze, H.J. Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20121–20127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Suwakulsiri, W.; Xu, R.; Rai, A.; Shafiq, A.; Chen, M.; Greening, D.W.; Simpson, R.J. Comparative proteomic analysis of three major extracellular vesicle classes secreted from human primary and metastatic colorectal cancer cells: Exosomes, microparticles, and shed midbody remnants. *Proteomics* **2023**, 2300057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Mathieu, M.; Névo, N.; Jouve, M.; Valenzuela, J.I.; Maurin, M.; Verweij, F.J.; Palmulli, R.; Lankar, D.; Dingli, F.; Loew, D.; et al. Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4389. [[CrossRef](#)]

49. Wei, H.; Chen, Q.; Lin, L.; Sha, C.; Li, T.; Liu, Y.; Yin, X.; Xu, Y.; Chen, L.; Gao, W.; et al. Regulation of exosome production and cargo sorting. *Int. J. Biol. Sci.* **2021**, *17*, 163–177. [[CrossRef](#)]
50. Maas, S.L.N.; Breakefield, X.O.; Weaver, A.M. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* **2017**, *27*, 172–188. [[CrossRef](#)]
51. Karim, M.A.; Samyn, D.R.; Mattie, S.; Brett, C.L. Distinct features of multivesicular body-lysosome fusion revealed by a new cell-free content-mixing assay. *Traffic Cph. Denver* **2018**, *19*, 138–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Hessvik, N.P.; Llorente, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 193–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Mathieu, M.; Martin-Jaular, L.; Lavieu, G.; Théry, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 9–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Xu, M.; Ji, J.; Jin, D.; Wu, Y.; Wu, T.; Lin, R.; Zhu, S.; Jiang, F.; Ji, Y.; Bao, B.; et al. The biogenesis and secretion of exosomes and multivesicular bodies (MVBs): Intercellular shuttles and implications in human diseases. *Genes Dis.* **2023**, *10*, 1894–1907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kugeratski, F.G.; Hodge, K.; Lilla, S.; McAndrews, K.M.; Zhou, X.; Hwang, R.F.; Zanivan, S.; Kalluri, R. Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker. *Nat. Cell Biol.* **2021**, *23*, 631–641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Andreu, Z.; Yáñez-Mó, M. Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kowal, J.; Arras, G.; Colombo, M.; Jouve, M.; Morath, J.P.; Primdal-Bengtson, B.; Dingli, F.; Loew, D.; Tkach, M.; Théry, C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E968–E977. [[CrossRef](#)]
58. Casari, I.; Howard, J.A.; Robless, E.E.; Falasca, M. Exosomal integrins and their influence on pancreatic cancer progression and metastasis. *Cancer Lett.* **2021**, *507*, 124–134. [[CrossRef](#)]
59. Hoshino, A.; Costa-Silva, B.; Shen, T.-L.; Rodrigues, G.; Hashimoto, A.; Mark, M.T.; Molina, H.; Kohsaka, S.; Di Giannatale, A.; Ceder, S.; et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **2015**, *527*, 329–335. [[CrossRef](#)]
60. Segura, E.; Nicco, C.; Lombard, B.; Véron, P.; Raposo, G.; Batteux, F.; Amigorena, S.; Théry, C. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* **2005**, *106*, 216–223. [[CrossRef](#)]
61. Braun, J.E.A. Extracellular chaperone networks and the export of J-domain proteins. *J. Biol. Chem.* **2023**, *299*, 102840. [[CrossRef](#)]
62. Linder, M.; von Strandmann, E.P. The Role of Extracellular HSP70 in the Function of Tumor-Associated Immune Cells. *Cancers* **2021**, *13*, 4721. [[CrossRef](#)]
63. Kreimer, S.; Belov, A.M.; Ghiran, I.; Murthy, S.K.; Frank, D.A.; Ivanov, A.R. Mass-Spectrometry-Based Molecular Characterization of Extracellular Vesicles: Lipidomics and Proteomics. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 2367–2384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Gurung, S.; Perocheau, D.; Touramanidou, L.; Baruteau, J. The exosome journey: From biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun. Signal.* **2021**, *19*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Simpson, R.J.; Jensen, S.S.; Lim, J.W.E. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *Proteomics* **2008**, *8*, 4083–4099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Zaborowski, M.P.; Balaj, L.; Breakefield, X.O.; Lai, C.P. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience* **2015**, *65*, 783–797. [[CrossRef](#)]
67. Jeppesen, D.K.; Fenix, A.M.; Franklin, J.L.; Higginbotham, J.N.; Zhang, Q.; Zimmerman, L.J.; Liebler, D.C.; Ping, J.; Liu, Q.; Evans, R.; et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell* **2019**, *177*, 428–445.e18. [[CrossRef](#)]
68. Qu, Y.; Franchi, L.; Nunez, G.; Dubyak, G.R. Nonclassical IL-1 β Secretion Stimulated by P2X7 Receptors Is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 1913–1925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Liao, Y.; Chen, X.; Miller-Little, W.; Wang, H.; Willard, B.; Bulek, K.; Zhao, J.; Li, X. The Ras GTPase -activating-like protein IQGAP1 bridges Gasdermin D to the ESCRT system to promote IL-1 β release via exosomes. *EMBO J.* **2023**, *42*, e110780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Weber, B.; Sturm, R.; Henrich, D.; Lupu, L.; Rottluff, K.; Marzi, I.; Leppik, L. Diagnostic and Prognostic Potential of Exosomal Cytokines IL-6 and IL-10 in Polytrauma Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 11830. [[CrossRef](#)]
71. Bebelman, M.P.; Bun, P.; Huveneers, S.; van Niel, G.; Pegtel, D.M.; Verweij, F.J. Real-time imaging of multivesicular body-plasma membrane fusion to quantify exosome release from single cells. *Nat. Protoc.* **2020**, *15*, 102–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Skotland, T.; Sandvig, K.; Llorente, A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog. Lipid Res.* **2017**, *66*, 30–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Piper, R.C.; Katzmann, D.J. Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2007**, *23*, 519–547. [[CrossRef](#)]
74. O'Brien, K.; Breyne, K.; Ughetto, S.; Laurent, L.C.; Breakefield, X.O. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 585–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Geis-Asteggiante, L.; Belew, A.T.; Clements, V.K.; Edwards, N.J.; Ostrand-Rosenberg, S.; El-Sayed, N.M.; Fenselau, C. Differential Content of Proteins, mRNAs, and miRNAs Suggests that MDSC and Their Exosomes May Mediate Distinct Immune Suppressive Functions. *J. Proteome Res.* **2018**, *17*, 486–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

76. Corrado, C.; Barreca, M.M.; Zichittella, C.; Alessandro, R.; Conigliaro, A. Molecular Mediators of RNA Loading into Extracellular Vesicles. *Cells* **2021**, *10*, 3355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Croft, P.K.-D.; Sharma, S.; Sobrevia, L.; Salomon, C. Extracellular vesicle interactions with the external and internal exposome in mediating carcinogenesis. *Mol. Asp. Med.* **2022**, *87*, 101039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Omrani, M.; Beyrampour-Basmenj, H.; Jahanban-Esfahlan, R.; Talebi, M.; Raeisi, M.; Serej, Z.A.; Akbar-Gharalari, N.; Khodakarimi, S.; Wu, J.; Ebrahimi-Kalan, A. Global trend in exosome isolation and application: An update concept in management of diseases. *Mol. Cell. Biochem.* **2023**. [[CrossRef](#)]
79. Heydari, R.; Koohi, F.; Rasouli, M.; Rezaei, K.; Abbasgholinejad, E.; Bekeschus, S.; Doroudian, M. Exosomes as Rheumatoid Arthritis Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Agents. *Vaccines* **2023**, *11*, 687. [[CrossRef](#)]
80. Tavasolian, F.; Moghaddam, A.S.; Rohani, F.; Abdollahi, E.; Janzamin, E.; Momtazi-Borojeni, A.A.; Moallem, S.A.; Jamialahmadi, T.; Sahebkar, A. Exosomes: Effectual players in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* **2020**, *19*, 102511. [[CrossRef](#)]
81. Silva, J.; Garcia, V.; Zaballos, Á.; Provencio, M.; Lombardia, L.; Almonacid, L.; Garcia, J.M.; Dominguez, G.; Pena, C.; Diaz, R.; et al. Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur. Respir. J.* **2011**, *37*, 617–623. [[CrossRef](#)]
82. Yáñez-Mó, M.; Siljander, P.R.-M.; Andreu, Z.; Bedina Zavec, A.; Borràs, F.E.; Buzas, E.I.; Buzas, K.; Casal, E.; Cappello, F.; Carvalho, J.; et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. Vesicles* **2015**, *4*, 27066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Takahashi, Y.; Nishikawa, M.; Shinotsuka, H.; Matsui, Y.; Ohara, S.; Imai, T.; Takakura, Y. Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *J. Biotechnol.* **2013**, *165*, 77–84. [[CrossRef](#)]
84. Ramos-Zaldívar, H.M.; Polakovicova, I.; Salas-Huenuleo, E.; Corvalán, A.H.; Kogan, M.J.; Yefi, C.P.; Andia, M.E. Extracellular vesicles through the blood–brain barrier: A review. *Fluids Barriers CNS* **2022**, *19*, 60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. García-Romero, N.; Carrión-Navarro, J.; Esteban-Rubio, S.; Lázaro-Ibáñez, E.; Peris-Celda, M.; Alonso, M.M.; Guzmán-De-Villoria, J.; Fernández-Carballal, C.; de Mendivil, A.O.; García-Duque, S.; et al. DNA sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in peripheral blood of patients. *Oncotarget* **2017**, *8*, 1416–1428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Abdelsalam, M.; Ahmed, M.; Osaid, Z.; Hamoudi, R.; Harati, R. Insights into Exosome Transport through the Blood–Brain Barrier and the Potential Therapeutical Applications in Brain Diseases. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Andreola, G.; Rivoltini, L.; Castelli, C.; Huber, V.; Perego, P.; Deho, P.; Squarcina, P.; Accornero, P.; Lozupone, F.; Lugini, L.; et al. Induction of Lymphocyte Apoptosis by Tumor Cell Secretion of FasL-bearing Microvesicles. *J. Exp. Med.* **2002**, *195*, 1303–1316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Somiya, M.; Kuroda, S. Reporter gene assay for membrane fusion of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **2021**, *10*, e12171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Yu, J.; Sane, S.; Kim, J.-E.; Yun, S.; Kim, H.-J.; Jo, K.B.; Wright, J.P.; Khoshdoozmasouleh, N.; Lee, K.; Oh, H.T.; et al. Biogenesis and delivery of extracellular vesicles: Harnessing the power of EVs for diagnostics and therapeutics. *Front. Mol. Biosci.* **2024**, *10*, 1330400. [[CrossRef](#)]
90. Valadi, H.; Ekström, K.; Bossios, A.; Sjöstrand, M.; Lee, J.J.; Lötvall, J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 654–659. [[CrossRef](#)]
91. Levy, D.; Do, M.A.; Zhang, J.; Brown, A.; Lu, B. Orchestrating Extracellular Vesicle with Dual Reporters for Imaging and Capturing in Mammalian Cell Culture. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 680580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Mulcahy, L.A.; Pink, R.C.; Carter, D.R.F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* **2014**, *3*, 24641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Ginini, L.; Billan, S.; Fridman, E.; Gil, Z. Insight into Extracellular Vesicle–Cell Communication: From Cell Recognition to Intracellular Fate. *Cells* **2022**, *11*, 1375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Gonda, A.; Kabagwira, J.; Senthil, G.N.; Wall, N.R. Internalization of Exosomes through Receptor-Mediated Endocytosis. *Mol. Cancer Res.* **2019**, *17*, 337–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Miyanishi, M.; Tada, K.; Koike, M.; Uchiyama, Y.; Kitamura, T.; Nagata, S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* **2007**, *450*, 435–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Sims, B.; Farrow, A.L.; Williams, S.D.; Bansal, A.; Krendelchtchikov, A.; Gu, L.; Matthews, Q.L. Role of TIM-4 in exosome-dependent entry of HIV-1 into human immune cells. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 4823–4833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Christianson, H.C.; Svensson, K.J.; van Kuppevelt, T.H.; Li, J.-P.; Belting, M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 17380–17385. [[CrossRef](#)]
98. Ochieng, J.; Nangami, G.; Sakwe, A.; Rana, T.; Ingram, S.; Goodwin, J.S.; Moye, C.; Lammers, P.; Adunyah, S.E. Extracellular histones are the ligands for the uptake of exosomes and hydroxyapatite-nanoparticles by tumor cells via syndecan-4. *FEBS Lett.* **2018**, *592*, 3274–3285. [[CrossRef](#)]
99. Bonsergent, E.; Grisard, E.; Buchrieser, J.; Schwartz, O.; Théry, C.; Lavieau, G. Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1864. [[CrossRef](#)]
100. Sheta, M.; Taha, E.A.; Lu, Y.; Eguchi, T. Extracellular Vesicles: New Classification and Tumor Immunosuppression. *Biology* **2023**, *12*, 110. [[CrossRef](#)]

101. De Lope, L.R.; Sánchez-Herrero, E.; Serna-Blasco, R.; Provencio, M.; Romero, A. Cancer as an infective disease: The role of EVs in tumorigenesis. *Mol. Oncol.* **2023**, *17*, 390–406. [[CrossRef](#)]
102. Wandrey, M.; Jablonska, J.; Stauber, R.H.; Gül, D. Exosomes in Cancer Progression and Therapy Resistance: Molecular Insights and Therapeutic Opportunities. *Life* **2023**, *13*, 2033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Zomer, A.; Maynard, C.; Verweij, F.J.; Kamermans, A.; Schäfer, R.; Beerling, E.; Schiffelers, R.M.; de Wit, E.; Berenguer, J.; Ellenbroek, S.I.J.; et al. In Vivo Imaging Reveals Extracellular Vesicle-Mediated Phenocopying of Metastatic Behavior. *Cell* **2015**, *161*, 1046–1057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Costa-Silva, B.; Aiello, N.M.; Ocean, A.J.; Singh, S.; Zhang, H.; Thakur, B.K.; Becker, A.; Hoshino, A.; Mark, M.T.; Molina, H.; et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 816–826. [[CrossRef](#)]
105. Peinado, H.; Alečković, M.; Lavotshkin, S.; Matei, I.; Costa-Silva, B.; Moreno-Bueno, G.; Hergueta-Redondo, M.; Williams, C.; García-Santos, G.; Ghajar, C.M.; et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 883–891. [[CrossRef](#)]
106. Lima, L.G.; Ham, S.; Shin, H.; Chai, E.P.Z.; Lek, E.S.H.; Lobb, R.J.; Müller, A.F.; Mathivanan, S.; Yeo, B.; Choi, Y.; et al. Tumor microenvironmental cytokines bound to cancer exosomes determine uptake by cytokine receptor-expressing cells and biodistribution. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3543. [[CrossRef](#)]
107. You, X.; Wang, Y.; Meng, J.; Han, S.; Liu, L.; Sun, Y.; Zhang, J.; Sun, S.; Li, X.; Sun, W.; et al. Exosomal miR-663b exposed to TGF- β 1 promotes cervical cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition by targeting MGAT3. *Oncol. Rep.* **2021**, *45*, 12. [[CrossRef](#)]
108. Vignard, V.; Labbé, M.; Marec, N.; André-Grégoire, G.; Jouand, N.; Fonteneau, J.-F.; Labarrière, N.; Fradin, D. MicroRNAs in Tumor Exosomes Drive Immune Escape in Melanoma. *Cancer Immunol. Res.* **2020**, *8*, 255–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Milman, N.; Ginini, L.; Gil, Z. Exosomes and their role in tumorigenesis and anticancer drug resistance. *Drug Resist. Updat.* **2019**, *45*, 1–12. [[CrossRef](#)]
110. Patel, G.K.; Khan, M.A.; Bhardwaj, A.; Srivastava, S.K.; Zubair, H.; Patton, M.C.; Singh, S.; Khushman, M.; Singh, A.P. Exosomes confer chemoresistance to pancreatic cancer cells by promoting ROS detoxification and miR-155-mediated suppression of key gemcitabine-metabolising enzyme, DCK. *Br. J. Cancer* **2017**, *116*, 609–619. [[CrossRef](#)]
111. Kooijmans, S.A.A.; Schiffelers, R.M.; Zarovni, N.; Vago, R. Modulation of tissue tropism and biological activity of exosomes and other extracellular vesicles: New nanotools for cancer treatment. *Pharmacol. Res.* **2016**, *111*, 487–500. [[CrossRef](#)]
112. Qian, K.; Fu, W.; Li, T.; Zhao, J.; Lei, C.; Hu, S. The roles of small extracellular vesicles in cancer and immune regulation and translational potential in cancer therapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**, *41*, 286. [[CrossRef](#)]
113. Teixeira, A.F.; Wang, Y.; Iaria, J.; Dijke, P.T.; Zhu, H.-J. Simultaneously targeting extracellular vesicle trafficking and TGF- β receptor kinase activity blocks signaling hyperactivation and metastasis. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8*, 456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Briolay, T.; Petithomme, T.; Fouet, M.; Nguyen-Pham, N.; Blanquart, C.; Boisgerault, N. Delivery of cancer therapies by synthetic and bio-inspired nanovectors. *Mol. Cancer* **2021**, *20*, 55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Pritchard, A.; Tousif, S.; Wang, Y.; Hough, K.; Khan, S.; Strenkowski, J.; Chacko, B.K.; Darley-USmar, V.M.; Deshane, J.S. Lung Tumor Cell-Derived Exosomes Promote M2 Macrophage Polarization. *Cells* **2020**, *9*, 1303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Zhang, Z.; Shang, J.; Yang, Q.; Dai, Z.; Liang, Y.; Lai, C.; Feng, T.; Zhong, D.; Zou, H.; Sun, L.; et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells ameliorate hepatic fibrosis by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway and remodeling choline metabolism. *J. Nanobiotechnol.* **2023**, *21*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Jiang, J.; Li, J.; Zhou, X.; Zhao, X.; Huang, B.; Qin, Y. Exosomes Regulate the Epithelial–Mesenchymal Transition in Cancer. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 864980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Yao, Y.; Chen, R.; Wang, G.; Zhang, Y.; Liu, F. Exosomes derived from mesenchymal stem cells reverse EMT via TGF- β 1/Smad pathway and promote repair of damaged endometrium. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10*, 225. [[CrossRef](#)]
119. Lang, Z.; Li, Y.; Lin, L.; Li, X.; Tao, Q.; Hu, Y.; Bao, M.; Zheng, L.; Yu, Z.; Zheng, J. Hepatocyte-derived exosomal miR-146a-5p inhibits hepatic stellate cell EMT process: A crosstalk between hepatocytes and hepatic stellate cells. *Cell Death Discov.* **2023**, *9*, 304. [[CrossRef](#)]
120. Chahar, H.S.; Corsello, T.; Kudlicki, A.S.; Komaravelli, N.; Casola, A. Respiratory Syncytial Virus Infection Changes Cargo Composition of Exosome Released from Airway Epithelial Cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 387. [[CrossRef](#)]
121. Peng, Y.; Yang, Y.; Li, Y.; Shi, T.; Luan, Y.; Yin, C. Exosome and virus infection. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1154217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Li, Z.; Mu, S.; Tian, Y.; Shi, J.; Lan, Y.; Guan, J.; Zhao, K.; Gao, F.; He, W. Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus Co-opts Multivesicular-Derived Exosomes for Transmission. *mBio* **2023**, *14*, e03054-22. [[CrossRef](#)]
123. Sato, Y.; Yaguchi, M.; Okuno, Y.; Ishimaru, H.; Sagou, K.; Ozaki, S.; Suzuki, T.; Inagaki, T.; Umeda, M.; Watanabe, T.; et al. Epstein–Barr virus tegument protein BGLF2 in exosomes released from virus-producing cells facilitates de novo infection. *Cell Commun. Signal.* **2022**, *20*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Zhou, C.; Tan, L.; Sun, Y.; Qiu, X.; Meng, C.; Liao, Y.; Song, C.; Liu, W.; Nair, V.; Ding, C. Exosomes Carry microRNAs into Neighboring Cells to Promote Diffusive Infection of Newcastle Disease Virus. *Viruses* **2019**, *11*, 527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

125. Kopcho, S.; McDew-White, M.; Naushad, W.; Mohan, M.; Okeoma, C.M. SIV Infection Regulates Compartmentalization of Circulating Blood Plasma miRNAs within Extracellular Vesicles (EVs) and Extracellular Condensates (ECs) and Decreases EV-Associated miRNA-128. *Viruses* **2023**, *15*, 622. [[CrossRef](#)]
126. Safadi, D.; Lebeau, G.; Lagrave, A.; Mélade, J.; Grondin, L.; Rosanaly, S.; Begue, F.; Hoareau, M.; Veeren, B.; Roche, M.; et al. Extracellular Vesicles Are Conveyors of the NS1 Toxin during Dengue Virus and Zika Virus Infection. *Viruses* **2023**, *15*, 364. [[CrossRef](#)]
127. Ju, Y.; Bai, H.; Ren, L.; Zhang, L. The Role of Exosome and the ESCRT Pathway on Enveloped Virus Infection. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9060. [[CrossRef](#)]
128. Martin, C.; Ligat, G.; Malnou, C.E. The Yin and the Yang of extracellular vesicles during viral infections. *Biomed. J.* **2023**, 100659. [[CrossRef](#)]
129. Thepparit, C.; Khongwichit, S.; Ketsuwan, K.; Libsittikul, S.; Auewarakul, P.; Smith, D.R. Dengue virus requires apoptosis linked gene-2-interacting protein X (ALIX) for viral propagation. *Virus Res.* **2019**, *261*, 65–71. [[CrossRef](#)]
130. Tran, P.-T.-H.; Chiramel, A.I.; Johansson, M.; Melik, W. Roles of ESCRT Proteins ALIX and CHMP4A and Their Interplay with Interferon-Stimulated Gene 15 during Tick-Borne Flavivirus Infection. *J. Virol.* **2022**, *96*, e01624-21. [[CrossRef](#)]
131. Carpp, L.N.; Galler, R.; Bonaldo, M.C. Interaction between the yellow fever virus nonstructural protein NS3 and the host protein Alix contributes to the release of infectious particles. *Microbes Infect.* **2011**, *13*, 85–95. [[CrossRef](#)]
132. Wu, Q.; Glitscher, M.; Tonnemacher, S.; Schollmeier, A.; Raupach, J.; Zahn, T.; Eberle, R.; Krijnse-Locker, J.; Basic, M.; Hildt, E. Presence of Intact Hepatitis B Virions in Exosomes. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2023**, *15*, 237–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Raab-Traub, N.; Dittmer, D.P. Viral effects on the content and function of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 559–572. [[CrossRef](#)]
134. Rey-Cadilhac, F.; Rachenne, F.; Missé, D.; Pompon, J. Viral Components Trafficking with(in) Extracellular Vesicles. *Viruses* **2023**, *15*, 2333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Gould, S.J.; Booth, A.M.; Hildreth, J.E.K. The Trojan exosome hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10592–10597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Nour, A.M.; Li, Y.; Wolenski, J.; Modis, Y. Viral Membrane Fusion and Nucleocapsid Delivery into the Cytoplasm are Distinct Events in Some Flaviviruses. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Longatti, A.; Boyd, B.; Chisari, F.V. Virion-Independent Transfer of Replication-Competent Hepatitis C Virus RNA between Permissive Cells. *J. Virol.* **2015**, *89*, 2956–2961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Ramakrishnaiah, V.; Thumann, C.; Fofana, I.; Habersetzer, F.; Pan, Q.; de Ruiter, P.E.; Willemsen, R.; Demmers, J.A.A.; Raj, V.S.; Jenster, G.; et al. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 13109–13113. [[CrossRef](#)]
139. Latanova, A.; Karpov, V.; Starodubova, E. Extracellular Vesicles in Flaviviridae Pathogenesis: Their Roles in Viral Transmission, Immune Evasion, and Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 2144. [[CrossRef](#)]
140. Le, B.C.T.; Burassakarn, A.; Tongchai, P.; Ekalaksananan, T.; Aromseree, S.; Phanthanawiboon, S.; Polsan, Y.; Alexander, N.; Overgaard, H.J.; Pientong, C. Characterization and Involvement of Exosomes Originating from Chikungunya Virus-Infected Epithelial Cells in the Transmission of Infectious Viral Elements. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12117. [[CrossRef](#)]
141. Cortes-Galvez, D.; Dangerfield, J.A.; Metzner, C. Extracellular Vesicles and Their Membranes: Exosomes vs. Virus-Related Particles. *Membranes* **2023**, *13*, 397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Narayanan, A.; Iordanskiy, S.; Das, R.; Van Duyne, R.; Santos, S.; Jaworski, E.; Guendel, I.; Sampey, G.; Dalby, E.; Iglesias-Ussel, M.; et al. Exosomes Derived from HIV-1-infected Cells Contain Trans-activation Response Element RNA. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 20014–20033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Chen, L.; Feng, Z.; Yue, H.; Bazdar, D.; Mbonye, U.; Zender, C.; Harding, C.V.; Bruggeman, L.; Karn, J.; Sieg, S.F.; et al. Exosomes derived from HIV-1-infected cells promote growth and progression of cancer via HIV TAR RNA. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4585. [[CrossRef](#)]
144. Fan, C.; Tang, Y.; Wang, J.; Xiong, F.; Guo, C.; Wang, Y.; Xiang, B.; Zhou, M.; Li, X.; Wu, X.; et al. The emerging role of Epstein-Barr virus encoded microRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *J. Cancer* **2018**, *9*, 2852–2864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Mukherjee, S.; Akbar, I.; Kumari, B.; Vrati, S.; Basu, A.; Banerjee, A. Japanese Encephalitis Virus-induced *let-7a/b* interacted with the NOTCH-TLR 7 pathway in microglia and facilitated neuronal death via caspase activation. *J. Neurochem.* **2019**, *149*, 518–534. [[CrossRef](#)]
146. Barberis, E.; Vanella, V.V.; Falasca, M.; Caneapero, V.; Cappellano, G.; Raineri, D.; Ghirimoldi, M.; De Giorgis, V.; Puricelli, C.; Vaschetto, R.; et al. Circulating Exosomes Are Strongly Involved in SARS-CoV-2 Infection. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 632290. [[CrossRef](#)]
147. Fang, Y.; Wu, N.; Gan, X.; Yan, W.; Morrell, J.C.; Gould, S.J. Higher-Order Oligomerization Targets Plasma Membrane Proteins and HIV Gag to Exosomes. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e158. [[CrossRef](#)]
148. Campbell, T.D.; Khan, M.; Huang, M.-B.; Bond, V.C.; Powell, M.D. HIV-1 Nef protein is secreted into vesicles that can fuse with target cells and virions. *Ethn. Dis.* **2008**, *18* (Suppl. S2), S2-14-9.
149. Lenassi, M.; Cagney, G.; Liao, M.; Vaupotic, T.; Bartholomeeusen, K.; Cheng, Y.; Krogan, N.J.; Plemenitas, A.; Peterlin, B.M. HIV Nef is Secreted in Exosomes and Triggers Apoptosis in Bystander CD4⁺ T Cells. *Traffic* **2010**, *11*, 110–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

150. Aqil, M.; Naqvi, A.R.; Bano, A.S.; Jameel, S. The HIV-1 Nef Protein Binds Argonaute-2 and Functions as a Viral Suppressor of RNA Interference. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74472. [[CrossRef](#)]
151. Plazolles, N.; Humbert, J.-M.; Vachot, L.; Verrier, B.; Hocke, C.; Halary, F. Pivotal Advance: The promotion of soluble DC-SIGN release by inflammatory signals and its enhancement of cytomegalovirus-mediated *cis*-infection of myeloid dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **2010**, *89*, 329–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Mishra, R.; Lata, S.; Ali, A.; Banerjee, A.C. Dengue haemorrhagic fever: A job done via exosomes? *Emerg. Microbes Infect.* **2019**, *8*, 1626–1635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Clayton, A.; Harris, C.L.; Court, J.; Mason, M.D.; Morgan, B.P. Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. *Eur. J. Immunol.* **2003**, *33*, 522–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Karasu, E.; Eisenhardt, S.U.; Harant, J.; Huber-Lang, M. Extracellular Vesicles: Packages Sent with Complement. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 721. [[CrossRef](#)]
155. Hussain, W.A.; Jahangir, S.; Ghosh, B.; Yesmin, F.; Anis, A.; Satil, S.N.; Anwar, F.; Rashid, M.H. Exosomes for Regulation of Immune Responses and Immunotherapy. *J. Nanotheranostics* **2022**, *3*, 55–85. [[CrossRef](#)]
156. Kulkarni, R.; Prasad, A. Exosomes Derived from HIV-1 Infected DCs Mediate Viral trans-Infection via Fibronectin and Galectin-3. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Klibi, J.; Niki, T.; Adhikary, D.; Mautner, J.; Busson, P.; Riedel, A.; Pioche-Durieu, C.; Souquere, S.; Rubinstein, E.; Le Moulec, S.; et al. Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood* **2009**, *113*, 1957–1966. [[CrossRef](#)]
158. Zhang, C.; Huang, D.-J.; Baloche, V.; Zhang, L.; Xu, J.-X.; Li, B.-W.; Zhao, X.-R.; He, J.; Mai, H.-Q.; Chen, Q.-Y.; et al. Galectin-9 promotes a suppressive microenvironment in human cancer by enhancing STING degradation. *Oncogenesis* **2020**, *9*, 65. [[CrossRef](#)]
159. Temme, S.; Eis-Hübinger, A.M.; McLellan, A.D.; Koch, N. The Herpes Simplex Virus-1 Encoded Glycoprotein B Diverts HLA-DR into the Exosome Pathway. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 236–243. [[CrossRef](#)]
160. Saari, H.; Turunen, T.; Lohmus, A.; Turunen, M.; Jalasvuori, M.; Butcher, S.J.; Ylä-Herttua, S.; Viitala, T.; Cerullo, V.; Siljander, P.R.M.; et al. Extracellular vesicles provide a capsid-free vector for oncolytic adenoviral DNA delivery. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*, 1747206. [[CrossRef](#)]
161. Kakiuchi, Y.; Kuroda, S.; Kanaya, N.; Kumon, K.; Tsumura, T.; Hashimoto, M.; Yagi, C.; Sugimoto, R.; Hamada, Y.; Kikuchi, S.; et al. Local oncolytic adenovirotherapy produces an abscopal effect via tumor-derived extracellular vesicles. *Mol. Ther.* **2021**, *29*, 2920–2930. [[CrossRef](#)]
162. Dai, J.; Su, Y.; Zhong, S.; Cong, L.; Liu, B.; Yang, J.; Tao, Y.; He, Z.; Chen, C.; Jiang, Y. Exosomes: Key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 145. [[CrossRef](#)]
163. Zhang, W.; Jiang, X.; Bao, J.; Wang, Y.; Liu, H.; Tang, L. Exosomes in Pathogen Infections: A Bridge to Deliver Molecules and Link Functions. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Kitai, Y.; Kawasaki, T.; Sueyoshi, T.; Kobiyama, K.; Ishii, K.J.; Zou, J.; Akira, S.; Matsuda, T.; Kawai, T. DNA-Containing Exosomes Derived from Cancer Cells Treated with Topotecan Activate a STING-Dependent Pathway and Reinforce Antitumor Immunity. *J. Immunol.* **2017**, *198*, 1649–1659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Ablasser, A.; Hur, S. Regulation of cGAS- and RLR-mediated immunity to nucleic acids. *Nat. Immunol.* **2020**, *21*, 17–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Longatti, A. The Dual Role of Exosomes in Hepatitis A and C Virus Transmission and Viral Immune Activation. *Viruses* **2015**, *7*, 6707–6715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Barnes, B.J.; Somerville, C.C. Modulating Cytokine Production via Select Packaging and Secretion from Extracellular Vesicles. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Souza, A.G.; Colli, L.M. Extracellular Vesicles and Interleukins: Novel Frontiers in Diagnostic and Therapeutic for Cancer. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 836922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Rana, A.A.; Lucs, A.V.; DeVoti, J.; Blanc, L.; Papoin, J.; Wu, R.; Papayannakos, C.J.; Abramson, A.; Bonagura, V.R.; Steinberg, B.M. Poly(I:C) induces controlled release of IL-36 γ from keratinocytes in the absence of cell death. *Immunol. Res.* **2015**, *63*, 228–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Li, J.; Liu, K.; Liu, Y.; Xu, Y.; Zhang, F.; Yang, H.; Liu, J.; Pan, T.; Chen, J.; Wu, M.; et al. Exosomes mediate the cell-to-cell transmission of IFN- α -induced antiviral activity. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 793–803. [[CrossRef](#)]
171. Khatua, A.K.; Taylor, H.E.; Hildreth, J.E.K.; Popik, W. Exosomes Packaging APOBEC3G Confer Human Immunodeficiency Virus Resistance to Recipient Cells. *J. Virol.* **2009**, *83*, 512–521. [[CrossRef](#)]
172. Zhu, X.; He, Z.; Yuan, J.; Wen, W.; Huang, X.; Hu, Y.; Lin, C.; Pan, J.; Li, R.; Deng, H.; et al. IFITM3-containing exosome as a novel mediator for anti-viral response in dengue virus infection: Antiviral effect of IFITM3 mediated by exosome. *Cell. Microbiol.* **2015**, *17*, 105–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Sun, L.; Wang, X.; Zhou, Y.; Zhou, R.-H.; Ho, W.-Z.; Li, J.-L. Exosomes contribute to the transmission of anti-HIV activity from TLR3-activated brain microvascular endothelial cells to macrophages. *Antiviral Res.* **2016**, *134*, 167–171. [[CrossRef](#)]
174. Velandia-Romero, M.L.; Calderón-Peláez, M.A.; Balbás-Tepedino, A.; Márquez-Ortiz, R.A.; Madroñero, L.J.; Prieto, A.B.; Castellanos, J.E. Extracellular vesicles of U937 macrophage cell line infected with DENV-2 induce activation in endothelial cells EA.hy926. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0227030. [[CrossRef](#)]

175. Edgar, J.R.; Manna, P.T.; Nishimura, S.; Banting, G.; Robinson, M.S. Tetherin is an exosomal tether. *eLife* **2016**, *5*, e17180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Villarroya-Beltri, C.; Baixauli, F.; Mittelbrunn, M.; Fernandez-Delgado, I.; Torralba, D.; Moreno-Gonzalo, O.; Baldanta, S.; Enrich, C.; Guerra, S.; Sánchez-Madrid, F. ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Delorme-Axford, E.; Donker, R.B.; Mouillet, J.-F.; Chu, T.; Bayer, A.; Ouyang, Y.; Wang, T.; Stolz, D.B.; Sarkar, S.N.; Morelli, A.E.; et al. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 12048–12053. [[CrossRef](#)]
178. Maemura, T.; Fukuyama, S.; Kawaoka, Y. High Levels of miR-483-3p Are Present in Serum Exosomes Upon Infection of Mice with Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 144. [[CrossRef](#)]
179. Rana, R.; Kant, R.; Kaul, D.; Sachdev, A.; Ganguly, N.K. Integrated view of molecular diagnosis and prognosis of dengue viral infection: Future prospect of exosomes biomarkers. *Mol. Cell. Biochem.* **2022**, *477*, 815–832. [[CrossRef](#)]
180. Lin, J.; Li, J.; Huang, B.; Liu, J.; Chen, X.; Chen, X.-M.; Xu, Y.-M.; Huang, L.-F.; Wang, X.-Z. Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *Sci. World J.* **2015**, *2015*, 657086. [[CrossRef](#)]
181. Keller, S.; Ridinger, J.; Rupp, A.-K.; Janssen, J.W.; Altevogt, P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J. Transl. Med.* **2011**, *9*, 86. [[CrossRef](#)]
182. Ludwig, N.; Whiteside, T.L.; Reichert, T.E. Challenges in Exosome Isolation and Analysis in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4684. [[CrossRef](#)]
183. Douglas, S.R.; Yeung, K.T.; Yang, J.; Blair, S.L.; Cohen, O.; Eliceiri, B.P. Identification of CD105+ Extracellular Vesicles as a Candidate Biomarker for Metastatic Breast Cancer. *J. Surg. Res.* **2021**, *268*, 168–173. [[CrossRef](#)]
184. Osti, D.; Del Bene, M.; Rappa, G.; Santos, M.; Matafora, V.; Richichi, C.; Faletti, S.; Beznoussenko, G.V.; Mironov, A.; Bachi, A.; et al. Clinical Significance of Extracellular Vesicles in Plasma from Glioblastoma Patients. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 266–276. [[CrossRef](#)]
185. Sabbagh, Q.; André-Grégoire, G.; Alves-Nicolau, C.; Dupont, A.; Bidère, N.; Jouglar, E.; Guével, L.; Frénel, J.-S.; Gavard, J. The von Willebrand factor stamps plasmatic extracellular vesicles from glioblastoma patients. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 22792. [[CrossRef](#)]
186. Zhang, L.; Gu, C.; Wen, J.; Liu, G.; Liu, H.; Li, L. Recent advances in nanomaterial-based biosensors for the detection of exosomes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, *413*, 83–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Dezhakam, E.; Khalilzadeh, B.; Mahdipour, M.; Isildak, I.; Yousefi, H.; Ahmadi, M.; Naseri, A.; Rahbarghazi, R. Electrochemical biosensors in exosome analysis; a short journey to the present and future trends in early-stage evaluation of cancers. *Biosens. Bioelectron.* **2023**, *222*, 114980. [[CrossRef](#)]
188. Xu, L.; Shoaie, N.; Jahanpeyma, F.; Zhao, J.; Azimzadeh, M.; Al, K.T. Optical, electrochemical and electrical (nano)biosensors for detection of exosomes: A comprehensive overview. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *161*, 112222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Koch, L.F.; Best, T.; Wüstenhagen, E.; Adrian, K.; Rammo, O.; Saul, M.J. Novel insights into the isolation of extracellular vesicles by anion exchange chromatography. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2024**, *11*, 1298892. [[CrossRef](#)]
190. Thakur, B.K.; Zhang, H.; Becker, A.; Matei, I.; Huang, Y.; Costa-Silva, B.; Zheng, Y.; Hoshino, A.; Brazier, H.; Xiang, J.; et al. Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* **2014**, *24*, 766–769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Fu, F.; Jiang, W.; Zhou, L.; Chen, Z. Circulating Exosomal miR-17-5p and miR-92a-3p Predict Pathologic Stage and Grade of Colorectal Cancer. *Transl. Oncol.* **2018**, *11*, 221–232. [[CrossRef](#)]
192. Akers, J.C.; Ramakrishnan, V.; Kim, R.; Skog, J.; Nakano, I.; Pingle, S.; Kalinina, J.; Hua, W.; Kesari, S.; Mao, Y.; et al. miR-21 in the Extracellular Vesicles (EVs) of Cerebrospinal Fluid (CSF): A Platform for Glioblastoma Biomarker Development. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e78115. [[CrossRef](#)]
193. Wang, Y.; Liu, J.; Ma, J.; Sun, T.; Zhou, Q.; Wang, W.; Wang, G.; Wu, P.; Wang, H.; Jiang, L.; et al. Exosomal circRNAs: Biogenesis, effect and application in human diseases. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 116. [[CrossRef](#)]
194. Li, J.; Li, Z.; Jiang, P.; Peng, M.; Zhang, X.; Chen, K.; Liu, H.; Bi, H.; Liu, X.; Li, X. Circular RNA IARS (circ-IARS) secreted by pancreatic cancer cells and located within exosomes regulates endothelial monolayer permeability to promote tumor metastasis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, 177. [[CrossRef](#)]
195. Zhou, Z.; Zhang, D.; Wang, Y.; Liu, C.; Wang, L.; Yuan, Y.; Xu, X.; Jiang, Y. Urinary exosomes: A promising biomarker of drug-induced nephrotoxicity. *Front. Med.* **2023**, *10*, 1251839. [[CrossRef](#)]
196. He, C.; Zheng, S.; Luo, Y.; Wang, B. Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics* **2018**, *8*, 237–255. [[CrossRef](#)]
197. Jeppesen, D.K.; Zhang, Q.; Franklin, J.L.; Coffey, R.J. Extracellular vesicles and nanoparticles: Emerging complexities. *Trends Cell Biol.* **2023**, *33*, 667–681. [[CrossRef](#)]
198. Makler, A.; Asghar, W. Exosomal biomarkers for cancer diagnosis and patient monitoring. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2020**, *20*, 387–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Tutrone, R.; Donovan, M.J.; Torkler, P.; Tadigotla, V.; McLain, T.; Noerholm, M.; Skog, J.; McKiernan, J. Clinical utility of the exosome based ExoDx Prostate(IntelliScore) EPI test in men presenting for initial Biopsy with a PSA 2–10 ng/mL. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2020**, *23*, 607–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. El-Kadiry, A.E.-H.; Rafei, M.; Shammaa, R. Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits. *Front. Med.* **2021**, *8*, 756029. [[CrossRef](#)]

201. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Krause, D.S.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Bedoui, Y.; Lebeau, G.; Guillot, X.; Dargai, F.; Guiraud, P.; Neal, J.W.; Ralandson, S.; Gasque, P. Emerging Roles of Perivascular Mesenchymal Stem Cells in Synovial Joint Inflammation. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2020**, *15*, 838–851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Lebeau, G.; Ah-Pine, F.; Daniel, M.; Bedoui, Y.; Vagner, D.; Frumence, E.; Gasque, P. Perivascular Mesenchymal Stem/Stromal Cells, an Immune Privileged Niche for Viruses? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Harrell, C.; Fellabaum, C.; Jovicic, N.; Djonov, V.; Arsenijevic, N.; Volarevic, V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. *Cells* **2019**, *8*, 467. [[CrossRef](#)]
205. Ma, H.; Siu, W.-S.; Leung, P.-C. The Potential of MSC-Based Cell-Free Therapy in Wound Healing—A Thorough Literature Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 9356. [[CrossRef](#)]
206. Volarevic, V.; Markovic, B.S.; Gazdic, M.; Volarevic, A.; Jovicic, N.; Arsenijevic, N.; Armstrong, L.; Djonov, V.; Lako, M.; Stojkovic, M. Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *Int. J. Med. Sci.* **2018**, *15*, 36–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
207. Mojsilović, S.; Jauković, A.; Kukolj, T.; Obradović, H.; Đorđević, I.O.; Petrović, A.; Bugarski, D. Tumorigenic Aspects of MSC Senescence—Implication in Cancer Development and Therapy. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 1133. [[CrossRef](#)]
208. Prockop, D.J. “Stemness” Does Not Explain the Repair of Many Tissues by Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells (MSCs). *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, *82*, 241–243. [[CrossRef](#)]
209. Miceli, V.; Bulati, M.; Iannolo, G.; Zito, G.; Gallo, A.; Conaldi, P.G. Therapeutic Properties of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: The Need of Cell Priming for Cell-Free Therapies in Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 763. [[CrossRef](#)]
210. Cheng, A.; Choi, D.; Lora, M.; Shum-Tim, D.; Rak, J.; Colmegna, I. Human multipotent mesenchymal stromal cells cytokine priming promotes RAB27B-regulated secretion of small extracellular vesicles with immunomodulatory cargo. *Stem Cell Res. Ther.* **2020**, *11*, 539. [[CrossRef](#)]
211. Han, Y.-D.; Bai, Y.; Yan, X.-L.; Ren, J.; Zeng, Q.; Li, X.-D.; Pei, X.-T.; Han, Y. Co-transplantation of exosomes derived from hypoxia-preconditioned adipose mesenchymal stem cells promotes neovascularization and graft survival in fat grafting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *497*, 305–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
212. Xi, Y.; Ju, R.; Wang, Y. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles for the Treatment of Bronchopulmonary Dysplasia. *Front. Pediatr.* **2022**, *10*, 852034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
213. Tan, F.; Li, X.; Wang, Z.; Li, J.; Shahzad, K.; Zheng, J. Clinical applications of stem cell-derived exosomes. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 17. [[CrossRef](#)]
214. Santos, C.C.D.; Lopes-Pacheco, M.; English, K.; Enes, S.R.; Krasnodembskaya, A.; Rocco, P.R.M. The MSC-EV-microRNAome: A Perspective on Therapeutic Mechanisms of Action in Sepsis and ARDS. *Cells* **2024**, *13*, 122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Li, J.W.; Wei, L.; Han, Z.; Chen, Z. Mesenchymal stromal cells-derived exosomes alleviate ischemia/reperfusion injury in mouse lung by transporting anti-apoptotic miR-21-5p. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *852*, 68–76. [[CrossRef](#)]
216. Sun, X.-H.; Wang, X.; Zhang, Y.; Hui, J. Exosomes of bone-marrow stromal cells inhibit cardiomyocyte apoptosis under ischemic and hypoxic conditions via miR-486-5p targeting the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Thromb. Res.* **2019**, *177*, 23–32. [[CrossRef](#)]
217. Yue, R.; Lu, S.; Luo, Y.; Zeng, J.; Liang, H.; Qin, D.; Wang, X.; Wang, T.; Pu, J.; Hu, H. Mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-182-5p alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by targeting GSDMD in mice. *Cell Death Discov.* **2022**, *8*, 202. [[CrossRef](#)]
218. Harrell, C.R.; Jovicic, N.; Djonov, V.; Arsenijevic, N.; Volarevic, V. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Other Extracellular Vesicles as New Remedies in the Therapy of Inflammatory Diseases. *Cells* **2019**, *8*, 1605. [[CrossRef](#)]
219. Kamm, D.R.; McCommis, K.S. Hepatic stellate cells in physiology and pathology. *J. Physiol.* **2022**, *600*, 1825–1837. [[CrossRef](#)]
220. Rong, X.; Liu, J.; Yao, X.; Jiang, T.; Wang, Y.; Xie, F. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/ β -catenin pathway. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10*, 98. [[CrossRef](#)]
221. Zhang, Y.; Pan, Y.; Liu, Y.; Li, X.; Tang, L.; Duan, M.; Li, J.; Zhang, G. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulate regenerative wound healing via transforming growth factor- β receptor inhibition. *Stem Cell Res. Ther.* **2021**, *12*, 434. [[CrossRef](#)]
222. Moghadasi, S.; Elveny, M.; Rahman, H.S.; Suksatan, W.; Jalil, A.T.; Abdelbasset, W.K.; Yumashev, A.V.; Shariatzadeh, S.; Motavalli, R.; Behzad, F.; et al. A paradigm shift in cell-free approach: The emerging role of MSCs-derived exosomes in regenerative medicine. *J. Transl. Med.* **2021**, *19*, 302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Oguma, Y.; Kuroda, Y.; Wakao, S.; Kushida, Y.; Dezawa, M. Single-cell RNA sequencing reveals different signatures of mesenchymal stromal cell pluripotent-like and multipotent populations. *iScience* **2022**, *25*, 105395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Laggner, M.; Gugerell, A.; Bachmann, C.; Hofbauer, H.; Vorstandlechner, V.; Seibold, M.; Gouya Lechner, G.; Peterbauer, A.; Madlener, S.; Demyanets, S.; et al. Reproducibility of GMP-compliant production of therapeutic stressed peripheral blood mononuclear cell-derived secretomes, a novel class of biological medicinal products. *Stem Cell Res. Ther.* **2020**, *11*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Lotfy, A.; AboQuella, N.M.; Wang, H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. *Stem Cell Res. Ther.* **2023**, *14*, 66. [[CrossRef](#)]

226. Wan, Z.; Zhao, L.; Lu, F.; Gao, X.; Dong, Y.; Zhao, Y.; Wei, M.; Yang, G.; Xing, C.; Liu, L. Mononuclear phagocyte system blockade improves therapeutic exosome delivery to the myocardium. *Theranostics* **2020**, *10*, 218–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
227. Lu, Y.; Yang, Y.; Zhu, G.; Zeng, H.; Fan, Y.; Guo, F.; Xu, D.; Wang, B.; Chen, D.; Ge, G. Emerging Pharmacotherapeutic Strategies to Overcome Undruggable Proteins in Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2023**, *19*, 3360–3382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
228. Hood, J.L. Post isolation modification of exosomes for nanomedicine applications. *Nanomedicine* **2016**, *11*, 1745–1756. [[CrossRef](#)]
229. Bai, J.; Wei, X.; Zhang, X.; Wu, C.; Wang, Z.; Chen, M.; Wang, J. Microfluidic strategies for the isolation and profiling of exosomes. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2023**, *158*, 116834. [[CrossRef](#)]
230. Kalani, A.; Chaturvedi, P.; Kamat, P.K.; Maldonado, C.; Bauer, P.; Joshua, I.G.; Tyagi, S.C.; Tyagi, N. Curcumin-loaded embryonic stem cell exosomes restored neurovascular unit following ischemia-reperfusion injury. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *79*, 360–369. [[CrossRef](#)]
231. Li, D.; Zhang, C.; Gao, Z.; Xia, N.; Wu, C.; Liu, C.; Tian, H.; Mei, X. Curcumin-Loaded Macrophage-Derived Exosomes Effectively Improve Wound Healing. *Mol. Pharm.* **2023**, *20*, 4453–4467. [[CrossRef](#)]
232. Sadeghi, S.; Tehrani, F.R.; Tahmasebi, S.; Shafiee, A.; Hashemi, S.M. Exosome engineering in cell therapy and drug delivery. *Inflammopharmacology* **2023**, *31*, 145–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Tian, Y.; Li, S.; Song, J.; Ji, T.; Zhu, M.; Anderson, G.J.; Wei, J.; Nie, G. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* **2014**, *35*, 2383–2390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
234. Haney, M.J.; Zhao, Y.; Harrison, E.B.; Mahajan, V.; Ahmed, S.; He, Z.; Suresh, P.; Hingtgen, S.D.; Klyachko, N.L.; Mosley, R.L.; et al. Specific Transfection of Inflamed Brain by Macrophages: A New Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61852. [[CrossRef](#)]
235. Zhao, Y.; Haney, M.J.; Gupta, R.; Bohnsack, J.P.; He, Z.; Kabanov, A.V.; Batrakova, E.V. GDNF-Transfected Macrophages Produce Potent Neuroprotective Effects in Parkinson's Disease Mouse Model. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e106867. [[CrossRef](#)]
236. Liang, G.; Zhu, Y.; Ali, D.J.; Tian, T.; Xu, H.; Si, K.; Sun, B.; Chen, B.; Xiao, Z. Engineered exosomes for targeted co-delivery of miR-21 inhibitor and chemotherapeutics to reverse drug resistance in colon cancer. *J. Nanobiotechnol.* **2020**, *18*, 10. [[CrossRef](#)]
237. Koh, H.B.; Kim, H.J.; Kang, S.-W.; Yoo, T.-H. Exosome-Based Drug Delivery: Translation from Bench to Clinic. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2042. [[CrossRef](#)]
238. Marschall, A.L.J. Targeting the Inside of Cells with Biologicals: Chemicals as a Delivery Strategy. *BioDrugs* **2021**, *35*, 643–671. [[CrossRef](#)]
239. Herrmann, I.K.; Wood, M.J.A.; Fuhrmann, G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat. Nanotechnol.* **2021**, *16*, 748–759. [[CrossRef](#)]
240. Sercombe, L.; Veerati, T.; Moheimani, F.; Wu, S.Y.; Sood, A.K.; Hua, S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
241. Murphy, D.E.; De Jong, O.G.; Evers, M.J.W.; Nurazizah, M.; Schiffelers, R.M.; Vader, P. Natural or Synthetic RNA Delivery: A Stoichiometric Comparison of Extracellular Vesicles and Synthetic Nanoparticles. *Nano Lett.* **2021**, *21*, 1888–1895. [[CrossRef](#)]
242. Hodge, A.L.; Baxter, A.A.; Poon, I.K.H. Gift bags from the sentinel cells of the immune system: The diverse role of dendritic cell-derived extracellular vesicles. *J. Leukoc. Biol.* **2022**, *111*, 903–920. [[CrossRef](#)]
243. Segura, E.; Amigorena, S.; Théry, C. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells. Mol. Dis.* **2005**, *35*, 89–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
244. Lindenbergh, M.F.S.; Koerhuis, D.G.J.; Borg, E.G.F.; Veld, E.M.T.; Driedonks, T.A.P.; Wubbolts, R.; Stoorvogel, W.; Boes, M. Bystander T-Cells Support Clonal T-Cell Activation by Controlling the Release of Dendritic Cell-Derived Immune-Stimulatory Extracellular Vesicles. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
245. Lindenbergh, M.F.S.; Wubbolts, R.; Borg, E.G.F.; Van 't Veld, E.M.; Boes, M.; Stoorvogel, W. Dendritic cells release exosomes together with phagocytosed pathogen; potential implications for the role of exosomes in antigen presentation. *J. Extracell. Vesicles* **2020**, *9*, 1798606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Montecalvo, A.; Shufesky, W.J.; Stolz, D.B.; Sullivan, M.G.; Wang, Z.; DiVito, S.J.; Papworth, G.D.; Watkins, S.C.; Robbins, P.D.; Larregina, A.T.; et al. Exosomes As a Short-Range Mechanism to Spread Alloantigen between Dendritic Cells during T Cell Allerecognition. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 3081–3090. [[CrossRef](#)]
247. Matsuzaka, Y.; Yashiro, R. Regulation of Extracellular Vesicle-Mediated Immune Responses against Antigen-Specific Presentation. *Vaccines* **2022**, *10*, 1691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
248. Reyes-Ruiz, J.M.; Osuna-Ramos, J.F.; De Jesús-González, L.A.; Palacios-Rápalo, S.N.; Cordero-Rivera, C.D.; Farfan-Morales, C.N.; Hurtado-Monzón, A.M.; Gallardo-Flores, C.E.; Alcaraz-Estrada, S.L.; Salas-Benito, J.S.; et al. The Regulation of Flavivirus Infection by Hijacking Exosome-Mediated Cell–Cell Communication: New Insights on Virus–Host Interactions. *Viruses* **2020**, *12*, 765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
249. Anderson, M.R.; Pleet, M.L.; Enose-Akahata, Y.; Erickson, J.; Monaco, M.C.; Akpamagbo, Y.; Velluci, A.; Tanaka, Y.; Azodi, S.; Lepene, B.; et al. Viral antigens detectable in CSF exosomes from patients with retrovirus associated neurologic disease: Functional role of exosomes. *Clin. Transl. Med.* **2018**, *7*, e24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
250. Pesce, E.; Manfrini, N.; Cordiglieri, C.; Santi, S.; Bandera, A.; Gobbin, A.; Gruarin, P.; Favalli, A.; Bombaci, M.; Cuomo, A.; et al. Exosomes Recovered From the Plasma of COVID-19 Patients Expose SARS-CoV-2 Spike-Derived Fragments and Contribute to the Adaptive Immune Response. *Front. Immunol.* **2022**, *12*, 785941. [[CrossRef](#)]

251. Huda, M.N.; Nurunnabi, M. Potential Application of Exosomes in Vaccine Development and Delivery. *Pharm. Res.* **2022**, *39*, 2635–2671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
252. Sabanovic, B.; Piva, F.; Cecati, M.; Giuletta, M. Promising Extracellular Vesicle-Based Vaccines against Viruses, Including SARS-CoV-2. *Biology* **2021**, *10*, 94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
253. Alphanđery, E. Nano dimensions/adjuvants in COVID-19 vaccines. *J. Mater. Chem. B* **2022**, *10*, 1520–1552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
254. Jesus, S.; Soares, E.; Cruz, M.T.; Borges, O. Exosomes as adjuvants for the recombinant hepatitis B antigen: First report. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, *133*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
255. Vallhov, H.; Gutzeit, C.; Johansson, S.M.; Nagy, N.; Paul, M.; Li, Q.; Friend, S.; George, T.C.; Klein, E.; Scheynius, A.; et al. Exosomes Containing Glycoprotein 350 Released by EBV-Transformed B Cells Selectively Target B Cells through CD21 and Block EBV Infection In Vitro. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 73–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
256. Delcayre, A.; Estelles, A.; Sperinde, J.; Roulon, T.; Paz, P.; Aguilar, B.; Villanueva, J.; Khine, S.; Le Pecq, J.-B. Exosome Display technology: Applications to the development of new diagnostics and therapeutics. *Blood Cells. Mol. Dis.* **2005**, *35*, 158–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
257. Bliss, C.M.; Parsons, A.J.; Nachbagauer, R.; Hamilton, J.R.; Cappuccini, F.; Ulaszewska, M.; Webber, J.P.; Clayton, A.; Hill, A.V.; Coughlan, L. Targeting Antigen to the Surface of EVs Improves the In Vivo Immunogenicity of Human and Non-human Adenoviral Vaccines in Mice. *Mol. Ther.—Methods Clin. Dev.* **2020**, *16*, 108–125. [[CrossRef](#)]
258. Stickney, Z.; Losacco, J.; McDevitt, S.; Zhang, Z.; Lu, B. Development of exosome surface display technology in living human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *472*, 53–59. [[CrossRef](#)]
259. Zhang, J.; Brown, A.; Johnson, B.; Diebold, D.; Asano, K.; Marriott, G.; Lu, B. Genetically Engineered Extracellular Vesicles Harboring Transmembrane Scaffolds Exhibit Differences in Their Size, Expression Levels of Specific Surface Markers and Cell-Uptake. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2564. [[CrossRef](#)]
260. Dooley, K.; McConnell, R.E.; Xu, K.; Lewis, N.D.; Haupt, S.; Youniss, M.R.; Martin, S.; Sia, C.L.; McCoy, C.; Moniz, R.J.; et al. A versatile platform for generating engineered extracellular vesicles with defined therapeutic properties. *Mol. Ther.* **2021**, *29*, 1729–1743. [[CrossRef](#)]
261. Xu, X.; Liang, Y.; Li, X.; Ouyang, K.; Wang, M.; Cao, T.; Li, W.; Liu, J.; Xiong, J.; Li, B.; et al. Exosome-mediated delivery of kartogenin for chondrogenesis of synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration. *Biomaterials* **2021**, *269*, 120539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
262. Alvarez-Erviti, L.; Seow, Y.; Yin, H.; Betts, C.; Lakhai, S.; Wood, M.J.A. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 341–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
263. Lin, Y.; Yan, M.; Bai, Z.; Xie, Y.; Ren, L.; Wei, J.; Zhu, D.; Wang, H.; Liu, Y.; Luo, J.; et al. Huc-MSC-derived exosomes modified with the targeting peptide of aHSCs for liver fibrosis therapy. *J. Nanobiotechnology* **2022**, *20*, 432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
264. Wang, C.; Chen, Y.; Hu, S.; Liu, X. Insights into the function of ESCRT and its role in enveloped virus infection. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1261651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
265. Zubarev, I.; Vladimirtsev, D.; Vorontsova, M.; Blatov, I.; Shevchenko, K.; Zvereva, S.; Lunev, E.A.; Faizuloev, E.; Barlev, N. Viral Membrane Fusion Proteins and RNA Sorting Mechanisms for the Molecular Delivery by Exosomes. *Cells* **2021**, *10*, 3043. [[CrossRef](#)]
266. Degassart, A.; Trentin, B.; Martin, M.; Hocquelliet, A.; Bettobillo, P.; Mamoun, R.; Vidal, M. Exosomal sorting of the cytoplasmic domain of bovine leukemia virus TM Env protein. *Cell Biol. Int.* **2009**, *33*, 36–48. [[CrossRef](#)]
267. Antes, T.J.; Middleton, R.C.; Luther, K.M.; Ijichi, T.; Peck, K.A.; Liu, W.J.; Valle, J.; Echavez, A.K.; Marbán, E. Targeting extracellular vesicles to injured tissue using membrane cloaking and surface display. *J. Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, 61. [[CrossRef](#)]
268. Zheng, W.; Schürz, M.; Wiklander, R.J.; Gustafsson, O.; Gupta, D.; Slovak, R.; Traista, A.; Coluzzi, A.; Roudi, S.; Barone, A.; et al. Surface display of functional moieties on extracellular vesicles using lipid anchors. *J. Control. Release* **2023**, *357*, 630–640. [[CrossRef](#)]
269. Kooijmans, S.A.A.; Aleza, C.G.; Roffler, S.R.; Van Solinge, W.W.; Vader, P.; Schiffelers, R.M. Display of GPI-anchored anti-EGFR nanobodies on extracellular vesicles promotes tumour cell targeting. *J. Extracell. Vesicles* **2016**, *5*, 31053. [[CrossRef](#)]
270. Uppu, D.S.; Min, Y.; Kim, I.; Kumar, S.; Park, J.; Cho, Y.-K. Glycolipid-Anchored Proteins on Bioengineered Extracellular Vesicles for Lipopolysaccharide Neutralization. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 29313–29324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
271. Anticoli, S.; Falcone, E.; Ruggieri, A.; Federico, M. Engineered exosomes boost the HCV NS3-specific CD8⁺ T lymphocyte immunity in humans. *Trials Vaccinol.* **2016**, *5*, 105–110. [[CrossRef](#)]
272. Anticoli, S.; Manfredi, F.; Chiozzini, C.; Arenaccio, C.; Olivetta, E.; Ferrantelli, F.; Capocéfalo, A.; Falcone, E.; Ruggieri, A.; Federico, M. An Exosome-Based Vaccine Platform Imparts Cytotoxic T Lymphocyte Immunity against Viral Antigens. *Biotechnol. J.* **2018**, *13*, 1700443. [[CrossRef](#)]
273. Matsuzaka, Y.; Yashiro, R. Extracellular Vesicle-Based SARS-CoV-2 Vaccine. *Vaccines* **2023**, *11*, 539. [[CrossRef](#)]
274. Cacciottolo, M.; Nice, J.B.; Li, Y.; LeClaire, M.J.; Twaddle, R.; Mora, C.L.; Adachi, S.Y.; Chin, E.R.; Young, M.; Angeles, J.; et al. Exosome-Based Multivalent Vaccine: Achieving Potent Immunization, Broadened Reactivity, and Strong T-Cell Responses with Nanograms of Proteins. *Microbiol. Spectr.* **2023**, *11*, e00503-23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
275. Tsai, S.J.; Atai, N.A.; Cacciottolo, M.; Nice, J.; Salehi, A.; Guo, C.; Sedgwick, A.; Kanagavelu, S.; Gould, S.J. Exosome-mediated mRNA delivery in vivo is safe and can be used to induce SARS-CoV-2 immunity. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 101266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

276. Popowski, K.D.; Moatti, A.; Scull, G.; Silkstone, D.; Lutz, H.; Abad, B.L.d.J.; George, A.; Belcher, E.; Zhu, D.; Mei, X.; et al. Inhalable dry powder mRNA vaccines based on extracellular vesicles. *Matter* **2022**, *5*, 2960–2974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
277. Zhang, Q.; Wang, M.; Han, C.; Wen, Z.; Meng, X.; Qi, D.; Wang, N.; Du, H.; Wang, J.; Lu, L.; et al. Intraduodenal Delivery of Exosome-Loaded SARS-CoV-2 RBD mRNA Induces a Neutralizing Antibody Response in Mice. *Vaccines* **2023**, *11*, 673. [[CrossRef](#)]
278. Kuate, S.; Cinatl, J.; Doerr, H.W.; Überla, K. Exosomal vaccines containing the S protein of the SARS coronavirus induce high levels of neutralizing antibodies. *Virology* **2007**, *362*, 26–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
279. Karn, V.; Ahmed, S.; Tsai, L.-W.; Dubey, R.; Ojha, S.; Singh, H.N.; Kumar, M.; Gupta, P.K.; Sadhu, S.; Jha, N.K.; et al. Extracellular Vesicle-Based Therapy for COVID-19: Promises, Challenges and Future Prospects. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
280. Wang, Z.; Popowski, K.D.; Zhu, D.; Abad, B.L.d.J.; Wang, X.; Liu, M.; Lutz, H.; De Naeyer, N.; DeMarco, C.T.; Denny, T.N.; et al. Exosomes decorated with a recombinant SARS-CoV-2 receptor-binding domain as an inhalable COVID-19 vaccine. *Nat. Biomed. Eng.* **2022**, *6*, 791–805. [[CrossRef](#)]
281. Schorey, J.S.; Cheng, Y.; Singh, P.P.; Smith, V.L. Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. *EMBO Rep.* **2015**, *16*, 24–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
282. Schwab, A.; Meyering, S.S.; Lepene, B.; Iordanskiy, S.; van Hoek, M.L.; Hakami, R.M.; Kashanchi, F. Extracellular vesicles from infected cells: Potential for direct pathogenesis. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
283. Lai, R.C.; Yeo, R.W.Y.; Tan, K.H.; Lim, S.K. Exosomes for drug delivery—A novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 543–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
284. Tumban, E. Bacteriophage Virus-Like Particles: Platforms for Vaccine Design. In *Bacteriophages; Methods in Molecular Biology*; Springer: New York, NY, USA, 2024; pp. 411–423. [[CrossRef](#)]
285. Celis-Giraldo, C.T.; López-Abán, J.; Muro, A.; Patarroyo, M.A.; Manzano-Román, R. Nanovaccines against Animal Pathogens: The Latest Findings. *Vaccines* **2021**, *9*, 988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
286. Marcus, M.; Leonard, J. FedExosomes: Engineering Therapeutic Biological Nanoparticles that Truly Deliver. *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 659–680. [[CrossRef](#)]
287. Wang, X.; Xia, J.; Yang, L.; Dai, J.; He, L. Recent progress in exosome research: Isolation, characterization and clinical applications. *Cancer Gene Ther.* **2023**, *30*, 1051–1065. [[CrossRef](#)]
288. Fu, C.; Zhou, L.; Mi, Q.-S.; Jiang, A. Plasmacytoid Dendritic Cells and Cancer Immunotherapy. *Cells* **2022**, *11*, 222. [[CrossRef](#)]
289. Shahraki, K.; Boroumand, P.G.; Lotfi, H.; Radnia, F.; Shahriari, H.; Sargazi, S.; Mortazavi, S.S.; Shirvaliloo, M.; Shirvalilou, S.; Sheervalilou, R. An update in the applications of exosomes in cancer theranostics: From research to clinical trials. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2023**, *149*, 8087–8116. [[CrossRef](#)]

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

Oncolytic viruses alter the biogenesis of tumor extracellular vesicles and influence their immunogenicity

Ugo Hirigoyen^{1,2}, Coraly Guilbaud^{1,2}, Morgane Krejbich^{1,2}, Morgane Fouet^{1,2}, Judith Fresquet^{1,2}, Bastien Arnaud^{3,4}, Emmanuelle Com^{3,4}, Charles Pineau^{3,4}, Gwenann Cadiou^{2,5}, Julien Burlaud-Gaillard⁶, Philippe Erbs⁷, Delphine Fradin^{1,2}, Nathalie Labarrière^{2,5}, Jean-François Fonteneau^{1,2}, Tacien Petithomme^{1,2,8}, Nicolas Boisgerault^{1,2,*}

¹Nantes Université, Inserm UMR 1307, CNRS UMR 6075, Université d'Angers, CRCI2NA, F-44000 Nantes, France

²LabEx IGO, Nantes Université, F-44000 Nantes, France

³Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de recherche en santé, environnement et travail) – UMR_S 1085, F-35000 Rennes, France

⁴Univ Rennes, CNRS, Inserm, Biosit UAR 3480 US_S 018, Protim core facility, F-35000 Rennes, France

⁵Nantes Université, Inserm UMR 1302, CNRS EMR 6001, Université d'Angers, INCIT, F-44000 Nantes, France

⁶Plate-Forme IBiSA de Microscopie Electronique, Université de Tours and CHRU de Tours, F-37000 Tours, France

⁷Transgene SA, F-67400 Illkirch-Graffenstaden, France

⁸Nantes Université, CHU Nantes, F-44000 Nantes, France

*Correspondence should be addressed to N.B. (nicolas.boisgerault@inserm.fr)

All work was conducted in Nantes, Rennes and Tours, France.

Correspondence: Nicolas Boisgerault, Inserm UMR 1307, 8 quai Moncousu, BP 70721, 44 007 Nantes Cedex 1, France. +33 2 28 08 02 36

Email: nicolas.boisgerault@inserm.fr

Short title: Impact of oncolytic infection on tumor exosomes

Abstract

Extracellular vesicles (EVs) are mediators of intercellular communication in the tumor microenvironment. Tumor EVs are commonly associated with metastasis, immunosuppression or drug resistance. Viral infections usually increase EV secretion, but little is known about the effect of oncolytic viruses (OVs) on tumor EVs. Here, we investigated the impact of oncolytic vesicular stomatitis virus (VSV) and vaccinia virus (VACV) on EVs secreted by human melanoma and thoracic cancer cells. We found that OV infection increases the production of EVs by tumor cells. These EVs contain proteins of viral origin, such as VSV-G, thus creating a continuum of particles sharing markers of both canonical EVs and viruses. As such, the presence of VSV-G on EVs improves the transfer of their protein content to cell types commonly found in the tumor microenvironment. A proteomic analysis also revealed that EVs-OV secreted during VSV infection are enriched in immunity-related proteins. Finally, CD8⁺ T cells incubated with EVs-OV from infected cells display slightly enhanced cytotoxic functions. Taken together, these data suggest that OVs enhance the communication mediated by tumor EVs, which could participate to the therapeutic efficacy of OVs. These results also provide rationale for engineering OVs to exploit EVs and disseminate therapeutic proteins within the tumor microenvironment.

Introduction

Extracellular vesicles (EVs) are submicrometric particles secreted by all cell types that mediate intercellular communication. EVs are usually separated into different subtypes depending on their size: apoptotic bodies, large EVs and small EVs (sEVs).¹ The latter measure between 30 and 150 nm and can be further classified depending on their biogenesis pathway: exosomes correspond to EVs that are formed by inward budding of early endosomes, whereas ectosomes directly bud from the plasma membrane. sEVs are enriched in different protein markers such as tetraspanins (CD9, CD63, CD81), ALG-2 interacting protein (ALIX) or tumor susceptibility 101 (TSG101), although there is no universal marker identified so far. Even though it remains unclear whether tumor cells secrete more EVs than their healthy counterparts, plasmatic EV levels are correlated with tumor burden.^{2,3} Tumor-derived EVs are often linked to mechanisms promoting oncogenesis and tumor progression⁴⁻⁶. It has been shown that proteins and non-coding RNAs transported by EVs could impart oncogenic properties to other cells⁷. These EVs also act on fibroblasts and endothelial cells and promote their pro-tumor properties, including drug resistance and metastasis⁷⁻⁹. Factors delivered by tumor-derived EVs also modify the phenotypes and functions of immune cells, usually skewing them toward immunosuppression and promoting immune escape¹⁰⁻¹². On the contrary, they can also exhibit immunostimulatory properties by transferring tumor-associated antigens to^{13,14} or by activating cGAS/STING signaling in^{15,16} dendritic cells (DCs).

Oncolytic viruses (OVs) specifically replicate in tumors and lyse malignant cells, which commonly induces an anti-tumor immune response.^{17,18} Two OVs – both herpes simplex virus 1 (HSV-1) strains – are currently approved for clinical use. Talimogene laherparepvec (T-VEC) is approved by the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency for the treatment of unresectable metastatic melanoma,¹⁹ while G47 Δ recently obtained conditional approval in Japan for patients with glioblastoma after a successful phase II clinical trial.²⁰ Other viruses are currently evaluated in preclinical and clinical studies, such as the vesicular stomatitis virus (VSV), a member of the RNA virus *Rhabdoviridae* family, and the vaccinia virus (VACV), a member of the DNA virus *Poxviridae* family. There are several indications in the literature suggesting that EVs produced in the context of viral infections – including oncolytic infections – may impact the overall OV activity²¹. First, viruses generally increase EV secretion because of the cellular stress they induce,^{21,22} and OVs and EVs have been shown to interact together. Some studies report that oncolytic adenoviruses can be spontaneously packaged in tumor EVs,^{23,24} which could help virus propagation and promote a systemic therapeutic effect.

Others were able to mimic this phenomenon and achieved systemic delivery of EV-encapsulated OVs.²⁵⁻²⁷ Finally, it was demonstrated that viral products conveyed by EVs can achieve therapeutic activity. Labani-Motlagh *et al.* observed that tumor necrosis factor superfamily (TNFSF) proteins expressed by an engineered oncolytic adenovirus were present at the surface of EVs secreted by infected cells and could induce the maturation of DCs.²⁸ Wedge *et al.* recently reported that microRNA (miRNA) or short-hairpin RNA (shRNA) expressed by a recombinant VSV were transferred to uninfected tumor cells by EVs and could sensitize these cells to small molecule therapy and T cell killing.²⁹ These studies and others^{21,30} highlight that viruses and EVs are not completely distinct entities. Indeed, infected cells secrete vesicles which are similar to *bona fide* EVs but are also loaded with proteins or nucleic acids of viral origin. Since these hybrid particles cannot be separated from *bona fide* EVs, in the present manuscript we use the terms “EVs-VSV” and “EVs-VACV” to refer to the vesicular secretome of cells infected by VSV or VACV, respectively.

Even if previous work has shown that EVs can contribute to the dissemination of either OVs or their payloads, how EV-mediated intercellular communication is affected by oncolytic infection remains to be elucidated. Here, we sought to understand how infection of human melanoma and thoracic cancer cells by oncolytic VSV or VACV would modify the phenotype of tumor EVs and alter the functions of cells exposed to those. We found that the oncolytic infection of tumor cells tends to enhance the intercellular communication mediated by EVs, that VSV induces an enrichment of immunity-related proteins in EVs and that these can increase the cytotoxicity of anti-tumor human CD8⁺ T cells

Results

Tumor cells secrete more EVs when infected by OVs

To investigate how infection by OVs alters EV biogenesis, we used either VSV (Indiana strain) or VACV (Copenhagen strain) to infect human melanoma cell lines. EVs were purified from culture supernatants 16h after infection, before death of infected cells (Figures 1A & S1A-B) and during the exponential phase of viral transgene expression (Figures 1B & S1C). We first characterized the samples according to the recommendations of the International Society for Extracellular Vesicles.³¹ We validated the morphology of purified EVs by transmission electron microscopy (TEM) (Figure 1C) and found that the diameter of EVs-VSV is increased by about 25 % compared to EVs derived from uninfected cells (Figure 1D). Supernatants were filtered before ultracentrifugation to remove VACV particles³² but VSV was not completely eliminated.

Indeed, TEM analyses showed that bullet-shaped objects (corresponding to VSV virions) represented approximately 28 % of all observed objects (Figure S2A). Despite attempts to separate virions and EVs by flotation assay (Figure S2B-D) or size-exclusion chromatography (Figure S2 E-F), we could not eliminate all infectious particles from EV preparations, therefore this was taken into consideration for subsequent experiments. We observed that classical EV markers (ALIX, CD63 and CD81) are present in the preparations but not cellular Calnexin (Figure 1E). We then used single-EV flow cytometry (Figure 1F) to quantify EVs-OV secreted during infection. EVs-OV were stained for tetraspanins (CD9, CD63 or CD81) and we observed that cells infected by VSV – and to a lesser extent by VACV – produced more EVs-OV displaying at least one tetraspanin (Figure 1G). When analyzing equal volumes of EV preparations by western-blot (Figures 1H-I), we showed that the EV marker CD63 is enriched during OV infection, thus confirming the results obtained by flow cytometry.

Proteins encoded by OVs are packaged into EVs

Consistent with previous findings,²⁸ we found that the expression of OV-encoded transgenes is strong enough to allow spontaneous packaging of the recombinant proteins – here the green fluorescent protein (GFP) – with EVs (Figures 2A & S3A). To determine whether these recombinant proteins are located inside EVs or simply associated with the outer layer of the membrane, we performed experiments using a detergent to dissociate lipid membranes. We showed that GFP was only accessible after detergent treatment of EVs-VSV (Figure S3B), thus demonstrating that GFP was originally inside EVs-VSV. We extended these results by using a VSV coding for another protein, the NanoLuc (NLuc) luciferase. In a proteinase-protection assay, EVs-VSV secreted by a panel of human and murine tumor cells infected by this virus were treated with detergent, proteinase K or both (Figure 2B, Figure S2C). As expected, the combination of proteinase K and detergent was necessary to quench the luminescence from the EVs, meaning that the NanoLuc was originally located inside EVs-VSV. This demonstrates that proteins encoded by OVs are spontaneously loaded into EVs.

Since viral proteins could have an impact on the tropism of EVs produced by infected cells, we then wondered whether those were also present in EVs. Focusing on the glycoprotein of VSV (VSV-G), we observed by transmission electron microscopy that EVs produced by VSV-infected cells were coated with VSV-G (Figure 2C). Surprisingly, we also found that VSV virions were not only VSV-G⁺ but also exhibited CD63 staining (Figure 2D). To quantify this phenomenon, we performed single-EV flow cytometry experiments in which EVs-VSV were

stained for both tetraspanins (CD9/CD63/CD81) and VSV-G (Figures 2E-F and S4). We observed that close to 100 % of EVs-VSV were double positive, whereas EV preparations from uninfected cells or VACV-infected cells only stained positive for the tetraspanins. Overall, these results suggest that EVs-VSV present both viral and cellular markers on their surface, thus indicating that EVs-VSV may consist of a continuum of particles that share features of both virions and *bona fide* EVs.

Viral material enhances EV-mediated intercellular protein transfer

In physiological conditions, the transfer of functional intercellular EV cargo is a rare event.³³ To investigate whether OV infection modifies the internalization of EVs, we first infected melanoma cells expressing NLuc, purified EVs 16h after infection and added them onto recipient cells. After extensive washing to remove unbound EVs, we measured the luminescence, corrected by the input NLuc signal, to evaluate EV association with the target cells (Figure S5A). We observed an increase in luminescence when cells were incubated with EVs-VSV or EVs-VACV (Figure 3A), which suggests that OVs enhance the internalization of tumor EVs and the transfer of EV-carried cargos. This may be the consequence of the presence of viral proteins on the surface of EVs, at least for EVs-VSV, which facilitates their attachment and fusion, as it is well characterized for the glycoprotein VSV-G.^{34,35} To ensure that EVs have been internalized and have delivered their cargo to the cytosolic compartment of recipient cells, we used a Cre-mediated recombination assay⁸ where EVs containing Cre are incubated with cells able to switch from dsRed to GFP expression upon Cre delivery and recombination (Figure S5B). To assess how the presence of viral proteins could modify the cargo delivery of EVs without using replication-competent VSV, we pseudotyped Cre⁺ EVs with VSV-G (Figure 3B). As expected, Cre⁺ VSV-G⁺ EVs led to a substantial recombination among recipient lung adenocarcinoma (H441, H1975), mesothelioma (Meso34), melanoma (M113) cells, monocytes (THP-1) or fibroblasts (HFF2), whereas no GFP was detectable when Cre⁺ EVs without VSV-G were used (Figure 3C).

To study EV penetration in a 3D environment, we then formed multicellular tumor spheroids (MCTS) with reporter mesothelioma and lung adenocarcinoma cells. We observed that Cre⁺ VSV-G⁺ EVs enabled recombination and GFP expression in these MCTS (Figures 3D-E) and could deliver their content to areas located beyond the outer cell layers of the spheroids (Figures S5C-E). However, this was not observed for all tested cells lines and was not correlated to what was observed in 2D culture, which suggests that physical parameters may influence EV-

mediated transfer in this context. To mimic a simplified tumor microenvironment, we also used complex MCTS containing both tumor cells and surrogates of healthy cells. In MCTS containing both unlabeled Meso34 mesothelioma cells and dsRed/GFP reporter THP-1 monocytic cells, we observed up to 40 % of recombination among the latter (Figure 3F). VSV-G⁺ EVs appear to transfer their content more efficiently to THP-1 monocytes than HFF2 fibroblasts (Figure 3G). Altogether, our results suggest that VSV-G⁺ EVs from infected cells may be able to transfer their content more readily to uninfected cells, even in complex 3D environments, due to the presence of viral proteins on their surface.

Infection by VSV leads to the loading of immunity-related proteins in EVs

To understand how OV infections modify the overall protein content of EVs and potentially their release in recipient cells, we then performed a proteomics analysis of EVs from human melanoma cells (Table S1). To validate the purity of the samples, we first confirmed that most of the top 50 proteins commonly identified in the *Vesiclepedia* database³⁶ were enriched with satisfactory relative abundance scores (Figure 4A, Figure S6A). We observed that markers commonly enriched in sEVs budding directly from the plasma membrane (ectosomes)³⁷ were more abundant than markers associated with *bona fide* exosomes (Figure 4B). It is noteworthy that the infection had little effect on the balance between ectosomal and exosomal markers and that the EVs from the three conditions tested shared a large majority of the identified proteins (Figure 4C). As expected, we detected all five proteins encoded by the VSV genome but also identified 29 proteins encoded by the VACV genome (Table S1), indicating either that some virions were copurified with EVs despite filtration or that some viral proteins are packaged into EVs as shown in Figure 2. We found that EVs-VSV are enriched with proteins encoded by interferon (IFN)-stimulated genes (Figures 4D-E), which is consistent with an upregulation of the pathways related to the innate antiviral immune response in infected tumor cells. In contrast, EVs-VACV were not significantly enriched with immunity-related protein. Instead, enriched proteins were linked to intracellular trafficking and vesicular transport pathways (Figures 4E-F). For both viruses, the identified downregulated pathways were mostly related to cell cycle and mitosis (Figures S6B-C).

In addition to innate immunity proteins, we also identified proteins linked to the adaptive immune response in EVs-VSV (Figure 4D). Indeed, interesting hits from the proteomic analysis included the class-I presentation molecules human leukocyte antigen (HLA)-ABC and β 2-microglobulin, but also the melanoma antigen Melan-A. The loading of Melan-A in EVs-VSV

was validated by western-blot (Figure 4H) and we confirmed that EVs-VSV contained higher quantities of Melan-A compared to EVs from uninfected melanoma cells (Figure 4I). Similarly, we confirmed that molecules from the MHC class I complex were enriched in EVs-VSV and EVs-VACV purified from different tumor cell lines (Figures 4J-L). Overall, this proteomics analysis shows that EVs-VSV are enriched in immunity-related proteins, in comparison to EVs secreted by uninfected cells.

Tumor EVs secreted upon VSV infection partly enhance CD8⁺ T cell functions

To investigate then the effect of EVs from OV-infected tumor cells on immune cells, we used two human CD8⁺ T cell clones that are specific for a peptide derived from the tumor antigen Melan-A in the HLA-A*0201 context^{38,39}. The T cells were first incubated with EVs produced by melanoma cells before being cocultured with Melan-A⁺ target cells to evaluate their cytotoxic functions and phenotypic changes (Figure 5A). Viral titration of EV samples (Figure S7A) allowed us to estimate that T cells incubated with EVs-VSV were exposed to about 0.3 virion per cell in these series of experiments. However, it did not affect their viability (Figure S7B), nor did it lead to productive infection of T cells (Figure S7C).

We evaluated whether the cytotoxic properties of the two T cell clones WT4 and CTL03.1 were modified when they were exposed to EVs from either uninfected or OV-infected cells. As previously reported by our group,¹² EVs from uninfected melanoma cells decreased the effector functions of T cells, with a varying impact depending on the effector:target ratios that were used (Figure 5B). However, when incubated with EVs-VSV, and to a lesser extent to EVs-VACV with the CTL03.1 clone, both T cell clones exhibited restored cytotoxic capacities similar to those observed in the untreated condition. Accordingly, we observed that the T cell clones exposed to EVs-VSV secreted higher amounts of granzyme-B compared to T cells exposed to EVs from uninfected melanoma cells (Figure 5C) and a slight – though not significant – increase in the surface expression of the degranulation marker CD107a (Figure S7D). However, we did not detect any change in tumor necrosis factor (TNF) nor interferon gamma (IFN- γ) secretion following incubation of T cells with EVs (Figure S7E). Overall, our results show that EVs-VSV partly increase the cytotoxic properties of human CD8⁺ T cells and may potentiate their anti-tumor properties.

Discussion

In this study, we showed that OV infection of human tumor cell lines impacts EV biogenesis by increasing EV secretion and modifying their content. Our results suggest that the loading of viral proteins – either from the virus *per se* or from virus-encoded transgenes – may modify the properties of these EVs, in particular the efficacy of cargo transfer to uninfected cells. In addition, EVs-VSV are enriched in immunity-related proteins and were demonstrated to partly restore the cytotoxic functions of human Melan-A-restricted CD8⁺ T cell clones compared to EVs from uninfected tumor cells.

Our results broaden previous observations showing that products from oncolytic adenovirus transgenes can be packaged into vesicles²⁸ and indicate that this phenomenon is shared with other viruses and in different cancer types. Given that proteins that we detected in EVs do not contain EV-addressing sequences, it is likely that the EV content simply reflects the cellular expression of the viral transgenes. EVs are easily accessible in most bodily fluids and are thus explored as biomarkers to follow disease progression or response to treatment.^{40–42} If detection of viral products in EVs indeed reflects the cellular content of infected cells, isolation of EVs from peripheral blood followed by biochemical quantification of proteins expressed by OVs could serve as a biomarker and be an alternative to the detection of viral genome to monitor OV replication within the tumor. It could also provide useful information on the cellular response to OV infection, for instance regarding the innate immune response.

Intercellular protein transfer *via* EVs appears to be a rare event.^{33,34} We found that infection of tumor cells may alter this by (i) increasing EV secretion and (ii) modifying the content of EVs, especially with the presence of fusogenic viral glycoproteins that would help endosomal escape and cytoplasmic cargo delivery in recipient cells. This has been reported by others,^{34,35,43} but to our knowledge this is the first demonstration that fusogenic EVs can penetrate a 3D environment to deliver their cargo. In addition, our results on complex multicellular spheroids show that it is possible to deliver intracellular cargos to immune cells that can be found in tumors. Transgenic *in vivo* models allowing the monitoring of tumor EV dissemination at basal state and upon treatment could provide very useful information to understand how OVs may alter intercellular communication in the tumor microenvironment.

Our preliminary mass spectrometry proteomic analysis detected 47 of the 50 proteins identified in the *Vesiclepedia* database as most often associated with EVs. According to the proposed markers for exosomes and ectosomes,³⁷ OV infection does not seem to alter the ectosome/exosome ratio even though one could expect VSV to increase ectosome secretion by assembly of viral particles at the plasma membrane. Conversely, even though VACV did not

shift the ectosome/exosome ratio towards exosomes, mass spectrometry results seem to indicate that the viral exploitation of vesicular transport^{44,45} has repercussions on EV content. Among proteins enriched in EVs-VACV, we did not detect proteins involved in the type I IFN response, which could be explained by the ability of VACV to evade innate immune signaling.⁴⁶ Our results regarding the proteome of EVs-VSV matches previous work where the authors showed that glioblastoma secretome after infection by oncolytic HSV-1 is linked to the immune response.⁴⁷ However, the design of our study does not allow to determine whether the changes observed in the EV content reflect the cellular content or if the infection induces differential cargo loading during EV biogenesis. Nonetheless, our results suggest that EVs produced upon tumor infection by different OVs may present varying immunogenicity. Those may impact differently the surrounding environment and it remains to be determined how EV-based intercellular communication in this context could positively or negatively impact surrounding normal cells.

Indeed, tumor-derived EVs have been previously described to interfere with immune cell functions. Even though tumor EVs can transfer antigens or functional peptide/MHC complexes to immune cells,¹³ their content is usually described as immunosuppressive.^{5,12,48} In a model of coculture of T cells with tumor EVs, our group previously observed that EVs from uninfected melanoma cells inhibited T cell cytotoxicity.¹² Here, we report that EVs-VSV partly restore these cytotoxic functions, with an increase in both granzyme-B secretion and target cell lysis. It remains to be determined if this mechanism is related to proteins involved in the type I IFN response or other factors from innate immunity, or to antigen-specific mechanisms such as the EV-mediated presentation of functional MHC-peptide complexes to T cells. Upregulation of surface cellular MHC during OV infection is well-known⁴⁹ and our results indicate that this is reflected in EVs, which could theoretically favor EV-mediated antigen presentation. Another imaginable explanation is that EVs-OV transfer whole tumor antigens to T cells, which are then delivered to their cytoplasm and subsequently processed to be presented to other T cells. This hypothesis is supported by the loading of the antigen Melan-A in EVs-VSV and the presence of fusogenic viral protein on EVs-OV, but this will need to be confirmed experimentally. Finally, T cell activation may be mediated by non-protein effectors, such as miRNAs, which we did not explore in this study.

The effects of tumor EVs from OV-infected cells on other cell types will need to be explored further to better understand how OVs modulate the tumor microenvironment. As an example, it was demonstrated that VSV-G is a TLR4 agonist and induces type I IFN secretion by mouse

macrophages in a CD14-dependent, NF- κ B-independent manner.⁵⁰ Moreover, VSV-G⁺ EVs induce DC maturation and cross-presentation *in vivo*.⁵¹ Therefore, it is likely that tumor EVs from infected cells have immunostimulatory properties for myeloid cells, which would further boost the anti-tumor immune response *in vivo*. However, in this immunogenic context the release of viral antigens may also enhance the adaptive antiviral immune response and could thereby limit the efficacy of viral-based therapies. EVs from infected cells could also influence directly the viral susceptibility of other tumor cells. As an example, EVs from cells infected by an oncolytic Newcastle disease virus (NDV) carry miRNAs that inhibit the type I IFN response and facilitate NDV replication and spread⁵², but EVs can either promote or restrict infection depending on the context.²² How EVs influence the replication of other OVVs will have to be studied as this could ultimately help to design viruses which exploit the right mechanisms for optimal viral replication and proper immune activation.

There is a growing interest in the field of therapeutic vectorization using EVs. Our results, together with others, also provides rationale for engineering OVVs to exploit EVs and disseminate therapeutic proteins within the tumor microenvironment. Several articles have shown that biomolecules of interest (e.g. proteins, RNAs) can be targeted for loading into EVs, for instance by coupling them to tetraspanins⁵³, viral proteins^{35,54} or with membrane-addressing, palmitoylation sequences, as used in our experiments. This allows the transfer of therapeutic molecules to the cytoplasm or the nucleus of the targeted – and bystander – cells. These systems could easily be adapted to oncolytic viruses by inserting the retargeted sequences into their genomes²¹, which could result in a novel two-step vectorization approach based on both OVVs and EVs.

The presence of contaminant viral particles in EV preparations is a major concern when assessing their effects on immune cell functions. In this study, we were not able to completely eliminate VSV virions from EV preparations. Viral replication was not detected in T cells incubated with EVs-VSV but we cannot completely rule out a role of these contaminants in our functional experiments. Regarding the existing literature, it is important to note that virions and EVs from virus-infected cells must have been co-purified and that we need to be cautious when attributing certain functions to one or the other.^{47,55} This also makes it very difficult to evaluate the specific role of EVs-OV *in vivo*. Moreover, several of our experiments suggest that EVs-VSV consist of a continuum of particles that share protein markers from both *bona fide* EVs and virions, which again complexifies our understanding of the mechanisms at play.

Overall, our results suggest that part of the activity of OV_s could be mediated by a modification of the protein content of tumor EV_s, which could have an impact on the anti-tumor immune response and antiviral immunity. Having access to blood samples of clinical cohorts of patients treated with OV_s to observe the evolution of tumor EV content over time could help to better understand the mechanisms at play after actual OV treatments. Finally, our results advocate for the generation of recombinant OV_s that exploit the EV machinery to better disseminate therapeutic proteins within the tumor microenvironment and modulate the activity of its different components

Materials and methods

Plasmids and molecular biology

pMD2.G and psPAX2 were gifts from Didier Trono (Plasmids #12259 and #12260, Addgene, Watertown, MA). pUMVC was a gift from Bob Weinberg (Plasmid #8449, Addgene, Watertown, MA).⁵⁶ pLV-CMV-LoxP-DsRed-LoxP-eGFP was a gift from Jacco van Rheenen (Plasmid #65726, Addgene, Watertown, MA).⁸ AAV-GFP/Cre was a gift from Fred Gage (Plasmid #49056, Addgene, Watertown, MA).⁵⁷ pBS-N, pBS-P, pBS-L and pVSV-XN2 were gifts from Richard Vile (Mayo Clinic, Rochester, MN).

To obtain pcDNA3.1-Palm-Cre-HiBiT, a plasmid encoding Cre fused to a palmitoylation sequence to increase its loading in EV_s, Cre was amplified from AAV-GFP/Cre using fwCre_pcDNA-Palm and rvCre_pcDNA primers (Table 1) and cloned into the pcDNA3.1 backbone containing palmitoylation and HiBiT sequences (BamHI/NotI digestion followed by HiFi DNA assembly, New England Biolabs, Ipswich, MA). To obtain pMX2.1-NLuc, NLuc was amplified from pNL2.1[NLuc/Hygro] (Promega, Madison, WI) using fwNLuc_pMX and rvNLuc_pMX primers (Table 1) and cloned into the pMX2.1 backbone (EcoRI/HpaI digestion followed by HiFi DNA assembly).

Cell line generation and cell culture

Human melanoma cell lines (M6, M113, M117) were obtained from tumor biopsies (Biocollection PC-U892-NL, CHU Nantes, France). Human malignant pleural mesothelioma (Meso4, Meso34, Meso163) and human lung adenocarcinoma (ADCA153) cell lines were obtained from pleural effusions (Biocollection DC-2011-1399, CHU Nantes, France) and genetically characterized.⁵⁸ Murine mesothelioma AK7 cell line was obtained as previously described.⁵⁹ Other human lung adenocarcinoma (H441, H1975), fibroblasts (HFF-2) monocytes

(THP-1), mouse melanoma (B16/F1) and hamster BHK-21 cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (LGC Standards, Middlesex, United Kingdom). The Lenti-X™ 293T cell line was purchased from Takara (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France). M6-NLuc and M113-NLuc were obtained by retroviral transduction of pMX2.1-NLuc as previously described.⁶⁰ [H441, H1975, HFF-2, M113, Meso34 and THP-1]-loxP-dsRed-loxP-GFP were obtained by lentiviral transduction of pLV-CMV-LoxP-DsRed-LoxP-eGFP and cultured with 1 µg/mL puromycin until complete selection of transduced cells. Human tumor cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Eurobio, Les Ulis, France). Murine tumor cells, Lenti-X 293T, HFF-2 and BHK-21 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA). Both media were supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Corning, Corning, NY), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine (all from Gibco, Carlsbad, CA). For EV production experiments, medium was supplemented with EV-depleted FCS (100,000 × g, 16 h).

CTL03.1 and WT4 T cell clones were obtained as previously described.^{38,39} CTL03.1 and WT4 are CD8⁺ T cell clones specific for HLA-A*0201/Melan-A(26-35) (EAAGIGILTV). T cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 8 % UltraGRO (AventaCell, Atlanta, GA), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 150 U/mL interleukin-2 (IL-2) (Proleukin, Novartis, Basel, Switzerland). For experiments, T cells were cultured in medium supplemented with 50 U/mL IL-2.

For tumor spheroid formation, 20,000 [H441 or H1975]-loxP-dsRed-loxP-GFP cells were seeded in 96-well U bottom plates NUNCLON SPHERA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). For complex spheroids, 20,000 Meso34 cells were mixed with 10,000 [THP-1 or HFF-2]-loxP-dsRed-loxP-GFP cells in 96-well U bottom plates NUNCLON SPHERA. The plates were centrifuged 2 min at 800 × g and incubated for 3 days to allow spheroid formation.

All cells were cultured at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere and were routinely checked for mycoplasma contamination using Plasmotest (Invivogen, San Diego, CA).

Oncolytic viruses

Recombinant VSV encoding GFP (VSV-GFP) or NLuc (VSV-NLuc) between the *G* and *L* genes were generated from the wild-type Indiana strain by reverse genetics as previously described⁶¹. Briefly, BHK-21 cells were infected with vaccinia virus MVA-T7 (a gift from Dr John Bell, Ottawa Hospital Research Institute, Ottawa, Canada) at a multiplicity of infection

(MOI) = 1. Ninety minutes later, cells were transfected with pBS-N, pBS-P, pBS-L and either pVSV-GFP or pVSV-NLuc. Two days later, supernatant was filtered at 0.22 μm to remove contaminating MVA-T7 and added to new BHK-21 cells to confirm VSV rescue. After amplification, VSV was purified by ultracentrifugation of supernatant on a 10 % sucrose cushion ($100,000 \times g$, 1 h). Viral titers were determined by plaque assay on BHK-21 cells. Recombinant vaccinia virus was provided by Transgene SA (Illkirch-Graffenstaden, France). Briefly, it was derived from the Copenhagen strain deleted for *TK* and *RR* genes (VACV TK⁻RR⁻/GFP).⁶² VACV TK⁻RR⁻/GFP was propagated and titrated in chicken embryo fibroblasts, as previously described.⁶³

Analysis of viral infection, cell viability and cell death

For infection analysis, tumor cells were seeded at 7,000 cells per well in a 96-well plate and infected 3 days later with VSV-GFP or VACV-GFP (MOI 0.1 and 1). Plates were then cultured for 72h in an Incucyte S3 (Sartorius, Goettingen) with images taken every 4 hours for 3 days. Percentage of infection was determined with GFP expression by normalizing green integrated intensity with confluency (phase image).

Cell viability was determined using the CellTiter-Glo kit (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. Briefly, tumor cells were seeded at 7,000 cells per well in a 96-well plate and infected 3 days later with VSV-GFP or VACV-GFP (MOI 0.1 and 1). At 16h, 24h, 48h and 72h post-infection, the CellTiter-Glo reagent was added into the wells (volume 1:1 with supernatants). After a 10-minute incubation at 37°C, supernatants and lysed cells were transferred into a white-walled 96-well plate to measure luminescence with a Mithras LB 943 luminometer (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Germany).

Cell death was determined by staining of cells with Annexin-V. Briefly, tumor cells were seeded at 40,000 cells per well in a 24-well plate and infected 3 days later with VSV-GFP or VACV-GFP (MOI 0.1 and 1). Cells were exposed to UV-B (312 nm, 10 J/cm², Bio-Link, Vilber Lourmat) as a positive control. At 16h, 24h, 48h and 72h post-infection, the cells were recovered and stained with 1 μL of Annexin-V-APC (BD Biosciences, Pont De Claix, France) in binding buffer as recommended by the manufacturer. After a 15-minute incubation, cells were resuspended in fresh PBS and analyzed by flow cytometry (BD Accuri). Data were analyzed using the FlowJo 10 software (BD Biosciences, Pont De Claix, France).

EV production and isolation

For infection experiments, confluent tumor cells were infected at MOI = 0.1 (except M117, MOI = 0.05) and cultured in EV-depleted medium for 16 h. For transfection experiments, Lenti-X 293T cells were transfected with 1 µg DNA / million cells using Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Six hours after transfection, medium was replaced with EV-depleted medium for 36 h. Conditioned media were centrifuged to remove cells ($500 \times g$, 5 min), cell debris ($2,000 \times g$, 10 min), large vesicles ($10,000 \times g$, 30 min) and filtered at 0.22 µm before ultracentrifugation to pellet EVs ($100,000 \times g$, 2 h). Pellets were washed with 0.22 µm-filtered phosphate-buffer saline (PBS) and ultracentrifuged a second time ($100,000 \times g$, 2 h). EVs were resuspended in 100 µL of 0.22 µm filtered PBS and either used immediately or stored at -80 °C before use. Ultracentrifugation was performed using an Optima L-80XP ultracentrifuge equipped with a SW 32 Ti rotor and open-top thinwall polypropylene tubes (all from Beckman Coulter, Indianapolis, IN).

Transmission electron microscopy and immunogold labeling

EVs were fixed in 2 % paraformaldehyde (PFA) (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Copper grids coated with a carbon film were effluxed overnight. Ten µL of EVs were placed on the grid for 1.5 min before being quickly wiped on blotting paper. Negative staining was performed with 10 µL of uranyl acetate (Agar Scientific, Stansted, UK) for a few seconds before being wiped on blotting paper. This operation was repeated twice. The grid was dried for a few minutes and then imaged with a JEOL JEM-1400 Plus (120kV) transmission electron microscope (acquisition time = 1 s).

For immunogold labeling, formvar/carbon-coated nickel grids were deposited on a drop of samples during five minutes and rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS). Grids were then incubated on a drop of PBS supplemented with 1% Bovine Serum Albumine and then PBS containing 1:100 anti-VSV-G and 1:100 anti-CD63 antibodies (antibody references in Table S2). After six 5-minute washes with PBS, grids were further incubated for 1 hour on a drop of PBS containing 1:30 gold-conjugated (6 nm) goat-anti-Rabbit IgG and 1:30 gold-conjugated (10nm) goat-anti-Mouse (Aurion, Wageningen, Netherlands). Grids were then washed with six drops of PBS, post-fixed in 1% glutaraldehyde and rinsed with three drops of distilled water. The negative staining was then performed with three consecutive contrasting steps using 2% uranyl acetate (Agar Scientific, Stansted, UK) before analysis under the transmission electron microscope (JEOL 1011, Tokyo, Japan).

Flow cytometry analysis of EVs

EVs were stained for 30 minutes at 4 °C with a mix of anti-tetraspanin (CD9, CD63 and CD81) antibodies or corresponding control isotypes conjugated to allophycocyanin (APC) (antibody references in Table S2). In some experiments, EVs were also stained with an anti-VSV-G antibody labeled with DyLight450 using a DyLight 405 Conjugation Kit (Abcam, Paris, France) according to the manufacturer's instructions. To remove aggregates, antibodies were centrifuged at $15,000 \times g$ for 3 min before staining. EVs were then analyzed using an Attune NXT flow cytometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Western-blot

Samples were lysed with radio immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), incubated for 30 min at 4 °C and centrifuged at $16,000 \times g$ for 30 min to pellet debris. Protein concentration was determined by bicinchoninic acid assay (BCA, Interchim, Los Angeles, CA) according to the manufacturer's instructions. Unless otherwise indicated, equal amounts of proteins were mixed with Laemmli buffer (Bio-Rad, Hercules, CA) and heated at 95 °C for 5 min. Proteins were separated on 4-20 % Bis-Tris gels (Genscript, Leiden, Netherlands) at 200 V for 40 min and transferred onto PVDF membranes (Millipore, Burlington, MA) at 100 V for 60 min. For immunoblots, membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) 0.05 % Tween-20, 5 % fat-free milk for 1 h at room temperature and incubated overnight at 4 °C with antibodies of interest (Table S3). Membranes were then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Table S3) for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated with Clarity western blotting substrate (Bio-Rad, Hercules, CA) and imaged with a ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA). For detection of the HiBiT tag, the Nano-Glo HiBiT Blotting System (Promega, Madison, WI) was used and membranes were processed according to the manufacturer's instructions.

Biochemical assays

Proteinase protection assay

EVs were diluted in PBS or Nano-Glo Luciferase Assay Buffer (Promega, Madison, WI) and incubated with 22 $\mu\text{g/mL}$ proteinase K (Macherey-Nagel, Düren, Germany) for 20 min at 37°C. Nano-Glo Luciferase Assay Substrate (Promega, Madison, WI) was added according to the manufacturer's instructions and luminescence was acquired using a Mithras LB 943

luminometer (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Germany) with an acquisition time of 1 s.

EV internalization assay

NLuc⁺ EVs secreted by M113-NLuc were incubated with parental M113 for 4 h at 37 °C. To remove unbound EVs, recipient cells were incubated in 0.05 % trypsin-EDTA (Gibco, Carlsbad, CA) for 20 min at 37 °C and washed twice with PBS. Nano-Glo Luciferase Assay Substrate (Promega, Madison, WI) was added according to the manufacturer's instructions and luminescence was acquired using a Mithras LB 943 luminometer (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Germany) with an acquisition time of 1 s. In parallel, luminescence of EVs used as input was measured in the same conditions and was used to normalize the luminescence of recipient cells.

Cre recombination assay

Transduced recipient cells were seeded as monolayers or spheroids and treated with a dose of Cre⁺ or Cre⁺ VSV-G⁺ EVs equivalent to a 10:1 secreting transfected cell:recipient tumor cell ratio. Cells were incubated for 3 days to allow for DNA recombination and GFP expression. For monolayer experiments, recipient cells were trypsinized, washed twice with PBS and analyzed using a FACSymphony A5 flow cytometer (BD Biosciences, Pont de Claix, France). For 3D experiments, spheroids were washed twice with PBS, fixed in PBS 4 % PFA (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) for 30 min at room temperature, washed twice with PBS and incubated for 24 h in PBS 0.5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) with 5 µg/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). One day before observations, spheroids were cleared with Rapiclear 1.47 (Sunjin Lab, Hsinchu City, Taiwan) and mounted onto 15-well 3D µ-Slide (Ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) pre-coated with 25 µg/mL Cell-Tak cell and tissue adhesive (Corning, Corning, NY). Spheroids were imaged using a Nikon A1rHD LFOV confocal microscope equipped with a 25x/1.05 oil immersion objective (Nikon Instruments, Tokyo, Japan). Pinhole size was set to 1 AU (15 µm), and Z-interval between two slices was set to 2 µm. Images were processed and analyzed using Fiji.⁶⁴ GFP⁺ and dsRed⁺ areas of each slice were segmented using the "Auto Threshold" plugin. The "Try all" option was first selected to empirically determine the optimal segmentation method. Images were subsequently analyzed with the following settings: "method=MaxEntropy white use_stack_histogram".

Protein mass spectrometry

Liquid digestion of proteins

EVs were lysed with RIPA buffer (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) and protein concentration was determined by BCA (Interchim, Los Angeles, CA) according to the manufacturer's instructions. Proteins were first precipitated with ice-cold acetone for 1 h at -20 °C. After centrifugation at 4 °C for 15 min at 15,000 × g, the protein pellets were prepared using the PreOmics iST kit (PreOmics GmbH, Planegg, Germany) following the manufacturer's instructions. Briefly, samples were thawed and lysed (denatured, reduced and alkylated) for 10 min at 95 °C then Trypsin/LysC digested for 3 h at 37 °C. Purification of peptides was then carried out at room temperature on spin cartridge and peptides were finally eluted in 10 µL of LC-load buffer. Peptide concentration were determined using the Pierce colorimetric quantitative peptide assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and 300 ng were injected into the TimsTOF Pro mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

Data acquisition by nanoLC-MS/MS

Data acquisition by nanoLC-MS/MS was performed as previously described.⁶⁵ Briefly, the resulting peptide mixtures were separated on a 75 µm × 250 mm C18 IonOpticks Aurora 2 column (Ion Opticks Pty Ltd., Bundoora, Australia) with a NanoElute HPLC system (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) at a flow rate of 400 nL/min at 50 °C. The separation was performed with a buffer gradient (buffer A: 0.1 % formic acid, 98 % H₂O MilliQ, 2 % acetonitrile; buffer B: 0.1 % formic acid, 100 % acetonitrile) for 120 min (2 % to 15 % buffer B for 60 min; up to 25 % at 90 min; up to 37 % at 100 min; up to 95 % at 110 min and finally 95 % for 10 min to wash the column). The column was coupled in-line to a timsTOF Pro (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) with a CaptiveSpray ion source (Bruker Daltonik). LC-MS/MS data were acquired by the PASEF method⁶⁶ with a total cycle time of 1.31 s, comprising 1 TIMS MS scan and 10 PASEF MS/MS scans. The 10 PASEF scans (100 ms each) contained, on average, 12 MS/MS scans per PASEF scan.

Protein identification

Mass spectrometry data were processed with the Data Analysis 5.1 software to produce the peak list of MS and MS/MS spectra (.mgf file). Peptide and protein identification was then performed using the Mascot database search engine (Mascot server v2.6.2; <http://www.matrixscience.com>) using its automatic decoy database search to calculate a false

discovery rate (FDR) as previously described. MS/MS spectra were simultaneously compared to the UniProt KB UP000005640 version of November 17, 2021 human proteome database restricted to one protein sequence per gene (20,588 sequences), to a viral proteome database (UP000002327 version of March 24, 2021 VSV proteome database + UP000008269 version of March 24, 2021 VACV proteome database; 263 sequences) and to a common proteomic contaminant database from the Max Planck Institute of Biochemistry (Martinsried, Germany) (247 sequences). The mass tolerance for MS and MS/MS was set at 15 pmm and 0.05 Da. The enzyme was set to full trypsin with allowed miscleavage. The modifications are fixed carbamidomethylation of cysteines, variable oxidation of methionine, variable acetylation of lysine and N-terminal proteins, and variable deamidation of asparagine and glutamine. Identification results from Mascot (.dat files) were imported into the Proline Studio software v2.1.2⁶⁶. This software was then used to validate the identification of proteins with a peptide rank = 1, an FDR of 1 % on the peptide spectra match (PSM) score and peptides with a minimum score of 30 ($-10 \cdot \text{LOG}_{10}(P)$, where P is the absolute probability).

Relative quantification and pathway enrichment analysis

Proline Studio software was also used to the spectral count comparison of the identified proteins in each samples as previously described.⁶⁷ For each protein, a weighted spectral count is calculated, as suggested in Abacus,⁶⁸ where shared peptides are combined and weighted according to the specific spectral counts of the different Protein Sets sharing the same peptide(s). To detect significant difference between samples, a beta-binomial test was performed on these weighed spectral counts and a *p*-value was calculated for each Protein Set using the R package BetaBinomial 1.2 implemented in Proline Studio.⁶⁹ Proteins that satisfied the following conditions were considered significantly enriched: adjusted *p*-value < 0.05 and fold-change > 2. The Venn diagram was generated with the DeepVenn online tool.⁷⁰ The enrichment analysis of Gene Ontology Biological Process pathways was performed in STRING (v11.0b)⁷¹ using the list of proteins significantly enriched in VSV or VACV samples as an input and with “Whole Genome” as statistical background. The fold enrichment of each pathway was calculated using this formula: Fold-enrichment = Number of observed proteins annotated to the pathway / Number of proteins expected to be observed in a random list of the same size.

T cell functional experiments

T cell clones were incubated with a dose of EVs equivalent to a 10:1 secreting tumor cell:recipient T cell ratio for 24 h at 37 °C. T cells were washed once with PBS, viable cells were numerated with a NucleoCounter NC-3000 (Chemometec, Allerød, Denmark) and used for subsequent functional experiments.

ELISA assay

Spontaneous granzyme-B secretion was measured in the supernatant of WT4 cells after 24 h of incubation with EVs using an ELISA granzyme-B kit (R&D systems, Minneapolis, MN). Absorbance values at 450 nm and 570 nm were read using a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and concentrations were calculated according to the manufacturer's instructions.

Cytotoxicity assay

T cell clones (CTL03.1 or WT4) were cocultured with target cells (M113-NLuc) for 6 h at different effector:target ratios (20:1 and 40:1 for CTL03.1; 5:1 and 10:1 for WT4). Specific lysis was validated by coculture of T cell clones with a non-HLA-A*0201 cell line (M6-NLuc). NLuc released in the supernatant was used as a readout for cytotoxicity. After incubation with the Nano-Glo Luciferase Assay Substrate (Promega, Madison, WI) for 10 min at RT under agitation, supernatants were analyzed using a Mithras LB 943 luminometer (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Germany). Cytotoxicity was calculated using this formula:
$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{[\text{NLuc release (RLU)} - \text{Spontaneous NLuc release (RLU)}] * 100}{[\text{Maximum NLuc release (RLU)} - \text{Spontaneous NLuc release (RLU)}]}$$
 Spontaneous NLuc release was obtained by analyzing supernatant of target cells cultured alone. Maximum NLuc release was obtained by adding 100 µg/mL digitonin (Promega, Madison, WI) to target cells cultured alone.

CD107a surface expression assay

WT4 cells were cocultured with target cells (M113) for 2 h at a 2:1 effector:target ratio in presence of 5 µM monensin (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) and 8 µg/mL Alexa Fluor 647-conjugated anti-CD107a antibody (clone H4A3, Biolegend, San Diego, CA). Cells were harvested, washed once with PBS, stained with 0.125 µg/mL R-phycoerythrin conjugated anti-CD8 antibody (clone HIT8a, BD Biosciences, Pont de Claix, France) for 30 min at 4 °C, and analyzed using an Accuri C6+ flow cytometer (BD Biosciences, Pont de Claix, France).

Statistical methods

Unless stated otherwise, data are represented as the mean \pm standard deviation (SD) of biological replicates. For EV diameter measurement, statistical significance was determined using a t-test. For all other experiments, when comparing 3 or more groups, statistical significance was determined using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. When comparing two groups, statistical significance was determined using the one-tailed Mann-Whitney test. * p -value \leq 0.05; ** p -value \leq 0.01; **** p -value \leq 0.0001. Statistical analyses were performed using Prism 8.0 (GraphPad Software, Boston, MA).

Data availability statement

Liquid-based mass-spectrometry results are available online (Table S1). Other raw data and materials can be made available upon reasonable request to the corresponding author.

Acknowledgments

This work was performed with financial support from ITMO Cancer of Aviesan on funds administered by Inserm, the French National Research Agency (ANR-20-CE18-0009), "La Ligue Régionale Grand-Ouest Contre le Cancer (CSIRGO)" and the ARSMESO44 foundation. The authors thank the cluster LUNG innOvatiOn (LUNG O2) for logistic support. This work was also supported by grants from Biogenouest, Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (IBISA) and Conseil Régional de Bretagne awarded to CP. We acknowledge the following core facilities for their technical expertise and help: IBISA MicroPICell facility (Biogenouest), member of the national infrastructure France-Bioimaging supported by the French national research agency (ANR-10-INBS-04); Cytocell - Flow Cytometry and FACS core facility (SFR Bonamy, BioCore, Inserm UMS 016, CNRS UAR 3556, Nantes, France), member of the Scientific Interest Group (GIS) Biogenouest and the Labex IGO program supported by the French National Research Agency (n°ANR-11-LABX-0016-01); Imp@ct core facility (SFR bonamy, Nantes Université, CNRS, Inserm, Nantes, France), member of the Scientific Interest Group Biogenouest; IBISA electron microscopy core facility (PST Analyse des systèmes biologiques, Université de Tours, Tours, France). We thank John Bell for providing MVA-T7. We thank Richard Vile for providing plasmids used for VSV rescue. We thank Virginie

Dehame, Jérôme Samain and Emma Soussens for their technical help. Schematics were created with Biorender.

Author contributions

Conceptualization: U.H., T.P., N.B.; Funding acquisition: N.B., D.F., T.P., J.-F.F.; Investigation: U.H., C.G., M.K., M.F., J.F., B.A., E.C., G.C., J.B-G, T.P., N.B.; Supervision: J.-F.F., N.B., D.F., P.E., N.L., C.P.; Writing – original draft: U.H.; Writing – review & editing: J.-F.F., N.B.

All authors have read and approved the manuscript.

Declaration of interests

P.E. is an employee of Transgene SA. Transgene SA is a member of the Institut Merieux Group, a publicly traded French biopharmaceutical company. The authors report no other conflicts of interest.

Keywords

Oncolytic viruses; extracellular vesicles; vesicular stomatitis virus; vaccinia virus; T cell; intercellular communication

References

1. van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>.
2. Osti, D., Del Bene, M., Rappa, G., Santos, M., Matafora, V., Richichi, C., Faletti, S., Beznoussenko, G.V., Mironov, A., Bachi, A., et al. (2019). Clinical Significance of Extracellular Vesicles in Plasma from Glioblastoma Patients. *Clin. Cancer Res.* *25*, 266–276. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1941>.
3. Sabbagh, Q., André-Grégoire, G., Alves-Nicolau, C., Dupont, A., Bidère, N., Jouglar, E., Guével, L., Frénel, J.-S., and Gavard, J. (2021). The von Willebrand factor stamps plasmatic extracellular vesicles from glioblastoma patients. *Sci. Rep.* *11*, 22792. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02254-7>.

4. Tian, W., Liu, S., and Li, B. (2019). Potential Role of Exosomes in Cancer Metastasis. *BioMed Res. Int.* 2019, 4649705. <https://doi.org/10.1155/2019/4649705>.
5. Marar, C., Starich, B., and Wirtz, D. (2021). Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression. *Nat. Immunol.* 22, 560–570. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00899-0>.
6. Wang, X., Tian, L., Lu, J., and Ng, I.O.-L. (2022). Exosomes and cancer - Diagnostic and prognostic biomarkers and therapeutic vehicle. *Oncogenesis* 11, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41389-022-00431-5>.
7. Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., et al. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>.
8. Zomer, A., Maynard, C., Verweij, F.J., Kamermans, A., Schäfer, R., Beerling, E., Schiffelers, R.M., de Wit, E., Berenguer, J., Ellenbroek, S.I.J., et al. (2015). In Vivo Imaging Reveals Extracellular Vesicle-Mediated Phenocopying of Metastatic Behavior. *Cell* 161, 1046–1057. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.042>.
9. Costa-Silva, B., Aiello, N.M., Ocean, A.J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B.K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M.T., Molina, H., et al. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* 17, 816–826. <https://doi.org/10.1038/ncb3169>.
10. Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., et al. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* 18, 883–891. <https://doi.org/10.1038/nm.2753>.
11. Capello, M., Vykoukal, J.V., Katayama, H., Bantis, L.E., Wang, H., Kundnani, D.L., Aguilar-Bonavides, C., Aguilar, M., Tripathi, S.C., Dhillon, D.S., et al. (2019). Exosomes harbor B cell targets in pancreatic adenocarcinoma and exert decoy function against complement-mediated cytotoxicity. *Nat. Commun.* 10, 254. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08109-6>.
12. Vignard, V., Labbé, M., Marec, N., André-Grégoire, G., Jouand, N., Fonteneau, J.-F., Labarrière, N., and Fradin, D. (2019). MicroRNAs in Tumor Exosomes Drive Immune Escape in Melanoma. *Cancer Immunol. Res.* <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0522>.
13. Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., et al. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* 7, 297–303. <https://doi.org/10.1038/85438>.
14. Rughetti, A., Rahimi, H., Belleudi, F., Napoletano, C., Battisti, F., Zizzari, I.G., Antonilli, M., Bellati, F., Wandall, H.H., Benedetti Panici, P., et al. (2014). Microvesicle Cargo of Tumor-Associated MUC1 to Dendritic Cells Allows Cross-presentation and Specific Carbohydrate

- Processing. *Cancer Immunol. Res.* *2*, 177–186. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0112-T>.
15. Kitai, Y., Kawasaki, T., Sueyoshi, T., Kobiyama, K., Ishii, K.J., Zou, J., Akira, S., Matsuda, T., and Kawai, T. (2017). DNA-Containing Exosomes Derived from Cancer Cells Treated with Topotecan Activate a STING-Dependent Pathway and Reinforce Antitumor Immunity. *J. Immunol.* *198*, 1649–1659. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601694>.
 16. Zhang, H., Tang, K., Zhang, Y., Ma, R., Ma, J., Li, Y., Luo, S., Liang, X., Ji, T., Gu, Z., et al. (2015). Cell-free Tumor Microparticle Vaccines Stimulate Dendritic Cells via cGAS/STING Signaling. *Cancer Immunol. Res.* *3*, 196–205. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0177>.
 17. Kaufman, H.L., Kohlhapp, F.J., and Zloza, A. (2015). Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 642–662. <https://doi.org/10.1038/nrd4663>.
 18. Bommareddy, P.K., Shettigar, M., and Kaufman, H.L. (2018). Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*, *1*. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0014-6>.
 19. Andtbacka, R.H.I., Kaufman, H.L., Collichio, F., Amatruda, T., Senzer, N., Chesney, J., Delman, K.A., Spitler, L.E., Puzanov, I., Agarwala, S.S., et al. (2015). Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol.* *33*, 2780–2788. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3377>.
 20. Todo, T., Ito, H., Ino, Y., Ohtsu, H., Ota, Y., Shibahara, J., and Tanaka, M. (2022). Intratumoral oncolytic herpes virus G47 Δ for residual or recurrent glioblastoma: a phase 2 trial. *Nat. Med.* *28*, 1630–1639. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01897-x>.
 21. Moulin, C., Crupi, M.J.F., Ilkow, C.S., Bell, J.C., and Boulton, S. (2023). Extracellular Vesicles and Viruses: Two Intertwined Entities. *Int. J. Mol. Sci.* *24*, 1036. <https://doi.org/10.3390/ijms24021036>.
 22. Raab-Traub, N., and Dittmer, D.P. (2017). Viral effects on the content and function of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* *15*, 559–572. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.60>.
 23. Saari, H., Turunen, T., Löhmus, A., Turunen, M., Jalasvuori, M., Butcher, S.J., Ylä-Herttuala, S., Viitala, T., Cerullo, V., Siljander, P.R.M., et al. (2020). Extracellular vesicles provide a capsid-free vector for oncolytic adenoviral DNA delivery. *J. Extracell. Vesicles* *9*, 1747206. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1747206>.
 24. Kakiuchi, Y., Kuroda, S., Kanaya, N., Kumon, K., Tsumura, T., Hashimoto, M., Yagi, C., Sugimoto, R., Hamada, Y., Kikuchi, S., et al. (2021). Local oncolytic adenovirotherapy produces an abscopal effect via tumor-derived extracellular vesicles. *Mol. Ther.*, S1525001621002677. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.05.015>.

25. Garofalo, M., Villa, A., Rizzi, N., Kuryk, L., Mazzaferro, V., and Ciana, P. (2018). Systemic Administration and Targeted Delivery of Immunogenic Oncolytic Adenovirus Encapsulated in Extracellular Vesicles for Cancer Therapies. *Viruses* *10*, 558. <https://doi.org/10.3390/v10100558>.
26. Garofalo, M., Villa, A., Rizzi, N., Kuryk, L., Rinner, B., Cerullo, V., Yliperttula, M., Mazzaferro, V., and Ciana, P. (2019). Extracellular vesicles enhance the targeted delivery of immunogenic oncolytic adenovirus and paclitaxel in immunocompetent mice. *J. Controlled Release* *294*, 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.022>.
27. Zhang, Y., Wu, J., Zhang, H., Wei, J., and Wu, J. (2020). Extracellular Vesicles-Mimetic Encapsulation Improves Oncolytic Viro-Immunotherapy in Tumors With Low Coxsackie and Adenovirus Receptor. *Front. Bioeng. Biotechnol.* *8*, 574007. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.574007>.
28. Labani-Motlagh, A., Naseri, S., Wenthe, J., Eriksson, E., and Loskog, A. (2021). Systemic immunity upon local oncolytic virotherapy armed with immunostimulatory genes may be supported by tumor-derived exosomes. *Mol. Ther. - Oncolytics* *20*, 508–518. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.02.007>.
29. Wedge, M.-E., Jennings, V.A., Crupi, M.J.F., Poutou, J., Jamieson, T., Pelin, A., Pugliese, G., de Souza, C.T., Petryk, J., Laight, B.J., et al. (2022). Virally programmed extracellular vesicles sensitize cancer cells to oncolytic virus and small molecule therapy. *Nat. Commun.* *13*, 1898. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29526-8>.
30. Nolte-'t Hoen, E., Cremer, T., Gallo, R.C., and Margolis, L.B. (2016). Extracellular vesicles and viruses: Are they close relatives? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 9155–9161. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605146113>.
31. Théry, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., Alcaraz, M.J., Anderson, J.D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G.K., et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* *7*, 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.
32. Tang, V.A., Renner, T.M., Varette, O., Le Boeuf, F., Wang, J., Diallo, J.-S., Bell, J.C., and Langlois, M.-A. (2016). Single-particle characterization of oncolytic vaccinia virus by flow virometry. *Vaccine* *34*, 5082–5089. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.074>.
33. Bonsergent, E., Grisard, E., Buchrieser, J., Schwartz, O., Théry, C., and Lavieu, G. (2021). Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells. *Nat. Commun.* *12*, 1864. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22126-y>.
34. Somiya, M., and Kuroda, S. (2021). Real-Time Luminescence Assay for Cytoplasmic Cargo Delivery of Extracellular Vesicles. *Anal. Chem.*, *acs.analchem.1c00339*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00339>.

35. Zhang, X., Xu, Q., Zi, Z., Liu, Z., Wan, C., Crisman, L., Shen, J., and Liu, X. (2020). Programmable Extracellular Vesicles for Macromolecule Delivery and Genome Modifications. *Dev. Cell* 55, 784-801.e9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.11.007>.
36. Kalra, H., Simpson, R.J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V.C., Borràs, F.E., Breakefield, X., Budnik, V., et al. (2012). Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* 10, e1001450. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450>.
37. Mathieu, M., Névo, N., Jouve, M., Valenzuela, J.I., Maurin, M., Verweij, F.J., Palmulli, R., Lankar, D., Dingli, F., Loew, D., et al. (2021). Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nat. Commun.* 12, 4389. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24384-2>.
38. Vignard, V., Lemercier, B., Lim, A., Pandolfino, M.-C., Guilloux, Y., Khammari, A., Rabu, C., Echasserieau, K., Lang, F., Gougeon, M.-L., et al. (2005). Adoptive Transfer of Tumor-Reactive Melan-A-Specific CTL Clones in Melanoma Patients Is Followed by Increased Frequencies of Additional Melan-A-Specific T Cells. *J. Immunol.* 175, 4797–4805. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4797>.
39. Marotte, L., Simon, S., Vignard, V., Dupre, E., Gantier, M., Cruard, J., Alberge, J.-B., Hussong, M., Deleine, C., Heslan, J.-M., et al. (2020). Increased antitumor efficacy of PD-1-deficient melanoma-specific human lymphocytes. *J. Immunother. Cancer* 8, e000311. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000311>.
40. Chen, G., Huang, A.C., Zhang, W., Zhang, G., Wu, M., Xu, W., Yu, Z., Yang, J., Wang, B., Sun, H., et al. (2018). Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 560, 382–386. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0392-8>.
41. Shah, R., Patel, T., and Freedman, J.E. (2018). Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. *N. Engl. J. Med.* 379, 958–966. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1704286>.
42. Zhou, E., Li, Y., Wu, F., Guo, M., Xu, J., Wang, S., Tan, Q., Ma, P., Song, S., and Jin, Y. (2021). Circulating extracellular vesicles are effective biomarkers for predicting response to cancer therapy. *EBioMedicine* 67, 103365. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103365>.
43. Somiya, M., and Kuroda, S. (2021). Reporter gene assay for membrane fusion of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles* 10, e12171. <https://doi.org/10.1002/jev2.12171>.
44. Risco, C., Rodríguez, J.R., López-Iglesias, C., Carrascosa, J.L., Esteban, M., and Rodríguez, D. (2002). Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment Membranes and Vimentin Filaments Participate in Vaccinia Virus Assembly. *J. Virol.* 76, 1839–1855. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.4.1839-1855.2002>.

45. Husain, M., and Moss, B. (2002). Similarities in the induction of post-Golgi vesicles by the vaccinia virus F13L protein and phospholipase D. *J. Virol.* *76*, 7777–7789. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.15.7777-7789.2002>.
46. Smith, G.L., Talbot-Cooper, C., and Lu, Y. (2018). How Does Vaccinia Virus Interfere With Interferon? *Adv. Virus Res.* *100*, 355–378. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.01.003>.
47. Godlewski, J., Farhath, M., Ricklefs, F.L., Passaro, C., Kiel, K., Nakashima, H., Chiocca, E.A., and Bronisz, A. (2021). Oncolytic Virus Therapy Alters the Secretome of Targeted Glioblastoma Cells. *Cancers* *13*, 1287. <https://doi.org/10.3390/cancers13061287>.
48. Daassi, D., Mahoney, K.M., and Freeman, G.J. (2020). The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. *Nat. Rev. Immunol.* *20*, 209–215. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0264-y>.
49. Gujar, S.A., and Lee, P.W.K. (2014). Oncolytic virus-mediated reversal of impaired tumor antigen presentation. *Front. Oncol.* *4*, 77. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00077>.
50. Georgel, P., Jiang, Z., Kunz, S., Janssen, E., Mols, J., Hoebe, K., Bahram, S., Oldstone, M.B.A., and Beutler, B. (2007). Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Virology* *362*, 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.12.032>.
51. Kim, G.B., Nam, G.-H., Hong, Y., Woo, J., Cho, Y., Kwon, I.C., Yang, Y., and Kim, I.-S. (2020). Xenogenization of tumor cells by fusogenic exosomes in tumor microenvironment ignites and propagates antitumor immunity. *Sci. Adv.* *6*, eaaz2083. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz2083>.
52. Zhou, C., Tan, L., Sun, Y., Qiu, X., Meng, C., Liao, Y., Song, C., Liu, W., Nair, V., and Ding, C. (2019). Exosomes Carry microRNAs into Neighboring Cells to Promote Diffusive Infection of Newcastle Disease Virus. *Viruses* *11*, 527. <https://doi.org/10.3390/v11060527>.
53. Bui, S., Dancourt, J., and Lavieu, G. (2023). Virus-Free Method to Control and Enhance Extracellular Vesicle Cargo Loading and Delivery. *ACS Appl. Bio Mater.* *6*, 1081–1091. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00955>.
54. Ferrantelli, F., Arenaccio, C., Manfredi, F., Olivetta, E., Chiozzini, C., Leone, P., Percario, Z., Ascione, A., Flego, M., Bonito, P.D., et al. (2019). <p>The Intracellular Delivery Of Anti-HPV16 E7 scFvs Through Engineered Extracellular Vesicles Inhibits The Proliferation Of HPV-Infected Cells</p>. *Int. J. Nanomedicine* *14*, 8755–8768. <https://doi.org/10.2147/IJN.S209366>.
55. Moerdyk-Schauwecker, M., Hwang, S.-I., and Grzelishvili, V.Z. (2009). Analysis of virion associated host proteins in vesicular stomatitis virus using a proteomics approach. *Virol. J.* *6*, 166. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-166>.

56. Stewart, S.A., Dykxhoorn, D.M., Palliser, D., Mizuno, H., Yu, E.Y., An, D.S., Sabatini, D.M., Chen, I.S.Y., Hahn, W.C., Sharp, P.A., et al. (2003). Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA N. Y. N* 9, 493–501. <https://doi.org/10.1261/rna.2192803>.
57. Kaspar, B.K., Vissel, B., Bengoechea, T., Crone, S., Randolph-Moore, L., Muller, R., Brandon, E.P., Schaffer, D., Verma, I.M., Lee, K.-F., et al. (2002). Adeno-associated virus effectively mediates conditional gene modification in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2320–2325. <https://doi.org/10.1073/pnas.042678699>.
58. Gueugnon, F., Leclercq, S., Blanquart, C., Sagan, C., Cellerin, L., Padiou, M., Perigaud, C., Scherpereel, A., and Gregoire, M. (2011). Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am. J. Pathol.* 178, 1033–1042. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.014>.
59. Cordier Kellerman, L., Valeyrie, L., Fernandez, N., Opolon, P., Sabourin, J.-C., Maubec, E., Le Roy, P., Kane, A., Legrand, A., Abina, M.A., et al. (2003). Regression of AK7 malignant mesothelioma established in immunocompetent mice following intratumoral gene transfer of interferon gamma. *Cancer Gene Ther.* 10, 481–490. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700594>.
60. Autin, P., Deshayes, S., Lea, J., Boisgerault, N., Dupré, E., Labarrière, N., Leguevel, R., Fonteneau, J.-F., Blanquart, C., and Fradin, D. (2022). The DCMU Herbicide Shapes T-cell Functions By Modulating Micro-RNA Expression Profiles. *Front. Immunol.* 13.
61. Lawson, N.D., Stillman, E.A., Whitt, M.A., and Rose, J.K. (1995). Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4477–4481. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4477>.
62. Béguin, J., Foloppe, J., Maurey, C., Laloy, E., Hortelano, J., Nourtier, V., Pichon, C., Cochin, S., Cordier, P., Huet, H., et al. (2020). Preclinical Evaluation of the Oncolytic Vaccinia Virus TG6002 by Translational Research on Canine Breast Cancer. *Mol. Ther. - Oncolytics* 19, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.08.020>.
63. Foloppe, J., Kempf, J., Futin, N., Kintz, J., Cordier, P., Pichon, C., Findeli, A., Vorburger, F., Quemeneur, E., and Erbs, P. (2019). The Enhanced Tumor Specificity of TG6002, an Armed Oncolytic Vaccinia Virus Deleted in Two Genes Involved in Nucleotide Metabolism. *Mol. Ther. Oncolytics* 14, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.03.005>.
64. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
65. Girard, O., Lavigne, R., Chevolleau, S., Onfray, C., Com, E., Schmit, P.-O., Chapelle, M., Fréour, T., Lane, L., David, L., et al. (2023). Naive Pluripotent and Trophoblastic Stem Cell Lines as a Model for Detecting Missing Proteins in the Context of the Chromosome-Centric

- Human Proteome Project. *J. Proteome Res.* 22, 1148–1158.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00496>.
66. Bouyssié, D., Hesse, A.-M., Mouton-Barbosa, E., Rompais, M., Macron, C., Carapito, C., Gonzalez de Peredo, A., Couté, Y., Dupierris, V., Burel, A., et al. (2020). Proline: an efficient and user-friendly software suite for large-scale proteomics. *Bioinformatics* 36, 3148–3155.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa118>.
 67. Simoes Eugénio, M., Faurez, F., Kara-Ali, G.H., Lagarrigue, M., Uhart, P., Bonnet, M.C., Gallais, I., Com, E., Pineau, C., Samson, M., et al. (2021). TRIM21, a New Component of the TRAIL-Induced Endogenous Necrosome Complex. *Front. Mol. Biosci.* 8, 645134.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.645134>.
 68. Fermin, D., Basrur, V., Yocum, A.K., and Nesvizhskii, A.I. (2011). Abacus: a computational tool for extracting and pre-processing spectral count data for label-free quantitative proteomic analysis. *Proteomics* 11, 1340–1345. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000650>.
 69. Pham, T.V., Piersma, S.R., Warmoes, M., and Jimenez, C.R. (2010). On the beta-binomial model for analysis of spectral count data in label-free tandem mass spectrometry-based proteomics. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 363–369. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp677>.
 70. Hulsén, T. (2022). DeepVenn -- a web application for the creation of area-proportional Venn diagrams using the deep learning framework Tensorflow.js. Preprint at arXiv, <https://doi.org/10.48550/arXiv.2210.04597> <https://doi.org/10.48550/arXiv.2210.04597>.
 71. Szklarczyk, D., Gable, A.L., Nastou, K.C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N.T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., et al. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* 49, D605–D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>.

Figures

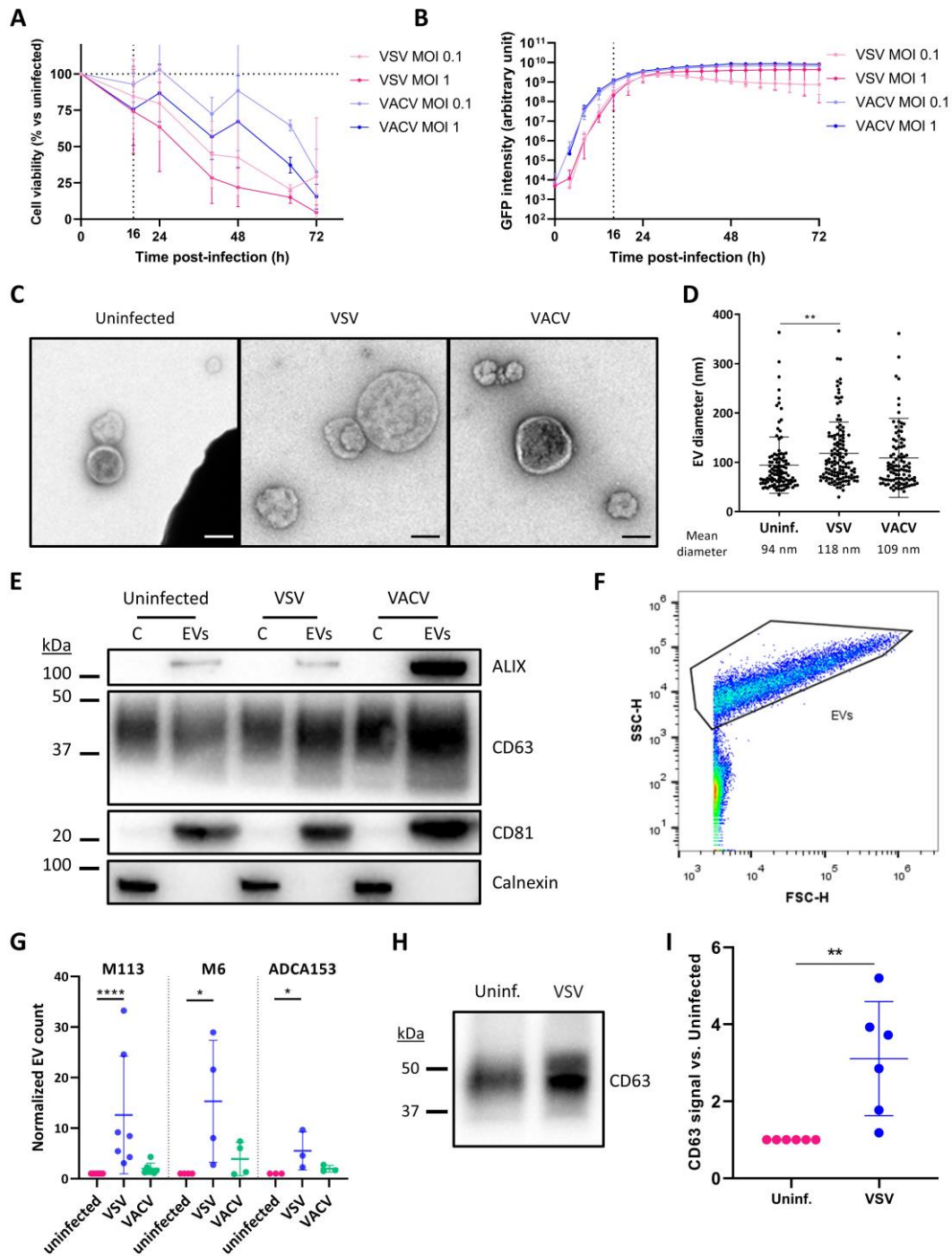


Figure 1. Tumor cells secrete more extracellular vesicles upon oncolytic virus infection.

(A-B) M113 melanoma cells were infected by VSV-GFP or VACV-GFP at MOI = 0.1 or 1. Cell viability (A) and expression of the viral transgene (B) were measured over time. Dotted lines indicate when EVs were harvested in subsequent experiments. Data are presented as mean (SD). $n = 3$ to 4 biological replicates. (C) Representative transmission electron micrographs of

EVs secreted by uninfected, VSV-infected or VACV-infected M113 melanoma cells. Scale bar represents 100 nm. (D) Diameter of EV-shaped particles identified by transmission electron microscopy. Data are represented as mean (SD). $n = 103$ to 124 single EVs per condition. ** p -value = 0.0032 (Kruskal-Wallis test) (E) Western-blot analysis of EV (ALIX, CD81, CD63) or cellular (Calnexin) markers expression in cell lysates (C) or corresponding EV lysates (EVs) from uninfected, VSV-infected or VACV-infected M113 cells. Three μg of proteins were loaded in each lane. Representative of 5 independent experiments. (F-G) Single-EV flow cytometry analysis of EVs stained for tetraspanins (CD9/CD81/CD63). (F) EVs were gated based on the forward and side scatter parameters. (G) Relative quantification of CD9/CD63/CD81⁺ EVs secreted by M113, M6 melanoma or ADCA153 lung adenocarcinoma cells. Data are presented as mean (SD). $n \geq 3$ biological replicates. **** p -value < 0.0001 , * p -value = 0.0199 and 0.0189 for M6 and ADCA153, respectively (Kruskal-Wallis test). (H-I) Western-blot analysis of EVs secreted by tumor cells, with equal volumes ($10\mu\text{L}$) of EV lysates from uninfected or VSV-infected cells loaded in both lanes. Representative of 6 biological replicates. (I) Quantification of the CD63 signal on 6 biological replicates. Data are presented as mean (SD). ** p -value = 0.0022 (Mann-Whitney test).

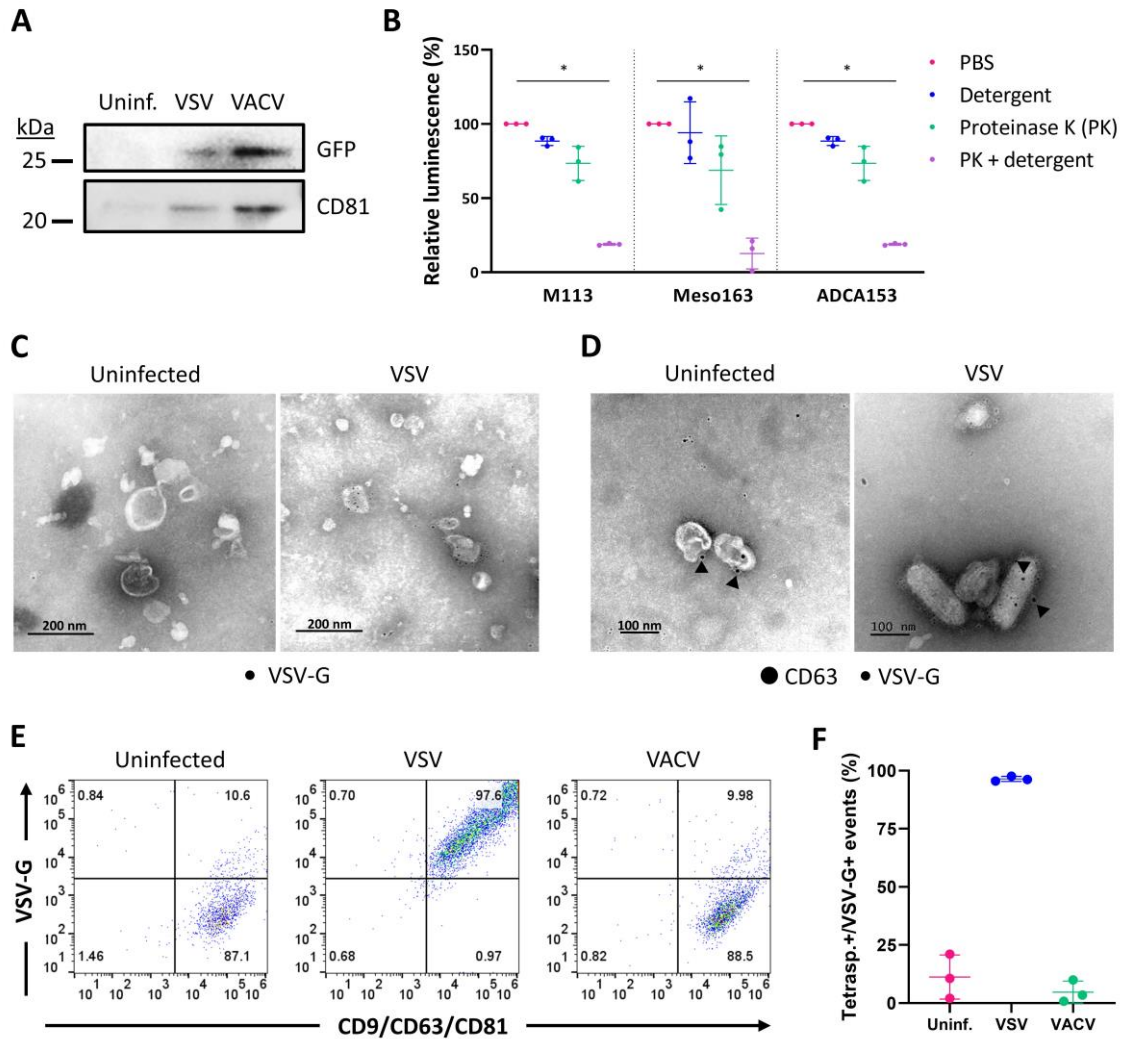


Figure 2. Tumor EVs spontaneously package proteins of viral origin.

(A) Western-blot analysis of GFP and CD81 in EVs secreted by M113 cells infected by GFP-encoding VSV or VACV. Representative of 3 biological replicates. (B) Proteinase protection assay of EVs secreted by M113, Meso163 or ADCA153 cells infected by VSV-NLuc. EVs were incubated with either detergent, proteinase K or both before adding the NLuc substrate. Data are presented as mean (SD). $n = 3$ biological replicates. * p -value = 0.0125, 0.0372 and 0.0125 for M113, Meso163 and ADCA153, respectively (Kruskal-Wallis test). (C-D) Representative transmission electron micrographs of EVs secreted by uninfected or VSV-infected M113 cells and labeled with (C) an anti-VSV-G antibody coupled to 6-nm gold particles or (D) anti-CD63 (10-nm gold particles) antibodies and anti-VSV-G (6nm gold particles). Arrows indicate CD63 staining. (E) Single-EV flow cytometry analysis (CD9/CD63/CD81 and VSV-G) of EVs secreted by uninfected, VSV-infected or VACV-

infected M113 cells. (F) Relative quantification of CD9/CD63/CD81/VSV-G⁺ EVs secreted by M113 cells. Data are presented as mean (SD). n = 3 biological replicates.

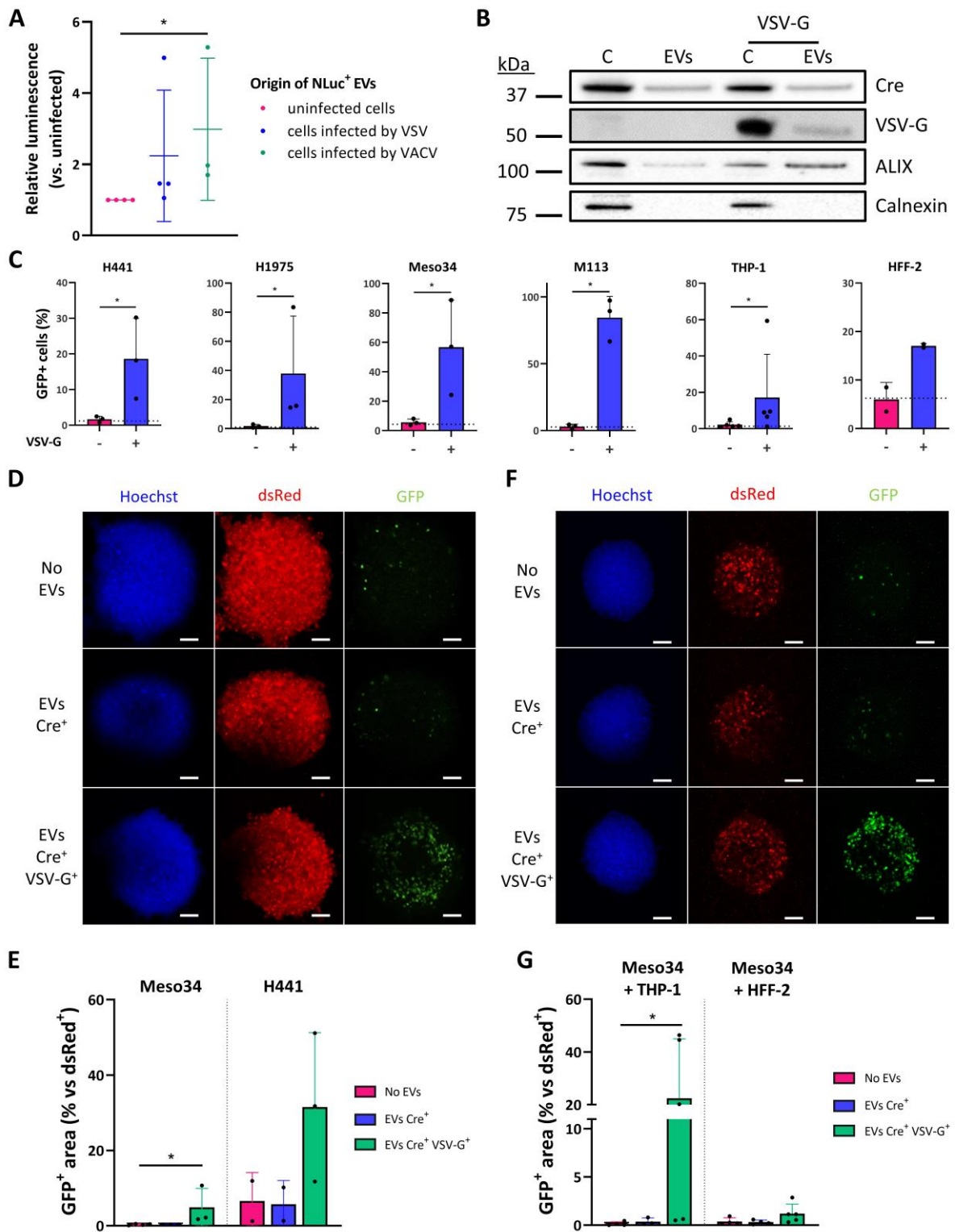


Figure 3. Viral material enhances EV-mediated intercellular protein transfer.

(A) EVs secreted by uninfected, VSV-infected or VACV-infected M113-NLuc cells were incubated for 4h with parental M113 cells. EV internalization by recipient cells was measured by analyzing luminescence of target cells, normalized with input EV luminescence. Data are

presented as mean (SD). $n = 3$ or 4 biological replicates. * p -value = 0.0115 (Kruskal-Wallis test). (B-C) EVs of Lenti-X 293T cells transfected to express Cre \pm VSV-G were incubated with tumor cells transduced to express GFP upon Cre recombination. (B) Western-blot analysis of Cre, VSV-G, ALIX and Calnexin in purified EVs from transfected HEK cells. Three μg of proteins were loaded in each lane. Representative of 2 independent experiments. (C) Flow cytometry analysis of recipient cells incubated with Cre⁺ or Cre⁺ VSV-G⁺ EVs. The dotted lines indicate the background percentage of recipient cells expressing GFP. Data are presented as mean (SD). $n = 2$ to 4 biological replicates. * p -value = 0.05 for H441, H1975, Meso34, M113, HFF-2 and 0.0476 for THP-1 (Mann-Whitney test). (D) Confocal micrographs of tumor spheroids (loxP-dsRed/GFP-loxP H441 cells) incubated with mock, Cre⁺ or Cre⁺ VSV-G⁺ EVs. Images represent the maximum intensity Z-projections of all imaged slices. Scale bar represents $100 \mu\text{m}$. (E) Quantification of the GFP⁺ area in tumor spheroids (loxP-dsRed/GFP-loxP Meso34 or H441 cells from (D)). Data are represented as the ratio of GFP⁺ area over dsRed⁺ area within the same spheroid. $n = 2$ to 4 spheroids imaged per condition. * p -value = 0.0495 (Kruskal-Wallis test). (F) Confocal micrographs of MCTS (unlabeled Meso34 cells + loxP-dsRed/GFP-loxP THP-1 cells) incubated with mock, Cre⁺ or Cre⁺ VSV-G⁺ EVs. Images represent the maximum intensity Z-projections of all imaged slices. Scale bar represents $100 \mu\text{m}$. (G) Quantification of the GFP⁺ area in tumor spheroids (unlabeled Meso34 + loxP-dsRed/GFP-loxP THP-1 or HFF-2 cells from (F)). Data are represented as the ratio of GFP⁺ area over dsRed⁺ area within the same spheroid. $n = 3$ to 5 spheroids imaged per condition. * p -value = 0.0426 (Kruskal-Wallis test).

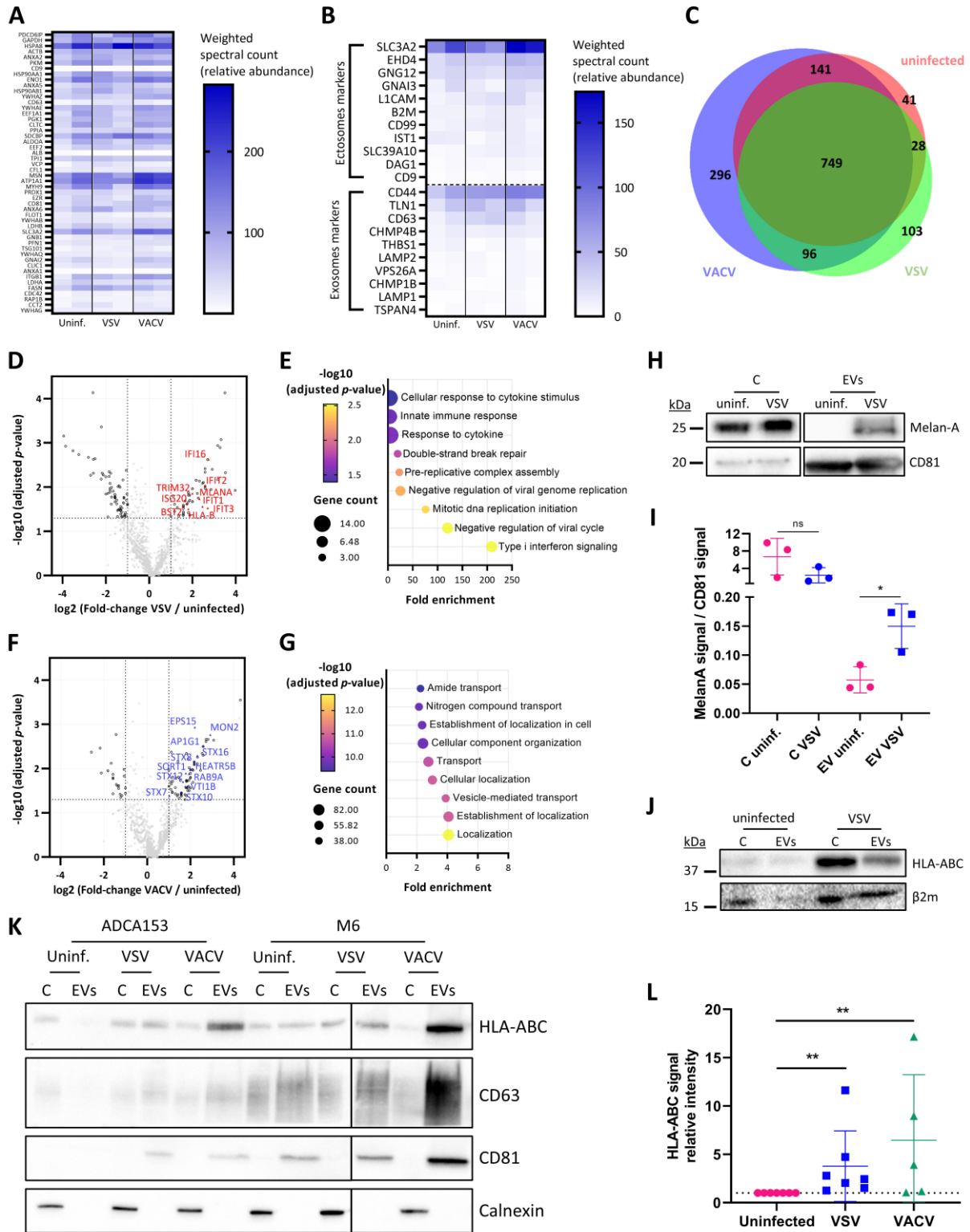


Figure 4. Exploratory mass spectrometry screen identifies immunity-related proteins in EVs secreted by VSV-infected tumor cells.

Liquid chromatography mass spectrometry-based proteome analysis of EVs secreted by M113 cells. n = 2 biological replicates. (A-B) Relative quantification of proteins most commonly

identified in Vesiclepedia³⁶ (A) or annotated as ectosomes or exosomes markers³⁷ (B). (C) Venn diagram of the identified proteins. (D) Volcano plot of proteins significantly enriched or depleted in EVs-VSV. Proteins encoded by interferon-stimulated genes are highlighted in red. (E) Significantly enriched Gene Ontology (GO) biological pathways in EVs-VSV. (F) Volcano plot of proteins significantly enriched or depleted in EVs-VACV. Proteins involved in endosomal transport are highlighted in blue. (G) Significantly enriched GO biological pathways in EVs-VACV. (H-I) Western-blot validation of the enrichment of the melanoma antigen Melan-A in EVs-VSV secreted by M113 cells. (H) Representative experiment of 3 biological replicates. (I) Relative quantification of the Melan-A signal / CD81 signal in cell lysates (C) or EVs. $n = 3$ biological replicates. * p -value = 0.05. (J-L) Western blot validation of the enrichment of MHC class I molecules in EVs-VSV or EVs-VACV. (J) Detection of HLA-ABC and β 2-microglobulin in EVs from uninfected and VSV-infected M113 cells. Three μ g of proteins were loaded in each lane. Representative of 3 biological replicates. (K) Detection of HLA-ABC, CD63, CD81 and Calnexin in EVs from uninfected and VSV-infected M6 or ADCA153 cells. Three μ g of proteins were loaded in each lane. Representative of 3 biological replicates. (L) Relative quantification of the HLA-ABC signal in EVs-VSV and EVs-VACV from different cell lines compared to EVs from uninfected cells. $n = 5$ to 7 biological replicates. ** p -value = 0.0039 and 0.084 for EVs-VSV and EVs-VACV, respectively (Kruskal-Wallis test).

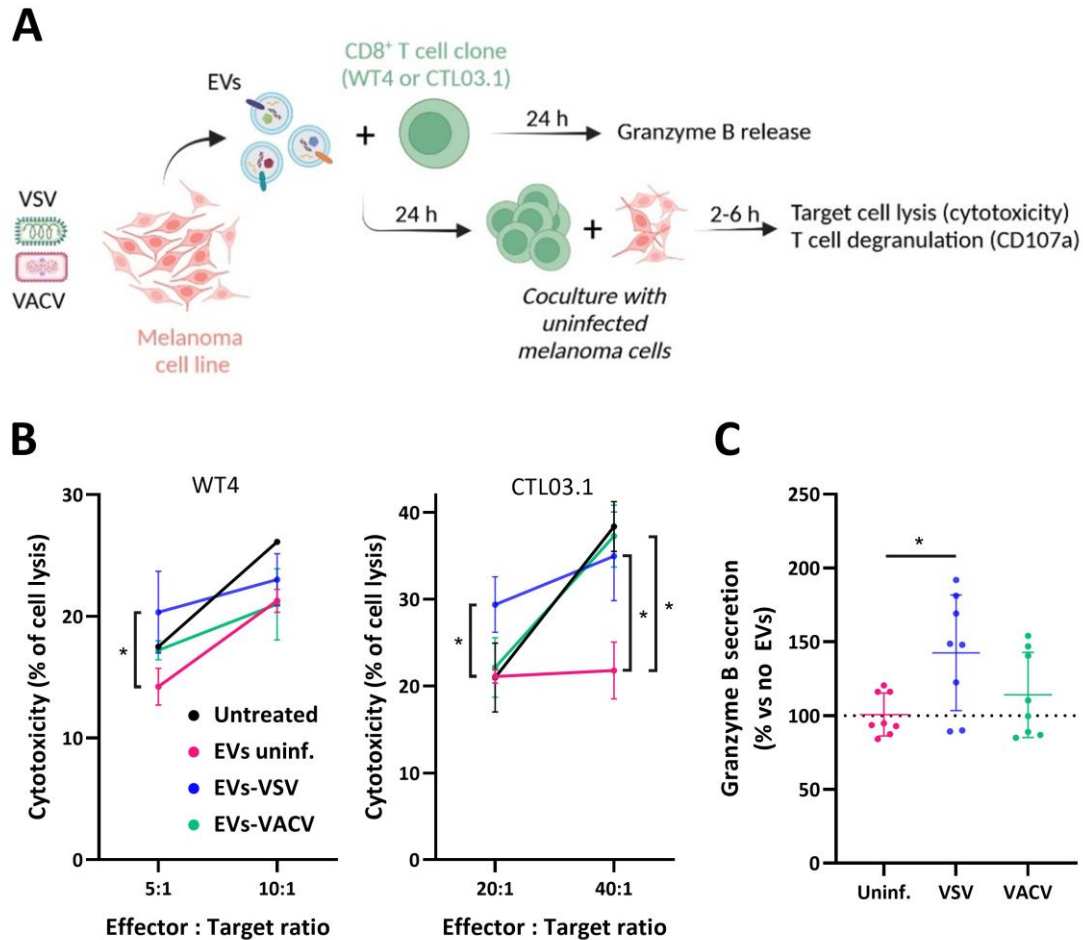


Figure 5. EVs secreted by OV-infected tumor cells partly enhance the cytotoxicity of anti-tumor CD8⁺ T cell clones.

(A) EVs secreted by M113 cells were incubated with the WT4 or CTL03.1 CD8⁺ T cell clones. Supernatants from the coculture were collected, and T cells were incubated with M113 target cells to assess their functions. All data are represented as mean (SD). (B) Cytotoxicity of T cells (clones WT4 and CTL03.1) measured by NLuc release from target M113-NLuc cells. $n = 3$ biological replicates. * p -value = 0.05 (Mann-Whitney test). (C) ELISA analysis of granzyme-B secretion induced by EV incubation, normalized to the spontaneous granzyme-B secretion by T cells that were not incubated with EVs. $n = 4$ to 8 biological replicates. * p -value = 0.0176 (Mann-Whitney test).

Tables

Table 1. List of primers used for plasmid cloning.

Primer name	Primer sequence
fwCre_pcDN A-Palm	5'-GCTCCGGAGGAGGAGGATCCtccaatttactgaccg-3'
rvCre_pcDN A	5'-CCAGGCGCTCGCGGCCGCatcgccatcttccagcagGCGC-3'
fwNLuc_pM X	5'- CAGTGTGGTGGTACGGGAATTCATGGTCTTCACACTCGAAGATT TCG-3'
rvNLuc_pM X	5'- AATCTGGCTAGCTTAACAATTGCTAGTTAACTTACGCCAGAATG CGTTCGC-3'

Secretomes from non-small cell lung cancer cells induce endothelial plasticity through a partial endothelial-to-mesenchymal transition

Clara Bourreau^{1,2}, Marine Cotinat², Morgane Krejbich², François Guillonnet^{2,3}, Catherine Guette^{2,3}, Alice Boissard³, Cécile Henry³, Lucas Treps², Nicolas Clere¹

¹Univ Angers, Inserm, CNRS, MINT, SFR ICAT, F-49000 Angers, France

²Nantes Université, Université d'Angers, CHU Nantes, Inserm, CNRS, CRCI2NA, F-44000 Nantes - France

³Institut de Cancérologie de l'Ouest, F-49055 Angers, France

Corresponding author

Nicolas CLERE – Pharm D., Ph D
UMR Inserm 1066 – CNRS 6021
IBS – IRIS
CHU
4 rue Larrey
F-49933 ANGERS Cedex 22

nicolas.clere@univ-angers.fr

Short running title: Tumor secretome leads to endothelial plasticity

Condensed abstract

- Secretome from non-small cell lung cancer induces partial endothelial-to-mesenchymal transition
- Proteomic analysis identified protein signatures involved in matrix remodeling and the endothelial-to-mesenchymal transition

Abstract

The tumor microenvironment (TME) of non-small cell lung cancer (NSCLC) is highly heterogeneous and is involved in tumorigenesis and resistance to therapy. Among the cells of the TME, endothelial cells are associated with the latter processes through endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT). During EndMT, endothelial cells (ECs) progressively lose their endothelial phenotype in favor of a mesenchymal phenotype, which favors the production of cancer-associated fibroblasts. Our study aimed to investigate the consequences of exposure to different lung tumor secretomes on EC phenotype and plasticity. Conditioned media (CM) were prepared from the tumor cell lines A549, H1755, H23, H1437 and H1975. Proliferation and migration of endothelial cells treated with these CMs were assessed by Cyquant® and Incucyte® technologies, respectively. The angiogenic capacity of ECs was assessed by following tubulogenesis on Matrigel®. Phenotypic changes in treated ECs were detected by flow cytometry. Morphological analysis of actin fibers was performed by immunohistochemistry, while proteomic analysis by mass spectrometry was used to identify the protein content of secretomes. A change of the endothelial phenotype was found when HUVECs were treated with different CMs. This phenotypic change was associated with a morphological change, an increase in both stress fiber expression and spontaneous migration. Furthermore, an increase in mesenchymal markers (α -SMA and CD44) confirmed the phenotypic changes. However, the secretomes did not modify the rate of double-labelled cells (vWF^+/α -SMA⁺ or CD31⁺/CD44⁺). Proteomic analysis identified potential targets involved in the EndMT with therapeutic relevance. Taken together, these data suggest that CMs can induce partial EndMT.

Keywords: Non-small cell lung cancer, endothelial-to-mesenchymal transition, secretome, endothelial cell plasticity

Introduction

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common lung cancer which accounts for 85% of all lung cancers^{1,2}. Despite therapeutic advances, NSCLC has a poor prognosis with a 5-year survival rate of 15% owing to treatment resistance and tumor progression³. NSCLC is characterized by a heterogeneous tumor microenvironment (TME). During the last decade, the implication of the TME has been recognized as a main actor in tumor progression, aggressiveness and as a source of drug resistance⁴. This TME includes endothelial cells (ECs), cancer-associated fibroblasts (CAFs), a characteristic extracellular matrix (ECM), neuronal cells as well as infiltrating immune cells⁵.

ECs are one of the main actors in angiogenesis, which is defined as the formation of new vessels from pre-existing networks^{6,7} of. This pathophysiological process is essential for tumor growth, migration, invasion of tumor cells and metastatic dissemination. Largely exposed to cues from the TME, ECs can undergo various phenotypic changes among which the endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT)^{8,9,10}. The EndMT is a cell differentiation process that potentiates the acquisition of mesenchymal-like properties with a reduced cell proliferation, morphological alterations (spindle shape and appearance of stress fibers, decrease of cell-cell adhesion and polarity), enhanced migration, and increased mesenchymal markers including α -SMA (α -smooth muscle actin), CD44, N-cadherin or fibronectin^{9,11,12}. In addition, EndMT-transiting cells exhibit a decrease of endothelial markers such as VEGFR2, vonWillebrand Factor (vWF) and CD31, and an impaired tube formation capacity¹³. Ultimately, the EndMT is believed to increase the invasive and metastatic dissemination properties of tumor cells through the conversion of ECs into CAFs^{14,15}. Despite this well-established process, a partial EndMT has been reported, with transiting ECs expressing a mixed phenotype¹⁶. Because of their great plasticity, the EndMT phenomenon can be

reversible or can only partially take place, resulting in the temporary and reversible appearance of cells with an intermediate phenotype that concomitantly displays endothelial and mesenchymal characteristics^{16,17}. In addition, various studies are beginning to highlight the involvement of partial EndMT in angiogenesis and that a disruption in its program could thus contribute to the abnormal and pathological growth of blood vessels^{18,19}.

In lung, while EndoMT has been mostly studied in fibrosis, its characterization in NSCLC is still in its infancy^{20,21}. The aim of this study was to demonstrate how the secretome of different NSCLC tumor lines can influence EC plasticity, particularly about the EndMT.

Materials and methods

Cell culture and treatment

NSCLC cell lines were obtained from the ATCC (LGC Standards): NCI-H1755 [H1755], A549 - CCL-185, NCI-H23 [H23] - CRL-5800, NCI-H1437 [H1437] - CRL-5872, NCI-H1975 [H1975] - CRL-5908. They were grown in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum complemented (SVF_d), 2 nM L-glutamin and 1% streptomycin/penicillin (PS).

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained from LONZA (C2519A) and cultured in Endothelial Cell Growth Medium-2 medium supplemented with fetal bovine serum (0.02 mL/mL), and different growth factors. Cells were cultured at 37°C and 5% CO₂. HUVECs were used between the first and sixth passage.

Conditioned media (CM) were produced from the different NSCLC lines. To ensure reproducibility, a specific cell number was seeded for every type of tumor cell line, so that 70-90% of confluence is reached at the end of the experiment. Half-diluted NSCLC CM with completed EGM-2 medium was used to treat ECs. HUVECs were treated by CM for 48 and 72 hours.

Combination of TGF- β 2 (130-123-657; Milteny®) (10 ng/mL) and IL-1 (130-093-897; Milteny®) (10 ng/mL) was used as EndMT positive control.

Viability assay

HUVECs were cultured in 96-well plates at 5,000 cells/well. After treatment, medium was replaced by 50 μ L EGM-2 completed with 50 μ L CellTiter-Glo® (Promega®). After shaking, the plate was incubated at room temperature for 10 minutes and luminescence was read with CLARIOstar® equipment.

Immunofluorescence

HUVECs were cultured in 24-well plates at 15,000 cells/well on gelatin-coated glass coverslips. After treatment, the medium was removed, and cells were washed with 1X PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 minutes. Cells were permeabilized with 0.5% triton + 2% BSA for 2 hours. Cells were, first, incubated with vWF antibody (ab6994; Abcam®) and then, with the secondary antibody anti-rabbit Alexafluor 647 (A21245; Thermo Fisher Scientific®). Moreover, cells were treated with phalloïdin 488 (A12379; Invitrogen®) and Hoechst 33342 (14533; Sigma aldrich®). Observations were realized with a confocal microscope using 60X magnification. Three pictures/well were analyzed using Fiji/ImageJ software.

Proliferation assay

HUVECs were cultured in 96-well plates at 5,000 cells/well. After treatment, medium was removed and 50 μ L of Cyquant® probe (C35006; Thermo Scientific®) were added in each well.

After an incubation for 45 minutes at 37°C and 5% CO₂, the plate was read with a spectrophotometer (SpectroMax M2) at 485 nm excitation and 530 nm emission.

Sprouting assay

HUVECs were cultured in 6-well plates at 120,000 cells/well for the condition “48 hours” and 100,000 cells/well for the condition “72 hours”. After treatment, 40 μ L of ECM gel (Corning®) was plated and 15,000 cells/well were seeded. The sprouting was allowed to proceed for 6 hours. Formation of sprouting networks was observed with a micropatterning microscope using 4X magnification. Three pictures/well were analyzed using ImageJ software with the angiogenesis analyzer plugin developed by Carpentier *et al.*²².

Migration

HUVECs were cultured in 6-well plates at 120,000 cells/well for the condition “48 hours” and 100,000 cells/well for the condition “72 hours”. After incubation, 4,000 cells/well were seeded with their respective treatment and placed in the IncuCyte® at 37°C and 5% CO₂. The migration was observed with IncuCyte® microscope using 10X magnification. The migration was allowed for 24 hours with 5 pictures/well every hour. Pictures were analyzed using Fiji/ImageJ software.

Flow cytometry

HUVECs were cultured in 6-well plates at 120,000 cells/well for the condition “48 hours” and 100,000 cells/well for the condition “72 hours”. After treatment, cells were fixed with 2% PFA +1X PBS solution and then permeabilized with a 0.1% Tween20 +1X PBS. Cells were incubated with AlexaFluor488 conjugated anti-vWF (ab195028; Abcam®) and APC conjugated anti- α -SMA

(IC1420A; R&D Systems®), or PE conjugated anti-CD31(FAB3567P; R&D Systems®) and APC conjugated anti-CD44 (338806; Biolegend®) antibodies for 30 minutes at room temperature. Analysis was conducted with BD FACS Canto™ II equipment (Biosciences®), and measurements were processed with FlowJo® V10 software.

Secretome proteomic analysis

1. Digestions and LC-MS/MS analyses were performed at the Prot'ICO proteomics facility:

The cells were incubated 72 hours in RPMI with 10%SVFd and 1% PS. Supernatants were washed away with 1X PBS and replaced by RPMI without SVF and allowed to condition this new medium for 24 hours. Cells were counted for subsequent normalization, and CM (~6 mL) were collected and centrifuged 5 min at 300g and concentrated on an amicon spin reverse 5 kDa/2mL membrane filtration device. Proteins were denatured in 0.1% Rapigest SF™ acid-labile detergent (Waters®), 5 mM DTT and 50 mM ammonium bicarbonate, at 95°C for 30 min (200 µL final). Thiol residues were thus chemically reduced and subsequently cooled down to RT then protected by alkylation in 20 mM MMTS (Sigma Aldrich®) for 10 min at 37°C. 5µg of trypsin (ABSciex) per sample were added and incubated at 37°C overnight. Peptides were then cleared by centrifugation, desalted on C₁₈ sep-pack reverse phase microcolumns as described in the “Stage-tips” procedure and peptides were eluted in Acetonitrile (ACN)²³. Eluates were dried in a vacuum centrifuge concentrator (Thermo), resuspended in 25 µL of 10% ACN and 0.1% Formic Acid (FA). Eluate flow was electrosprayed into a timsTOF Pro 2 mass spectrometer (also from Bruker®) for the 60 min duration of the hydrophobicity gradient ranging from 99% of solvent A (0.1% FA in milliQ-grade

H₂O) to 40% of solvent B (80% ACN and 0.1% FA in mQ-H₂O). The mass spectrometer acquired data throughout the elution process and operated in data-independent analysis mode (DIA) with PASEF-enabled method using the TIMS-Control v.3.1.4 software (Bruker®). Samples were injected in batch replicate order to circumvent possible technical biases.

2. LC-MS/MS data analysis:

The raw data were extracted, normalized and analyzed using Spectronaut software v. 18.6.231227.55695 (Biognosys®) in Direct-DIA mode, which modeled elution behavior, mobility and MS/MS events based on the Uniprot/Swissprot sequence 2022 database of human proteins. Protein identification false discovery rate (FDR) was restricted to 1% maximum, with match between runs (MBR) option enabled and inter-injection data normalization. The precursors' and fragments' mass tolerances were set to 15 ppm. Oxidation of methionines was set as variable modifications while thiol groups from cysteines were considered completely alkylated by the MMTS reagent (Methylation). A minimum of two ratios of peptides was required for relative quantification between groups. Protein quantification analysis was performed using Label-Free Quantification (LFQ) intensities. The resulting protein LFQ values were compared between groups as per the principal component analysis (PCA). Namely the group consisting of H1975 (n=5), H23 (n=5) and H1437 (n=5) samples were used as a comparison to the two other separated groups with A549 (batch 1 with n=3 and batch 2 with n=5) or H1755 samples (batch 1 with n=3 and batch 2 with n=5). Of note, we did not observe any significant variations between the two batches of samples (cf. PCA plot). Differentially-up-regulated proteins were visualized with the EnhancedVolcano R function. Venn diagram was used to identify congruent differentially up-regulated proteins ($\text{LogFC} > 1$, adjusted $p\text{-value} < 0.05$) between H1755 vs H1975+H23+H1437 and

A549 vs H1975+H23+H1437. Pathway level analysis was performed using the fgseaMultilevel function with adjusted p-value<0.05, only considering pathways with more than 3 proteins. MSigDB Hallmark 2020 and GO_Biological_Process_2023 were interrogated. Correlation heatmap was generated with the pheatmap function on the scaled expression of proteins from the “MSigDB Hallmark 2020 - Epithelial Mesenchymal Transition”, “Extracellular Matrix Organization - GO:0030198” and “Collagen Fibril Organization - GO:0030199”. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE²⁴ partner repository with the dataset identifier PXD054295 (<https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD054295>).

Patient survival and correlation analysis

SPPI expression was generated using KM-plotter²⁵ with the following parameters: median *SPPI* (218058_at) expression, median survival, Cox univariate regression (n=1161 patients). Correlation analysis was performed using GEPIA 2²⁶ between *SPPI* and *PECAMI* in LUAD tumor, LUAD Normal and Lung GTEx datasets. Spearman correlation index was calculated.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad® Prism® 8.3 software (GraphPad® Software, LLC). To compare the different conditions at a given time, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used followed by Bonferroni correction (post-hoc Dunn test) when appropriate. Comparisons between a condition at different times were assessed using non-parametric Mann-Whitney test.

Results

Cancer cell secretomes have no effect on endothelial cell viability, proliferation and tube formation

To better understand how cancer cells can remodel the vascular compartment, we sought to discover the impact of cancer cell secretomes on endothelial cell biology. Since the cancer cell lines tested are grown in different media than endothelial cells (RPMI versus EGM2), and since endothelial cells are sensitive to media composition²⁷, we first investigated the effect of a 50:50 mixture of RPMI:EGM2 on endothelial cells. Compared to EGM2, treatments for 48 hours and 72 hours with RPMI:EGM2 did not alter cell viability (**Figure S1A**), proliferation (**Figure S1B**), their ability to form capillaries on ECM gel (**Figures S1C-S1E**), or their morphology (**Figure S1F**). Similarly, there was no difference in endothelial cell migration after treatment with either condition (**Figures S1G-S1H**). Therefore, we selected EGM2 as the control condition for the remaining experiments.

No significant decrease in cell viability was observed after treatment with all CM after 48 hours and 72 hours compared to control condition (**Figure 1**). Seemingly, after 48 hours treatment, no change in endothelial cell proliferation was observed compared to the control condition. Furthermore, although endothelial cell proliferation increased significantly between 48 and 72 hours (whatever the treatment conditions), after 72 hours there was no difference in proliferation between each treatment condition compared with the control condition (**Figure 2**). Tubulogenesis was performed using endothelial cells treated with each of the CMs prior to their seeding on a 3D matrix (**Figure 3A**). After 48 hours of treatment, no difference in the number of meshes (**Figure**

3B) or in the total master segments length was observed (**Figure 3C**). However, after 72 hours treatment, a slight increase in the number of meshes (**Figure 3B**) and the total master segments length (**Figure 3C**) was found in cells treated with CM from A549 and H1755 compared to the control condition. This increase was not found in the other conditions.

Endothelial cells treated with different cancer cell secretomes adopt a partial endothelial-to-mesenchymal phenotype

In response to various *stimuli*, the endothelial cells can undergo the EndMT that fosters tumor cell progression, aggressiveness and treatment resistance¹⁰. Among these different *stimuli*, cytokines such as TGF- β 2 and IL-1 β effectively induce EndMT^{28,29} and have been chosen as positive control in this study. While a significant decrease in viability and proliferation was observed in TGF- β 2/IL-1 β -treated HUVECs compared to control cells after both 48 and 72 hours of treatment, there was only a slight reduction in their ability to form stable tubular structures (**Supplemental Figure S2**).

In addition to the functional and physiological disruption of phenotypic characteristics, EndMT is also characterised by a subtle change in the expression of protein markers²⁰. Again, we first ruled out any difference between EGM2 and the RPMI:EGM2 mixture in terms of endothelial (vWF) or mesenchymal (α -SMA) marker expression by flow cytometry (**Supplemental Figure S3A-B**). After both 48 hours and 72 hours of treatment with TGF- β 2/IL-1 β , no change was observed in the percentage of vWF⁺/ α -SMA⁺ endothelial cells as compared to the control condition. However, we observed a decrease in the percentage of vWF⁺/ α -SMA⁺ cells treated with CMs from A549 and H1755 after 48 hours and 72 hours of treatment (**Figure 4A**). Interestingly, this decrease was not observed in HUVECs treated with CMs from H23, H1437 or H1975 (**Figure 4C**).

At 48 hours, treatment with TGF- β 2/IL-1 β induced an expected increase in the percentage of vWF⁺/ α -SMA⁺ cells compared to the control condition, although not significant. Surprisingly, in comparison, HUVECs treated with CMs from A549 or H1755 induced a strong increase in the percentage of vWF⁺/ α -SMA⁺ cells after 48 and 72 hours of treatment (**Figure 4B; Supplementary Figure S3C-D**). This increase was statistically significant for HUVECs treated with CM from A549 at 48 hours and from H1755 at 72 hours compared to the control condition (**Figure 4B**). Although the percentage of vWF⁺/ α -SMA⁺ cells was induced, the results appear less pronounced in HUVECs treated with CM from H23, H1437 or H1975 (**Figure 4D**).

Recently, CD44 variants have been linked to the EndMT in a context of pulmonary hypertension³⁰. We therefore investigated a second pair of markers, using CD31 and CD44 as endothelial and mesenchymal markers, respectively. We showed that none of the treatments modified the percentage of CD31⁺/CD44⁺ cells at 48 hours, whereas a slight decrease in the level of CD31⁺/CD44⁺ cells was observed at 72 hours in HUVECs treated with CM from A549 and H23 compared to the control condition. (**Figure 4E**). Although the level of expression of CD31⁺/CD44⁺ cells was practically zero after 48 hours, regardless of the treatment, we observed an increase in the percentage of CD31⁺/CD44⁺ cells in the presence of TGF- β 2/IL-1 β and the different CM compared to the control condition. (**Figure 4F**). Although most cells treated with CM retain expression of the endothelial marker CD31, a small fraction begin to express the mesenchymal protein CD44.

Secretome increases stress fiber expression and alters endothelial cell morphology

The EndMT process is usually associated with cytoskeleton remodeling and change in morphology, a prerequisite for the pro-migratory phenotype of mesenchymal and EndMT-

transiting endothelial cells³¹. Confocal microscopy observations showed an altered cell morphology with elongated and enlarged cells after 48 and 72 hours of treatment with TGF- β 2/IL-1 β or each cancer cell CM compared to the control condition (**Figure 5**). In addition, phalloidin staining in TGF- β 2/IL-1 β -treated HUVECs at both treatment times revealed a striking increase in the number of thick stress fiber bundles, which were generally aligned along the major cell axis. We observed a similar phenotype in all CM treatment conditions (**Figure 5**).

Secretomes increase the migration of cells whose phenotype is altered

In close correlation with cell shape and morphology, we then sought to characterize the effect of cancer cell secretomes on endothelial cell migration. At 48 and 72 hours, a significant increase in cumulative distance and cell velocity was found in both TGF- β 2/IL-1 β -treated cells and H1755-, H23- and H1437-treated cells compared to control cells (**Figure 6A-B**). Although not statistically significant, a similar increase was observed at both treatment times in cells treated with CM from A549 and H1975 compared to control cells (**Figure 6A-B**).

Proteomic analysis of the secretomes revealed mediators of the EndMT

Secretomes from the different NSCLC lines tested mediate various phenotypic alterations of exposed endothelial cells, with A549 and H1755 inducing the most pronounced effects. We thus screened by mass-spectrometry analysis the composition of the NSCLC CMs and principal component analysis (PCA) identified three main groups of samples. A first group encompassing mixed samples from H1975, H23 and H1437 cells, a second with H1755 samples, and a third with A549 samples (**Figure 7A**). On this basis, differential analysis was performed to highlight deregulated proteins in H1755 or A549 compared to the H1975+H23+H1437 group

(**Supplemental Figure S4A**). Among the significantly up-regulated proteins from H1755 and A549 (Log FC>1, adjusted p-value<0.05), 132 proteins were found in common (**Figure 7B**) and relate to the epithelial-to-mesenchymal transition (or EndMT in endothelial cells), angiogenesis and reactive oxygen species signaling pathways, which rank as three most prevalent pathways (**Figure 7C, Supplemental Figure S4B**). Gene ontology analysis also pinpointed key biological processes involving extracellular matrix and collagen fibril organization (**Supplemental Figure S4C**), further shedding light onto the matrix-remodeling potential of A549 and H1755 secretomes. Correlation heatmap representation of the top deregulated proteins involved in the EndMT (eg. TGF β 1/2, SPARC, SPP1, MMP2, SERPINE1, TAGLN, VIM) and matrix-remodeling signaling pathways (eg. COL1A1/5A1/5A2/6A2/14A1, NID1/2, POSTN, LOX) further confirmed the sample group distribution identified by PCA (**Figure 7D**). Notably, different protein expression patterns were distinguished between the A549 and H1755 secretomes. Finally, we selected the most commonly up-regulated target in A549 (3.02 Log₂FC) and H1755 (5.74 Log₂FC), namely the SPP1/Osteopontin, which expression was correlated to poor survival in patients with lung adenocarcinoma (LUAD) (**Figure 7E**). Interestingly enough, *SPP1* expression was inversely correlated to *PECAMI* (encoding for the endothelial marker CD31) in tumor and healthy LUAD TCGA samples (**Figure 7F**).

Discussion

The aim of the present study was to investigate the effect of conditioned media from NSCLC tumor cell lines on the endothelial cell phenotype. Interestingly, a modification of the endothelial phenotype was found when HUVECs were treated with different CMs from different NSCLC cell lines. This phenotypic change was associated with a morphological change, an increase in both stress fiber expression and spontaneous migration. Furthermore, an increase in mesenchymal markers (α -SMA and CD44) confirmed the phenotypic changes. However, the secretomes did not significantly reduce the expression of endothelial markers (vWF) and did not modify the rate of double-labelled cells (vWF⁻/ α -SMA⁺ or CD31⁻/CD44⁺) because it remained high. Taken together, these data suggest that CMs are capable of inducing partial EndMT.

Endothelial cells are known for their plasticity during angiogenesis^{32,33} or EndMT^{34,35}. EndMT was first described in cardiac fibrosis and pulmonary hypertension³⁶. Its involvement in NSCLC was demonstrated in a study investigating the effect of conditioned media on HUVECs, with an increase in resistance to anticancer treatments in lung cancer cell lines. Dynamic interactions involving both cancer cells and vascular ECs have been proposed to explain the induction of EndMT. Using 2D and 3D models, the authors confirmed crosstalk between tumor cells and ECs to induce phenotypic changes³⁷. In addition, another study in uterine squamous cell carcinoma showed that PAI-1/SERPINE1 CAFs promoted the differentiation of lymphatic endothelial cells into mesenchymal cells, again highlighting the close interactions between tumor and endothelial cells to induce EndMT³⁸. The data from these studies justify the experimental models chosen for our study. Under these conditions, we showed a morphological change associated with an increase in both stress fiber expression and cell migration. Taken together, these data suggest a phenotypic transition of CM-treated EC in favor of a mesenchymal phenotype as it has been described by

several authors. For instance, Pinto *et al.* showed that the acquisition of an invasive phenotype in TGF- β 2-induced EndMT is mediated by a SNAIL signaling pathway³⁹. Similarly, it has been demonstrated by Ma *et al.* an increase in the migratory capacity of mouse pulmonary vascular endothelial involved in EndMT induced by PM_{2.5} particles⁴⁰.

To confirm this NSCLC secretome-induced differentiation of ECs, the expression of various mesenchymal and endothelial markers was assessed by flow cytometry. EndMT is characterized by a loss of expression of endothelial markers in favor of mesenchymal markers. In this study, two pairs of endothelial and mesenchymal markers were tested to avoid the variability caused by the type of vascular cells used⁴¹. Interestingly, the secretome of two NSCLC cell lines appeared to alter the expression of the markers tested. The secretome of A549 and H1755 cells induced an increase in the expression of vWF⁺/SMA⁺ cells and a decrease in the expression of vWF⁻/SMA⁻ cells. The same trends were confirmed, albeit to a lesser extent, in the study of the expression of the pair CD31/CD44. The absence of a clear reduction in double-labeled cells in favor of cells significantly expressing mesenchymal markers suggests that, under the experimental conditions chosen, NSCLC secretomes induce partial EndMT. It is necessary to consider the chosen experimental protocol to explain this partial EndMT. In fact, while studies have confirmed robust EndMT⁴² characterized by phenotypic changes in endothelial cells after at least one week of treatment²⁸, we chose to treat HUVECs with tumor cell secretomes for a maximum of 72 hours. This choice was based on preliminary studies conducted by our team⁴³ in which it has been confirmed the absence of toxicity of tumor cell secretomes towards endothelial cells. Furthermore, in this study the analysis of EndMT was conducted on endothelial cells cultured in 2D while the use of 3D spheroid models seems to be more favorable for the induction of EndMT. In recent years, a paradigm shift from 2D to 3D cell culture techniques has occurred, because 2D cell culture involves growing cells

in a flat dish, which can lead to the formation of unnatural cell attachments. Further, simplifying the 2D assay system does not provide us the data that would be utilized in translational research. Hence, Kim *et al.* conducted comparative studies of the effects of secretomes on the activation of EndMT in HUVECs in 2D and 3D cultures of NSCLC cells and confirmed that the increase in certain growth factors in NSCLC-3D culture conditions may lead to the activation of the EndMT process in HUVECs³⁷. It will therefore be appropriate to plan further experiments to assess the EndMT capacity of endothelial cells included into 3D tumor spheroid models.

Other interesting hypotheses regarding partial EndMT have been proposed in a recent study by Takahashi *et al.*¹³. Thus, they suggested that EndoMT is closely associated with tumor progression through the formation of CAFs and angiogenesis. CAFs originated from the cells that have undergone full EndoMT and they proposed that those cells cannot reverse to endothelial cells, while partial EndoMT state is a reversible phenotype allowing cells to regain their endothelial characteristics³⁵. This retrieval of endothelial characteristics was confirmed, in our study, following the increase in the capacities of ECs treated with A549 and H1755 cell secretomes to form capillaries on Matrigel® after 72 hours of incubation.

In order to identify NSCLC-secreted mediators of the EndMT our mass-spectrometry analysis provides an interesting dataset of targets that could potentially induce or modulate this process. Some proteins appear highly up-regulated in specific cell lines, for instance, this is the case for the pro-EndMT PAI1/SERPINE1 that is enriched by 2.7-fold change in A549 compared to H1975/H23/H1437. As these NSCLC present specific genomic alterations (representative of NSCLC patient's heterogeneity), it will be highly relevant to identify tumor signatures that could be correlated to the EndMT levels in tumor and patient response to therapies. We showcased the example of SPP1, which has been linked to EMT in various cancers including NSCLC⁴⁴, but to our

knowledge, no study exists on SPP1 and EndMT in cancer and should thus be further studied. Interestingly, the PECAM1/SPP1 correlation analysis indicates that healthy lung tissues are mostly PECAM1^{high}SPP1^{low} while tumor samples appear PECAM1^{low}SPP1^{high} (data not shown). One could hypothesize that it may highlight a high occurrence of EndMT in NSCLC adenocarcinoma tumors, but this has to be validated.

Acknowledgments

Authors thank the I-SITE NExT Junior Talent, European Regional Development Fund (FEDER) (LT) and University of Angers (NC) for the financing of the PhD (CB). Authors thank the « comité du Maine et Loire » of the « Ligue contre le Cancer » (NC) for its grant. We acknowledge the SFR ICAT (PACEM platform, Angers), the SFR Bonamy (Cytocell Micropicell platform, Nantes) for their expertise in the field of flow cytometry, and the IBISA MicroPICell facility (Biogenouest) member of the national infrastructure France-Bioimaging supported by the French national research agency (ANR-10-INBS-04), for imaging.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest.

Credit contribution

CB: Investigation, Methodology, Writing original draft; **MC:** Methodology, Visualization; **MK:** Methodology, Visualization; **FG:** Investigation, Methodology, Writing original draft; **CG:** Investigation, Methodology, Writing original draft; **AB:** Methodology; **CH:** Methodology; **LT:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation,

Methodology, Project administration, Resources, Software, Supervision, Validation, Visualization, Writing original draft, Reviewing original draft; **NC**: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing original draft, Reviewing original draft

References

1. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(5):584-594. doi:10.4065/83.5.584
2. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(8):1623-1640. doi:10.1016/j.mayocp.2019.01.013
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
4. Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(1):9-31. doi:10.1038/s41568-018-0081-9
5. Giraldo NA, Sanchez-Salas R, Peske JD, et al. The clinical role of the TME in solid cancer. *Br J Cancer.* 2019;120(1):45-53. doi:10.1038/s41416-018-0327-z
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9
7. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285(21):1182-1186. doi:10.1056/NEJM197111182852108
8. Yeon JH, Jeong HE, Seo H, et al. Cancer-derived exosomes trigger endothelial to mesenchymal transition followed by the induction of cancer-associated fibroblasts. *Acta Biomater.* 2018;76:146-153. doi:10.1016/j.actbio.2018.07.001
9. Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1281-1324. doi:10.1152/physrev.00021.2018

10. Clere N, Renault S, Corre I. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:747. doi:10.3389/fcell.2020.00747
11. Cho JG, Lee A, Chang W, Lee MS, Kim J. Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction. *Front Immunol.* 2018;9:294. doi:10.3389/fimmu.2018.00294
12. Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer.* 2008;99(9):1375-1379. doi:10.1038/sj.bjc.6604662
13. Takahashi K, Kobayashi M, Katsumata H, et al. CD40 is expressed in the subsets of endothelial cells undergoing partial endothelial-mesenchymal transition in tumor microenvironment. *Cancer Sci.* 2024;115(2):490-506. doi:10.1111/cas.16045
14. Bremnes RM, Dønnem T, Al-Saad S, et al. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2011;6(1):209-217. doi:10.1097/JTO.0b013e3181f8a1bd
15. Wong KY, Cheung AHK, Chen B, et al. Cancer-associated fibroblasts in nonsmall cell lung cancer: From molecular mechanisms to clinical implications. *Int J Cancer.* 2022;151(8):1195-1215. doi:10.1002/ijc.34127
16. Fang JS, Hultgren NW, Hughes CCW. Regulation of Partial and Reversible Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Angiogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:702021. doi:10.3389/fcell.2021.702021
17. Tombor LS, John D, Glaser SF, et al. Single cell sequencing reveals endothelial plasticity with transient mesenchymal activation after myocardial infarction. *Nat Commun.* 2021;12(1):681. doi:10.1038/s41467-021-20905-1
18. Ma W, Wang Y, Zhang R, et al. Targeting PAK4 to reprogram the vascular microenvironment and improve CAR-T immunotherapy for glioblastoma. *Nat Cancer.* 2021;2(1):83-97. doi:10.1038/s43018-020-00147-8
19. Hultgren NW, Fang JS, Ziegler ME, et al. Slug regulates the Dll4-Notch-VEGFR2 axis to control endothelial cell activation and angiogenesis. *Nat Commun.* 2020;11(1):5400. doi:10.1038/s41467-020-18633-z
20. Gorelova A, Berman M, Al Ghouleh I. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Arterial Hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2021;34(12):891-914. doi:10.1089/ars.2020.8169
21. Yun E, Kook Y, Yoo KH, et al. Endothelial to Mesenchymal Transition in Pulmonary Vascular Diseases. *Biomedicines.* 2020;8(12):639. doi:10.3390/biomedicines8120639

22. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, et al. Angiogenesis Analyzer for ImageJ - A comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay.” *Sci Rep.* 2020;10(1):11568. doi:10.1038/s41598-020-67289-8
23. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc.* 2007;2(8):1896-1906. doi:10.1038/nprot.2007.261
24. Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D442-D450. doi:10.1093/nar/gky1106
25. Györfly B. Integrated analysis of public datasets for the discovery and validation of survival-associated genes in solid tumors. *Innov Camb Mass.* 2024;5(3):100625. doi:10.1016/j.xinn.2024.100625
26. Tang Z, Kang B, Li C, Chen T, Zhang Z. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(W1):W556-W560. doi:10.1093/nar/gkz430
27. Leopold B, Strutz J, Weiß E, et al. Outgrowth, proliferation, viability, angiogenesis and phenotype of primary human endothelial cells in different purchasable endothelial culture media: feed wisely. *Histochem Cell Biol.* 2019;152(5):377-390. doi:10.1007/s00418-019-01815-2
28. Nie L, Lyros O, Medda R, et al. Endothelial-mesenchymal transition in normal human esophageal endothelial cells cocultured with esophageal adenocarcinoma cells: role of IL-1 β and TGF- β 2. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014;307(9):C859-877. doi:10.1152/ajpcell.00081.2014
29. Maleszewska M, Moonen JRAJ, Huijkman N, van de Sluis B, Krenning G, Harmsen MC. IL-1 β and TGF β 2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an NF κ B-dependent manner. *Immunobiology.* 2013;218(4):443-454. doi:10.1016/j.imbio.2012.05.026
30. Isobe S, Kataoka M, Endo J, et al. Endothelial-Mesenchymal Transition Drives Expression of CD44 Variant and xCT in Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019;61(3):367-379. doi:10.1165/rcmb.2018-0231OC
31. Ciszewski WM, Wawro ME, Sacewicz-Hofman I, Sobierajska K. Cytoskeleton Reorganization in EndMT-The Role in Cancer and Fibrotic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11607. doi:10.3390/ijms222111607
32. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011;146(6):873-887. doi:10.1016/j.cell.2011.08.039
33. Dejana E, Hirschi KK, Simons M. The molecular basis of endothelial cell plasticity. *Nat Commun.* 2017;8:14361. doi:10.1038/ncomms14361

34. Platel V, Faure S, Corre I, Clere N. Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT): Roles in Tumorigenesis, Metastatic Extravasation and Therapy Resistance. *J Oncol.* 2019;2019:8361945. doi:10.1155/2019/8361945
35. Watabe T, Takahashi K, Pietras K, Yoshimatsu Y. Roles of TGF- β signals in tumor microenvironment via regulation of the formation and plasticity of vascular system. *Semin Cancer Biol.* 2023;92:130-138. doi:10.1016/j.semcancer.2023.04.007
36. Li Y, Lui KO, Zhou B. Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(8):445-456. doi:10.1038/s41569-018-0023-y
37. Kim SH, Song Y, Seo HR. GSK-3 β regulates the endothelial-to-mesenchymal transition via reciprocal crosstalk between NSCLC cells and HUVECs in multicellular tumor spheroid models. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2019;38(1):46. doi:10.1186/s13046-019-1050-1
38. Wei WF, Zhou HL, Chen PY, et al. Cancer-associated fibroblast-derived PAI-1 promotes lymphatic metastasis via the induction of EndoMT in lymphatic endothelial cells. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2023;42(1):160. doi:10.1186/s13046-023-02714-0
39. Pinto MT, Ferreira Melo FU, Malta TM, et al. Endothelial cells from different anatomical origin have distinct responses during SNAIL/TGF- β 2-mediated endothelial-mesenchymal transition. *Am J Transl Res.* 2018;10(12):4065-4081.
40. Ma K, Li C, Xu J, et al. LncRNA Gm16410 regulates PM2.5-induced lung Endothelial-Mesenchymal Transition via the TGF- β 1/Smad3/p-Smad3 pathway. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;205:111327. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111327
41. Bronson R, Lyu J, Xiong J. Transcriptome analysis reveals molecular signature and cell-type difference of Homo sapiens endothelial-to-mesenchymal transition. *G3 Bethesda Md.* 2023;13(12):jkad243. doi:10.1093/g3journal/jkad243
42. Zhu X, Wang Y, Soaita I, et al. Acetate controls endothelial-to-mesenchymal transition. *Cell Metab.* 2023;35(7):1163-1178.e10. doi:10.1016/j.cmet.2023.05.010
43. Platel V, Lechevalier D, Bourreau C, et al. NOX1 and NOX2: Two enzymes that promote endothelial-to-mesenchymal transition induced by melanoma conditioned media. *Pharmacol Res.* 2022;177:106097. doi:10.1016/j.phrs.2022.106097
44. Li B, Li X, Yang Q, et al. Overexpression of SPP1 is a prognostic indicator of immune infiltration in lung adenocarcinoma. *Aging.* 2024;16(3):2953-2977. doi:10.18632/aging.205526

Figure legends

Figure 1: Assessing endothelial cell viability using different NSCLC secretomes. Graphical representation of CellTiter-Glo® luminescence-based viability test. Results are reported as fold change to EGM2 100%. Graph bars show the mean SEM. N=3 independent experiments. CM: conditioned media.

Figure 2: Evaluation of endothelial cell proliferation after treatment with different CMs. Graphical representation of Cyquant® fluorescence-based proliferation test. Results are reported as fold change to EGM2 100% after 48 hours treatment. Graph bars show the mean SEM. N=4 independent experiments. Not specified on the graph, the same conditions compared in Mann-Whitney test between the two treatment times are significantly different with ** $p < 0.01$ for the Control 48h vs 72h condition, and * $p < 0.05$ for all other 48h vs 72h conditions..

Figure 3: Analysis of capillary formation capacity of secretome-treated HUVECs (A). Graphical representation of (B) the number of meshes and (C) the total master segments length. The results represent fold changes compared to the EGM2 100% condition. Graph bars show the mean SEM. N=4 independent experiments.

Figure 4: Evaluation of the expression of endothelial or mesenchymal markers in secretome-treated HUVECs by flow cytometry. Analysis of the percentage of (A) $vWF^+/\alpha-SMA^+$ and (B) $vWF^-/\alpha-SMA^+$ cells from A549 and H1755 treated cells, (C) $vWF^+/\alpha-SMA^+$ and (D) $vWF^-/\alpha-SMA^+$ cells from H23, H1437 and H1975 treated cells, (E) $CD31^+/\text{CD44}^+$ cells from HUVECs treated with each secretome and (F) $CD31^-/\text{CD44}^+$ cells from HUVECs treated with each secretome. Graph bars show the

Figure 5: Analysis of stress fiber expression and endothelial cell morphology in HUVECs treated cells. Confocal microscopy analysis of HUVEC treated for 48 hours or 72 hours with TGF β 2/IL-1 β or different CM. Nucleus are counterstained with Hoechst (blue). Actin stress fibers (phalloidin, green) and the endothelial protein vWF (magenta). Scale bar = 100 μ m. Representative images from N=4 independent experiments.

Figure 6: Analysis of spontaneous migration of CM-treated HUVEC treated. Graphical representation of (A) cumulative distance and (B) velocity of HUVECs treated with each CM. Results are reported as fold change in comparison with control condition. Graph bars show the mean \pm SEM, *p<0.05; **p<0.01. N=5 independent experiments.

Figure 7: Mass spectrometry protein analysis of the secretome from NSCLC tumor cell lines. Schematic representation of (A) the principal component analysis (PCA) of the various samples analyzed (in red group x 5n, in blue group y 5n, yellow z 8n etc...) (B) Differential expression analysis between A549 or H1755 vs H1437 + H1975 + H23, and the differentially up-regulated proteins (LogFC>1, adjusted p-value<0.05) are plotted in a Venn diagram. (C) Gene set enrichment analysis is performed on the 132 proteins, congruently up-regulated in A549 and H1755. All depicted pathways have an adjusted p-value<0.05. (D) Correlation heatmap of key proteins involved in EMT and matrix remodeling, and upregulated in A549 and H1755 secretome. (E) Kaplan meier representation of TCGA lung adenocarcinoma (LUAD) patient survival according to the *SPPI* expression. (F) Correlation analysis between *PECAMI* (CD31) and *SPPI* expressions in LUAD TCGA. R shows the Spearman correlation index.

Supplemental Figure S1: Comparison of the control condition (EGM2) and the 50:50 mix condition on HUVEC. Graphical representation of (A) cell viability (N=3 independent

experiments), (B) cell proliferation (N=4 independent experiments), (C) the analysis of the ability of EC to form capillaries on ECM gel with (D) the number of meshes and (E) the total master segments length on ECM gel (N= 4 independent experiments). (F) Confocal analysis of stress fiber (phalloidin) expression and endothelial cell morphology. Scale bar: 100 μ m. Analysis of migration (N= 5 independent experiments) with (G) the cumulative distance and (H) the velocity of CM-treated HUVECs. Graph bars show the mean SEM.

Supplemental Figure S2: Comparison of the control condition and the TGF- β 2/IL-1 β treatment on HUVEC. Graphical representation of (A) cell viability (N=3 independent experiments), (B) cell proliferation (N=4 independent experiments) after TGF- β 2/IL-1 β treatment. Analysis of the ability of EC to form capillaries on ECM gel (C) with (D) the number of meshes and (E) the total master segments length (N= 4 independent experiments). Graph bars show the mean SEM, *p<0.05; **p<0.01.

Supplemental Figure S3: Comparison of the control condition (EGM2) and the 50:50 mix condition on HUVEC marker expression. Analysis of the percentage of (A) vWF⁺/ α -SMA⁺, (B) vWF/ α -SMA⁺, (C) CD31⁺/CD44⁺, (D) CD31⁻/CD44⁺ cells by flow cytometry (N=3-5 independent experiments).

Supplemental Figure S4: Proteomic analysis of the NSCLC secretomes. (A) Differential analysis (DA) and (B) gene set enrichment analysis (GSEA) of H1755 or A549 vs H1975+H23+H1437 tumor cell secretomes. (C) GSEA of the congruent up-regulated proteins between H1755 and A549 secretomes. All depicted pathways have an adjusted p-value<0.05.

Figure 1

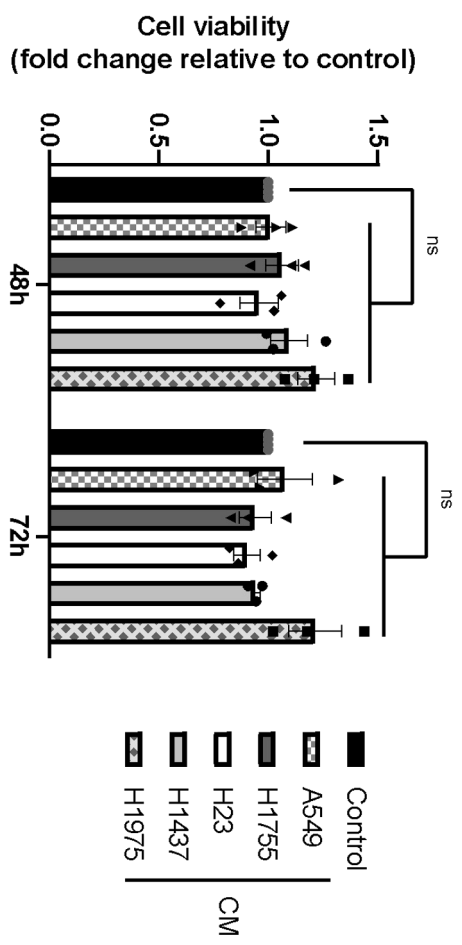


Figure 2

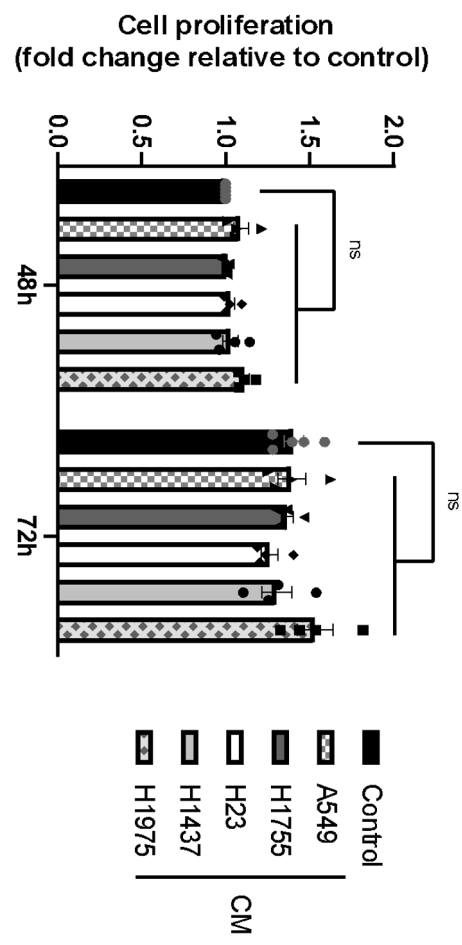


Figure 3

A

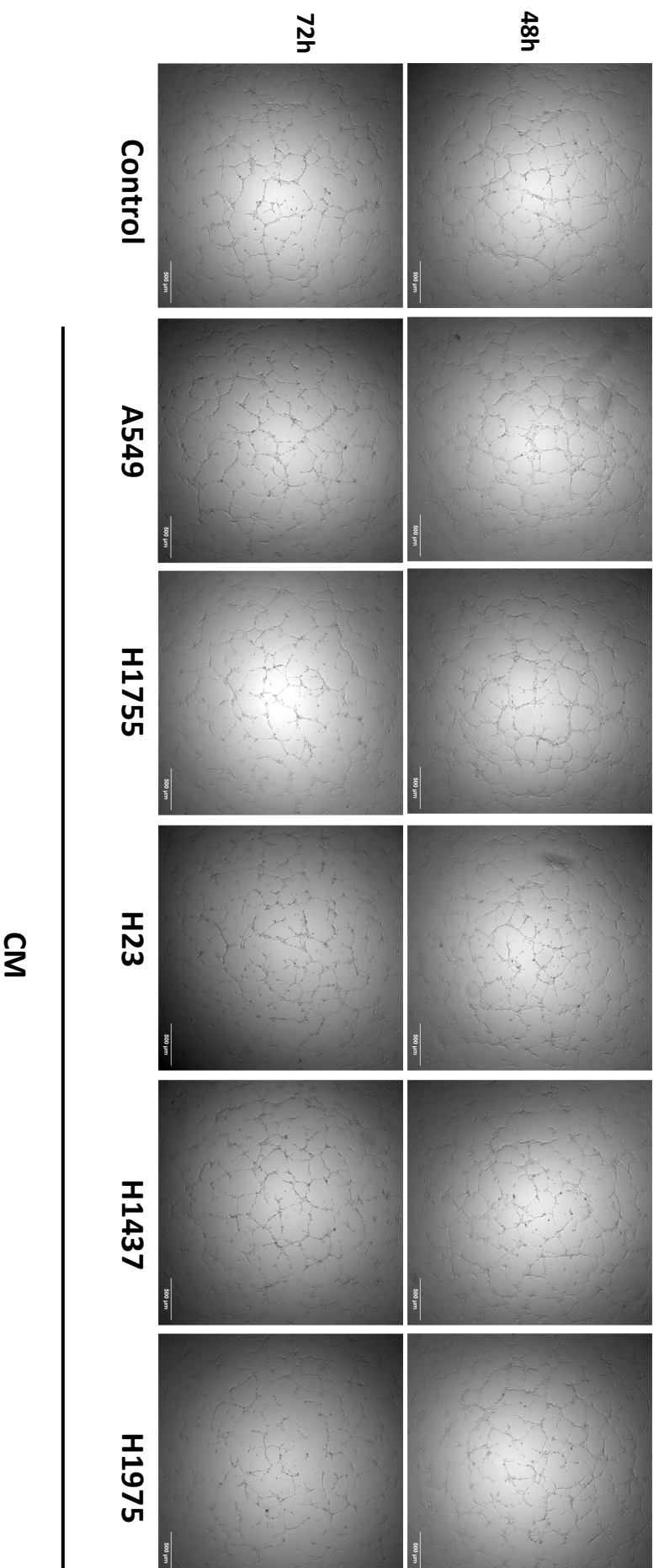
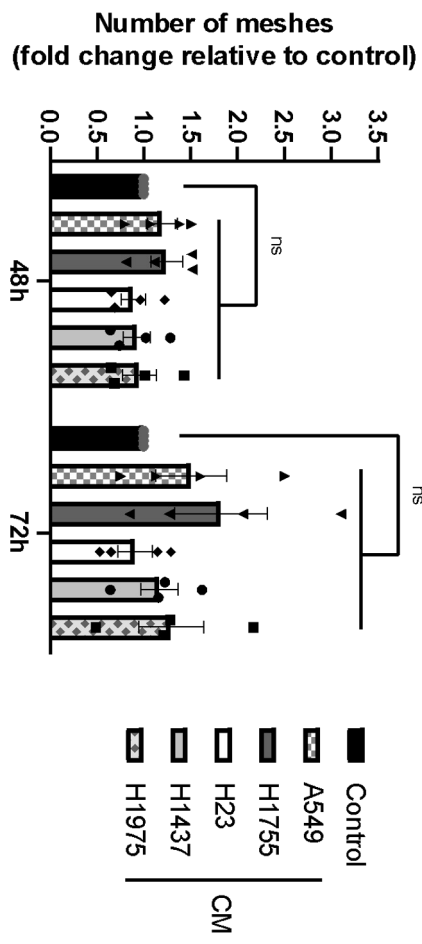


Figure 3

B



C

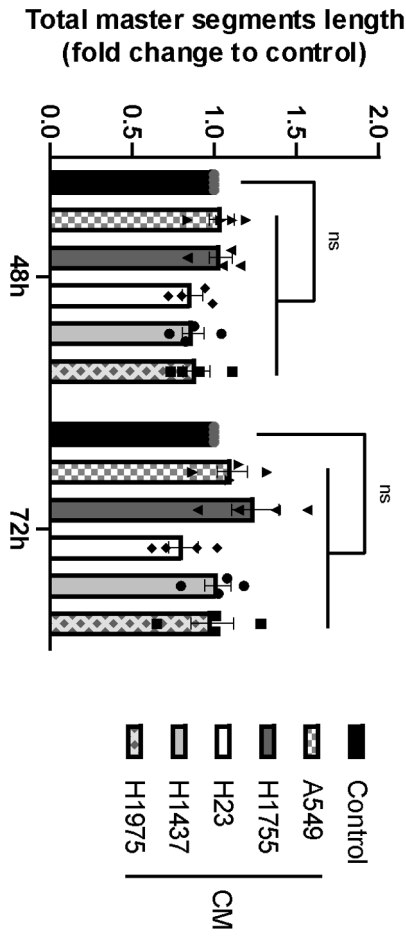
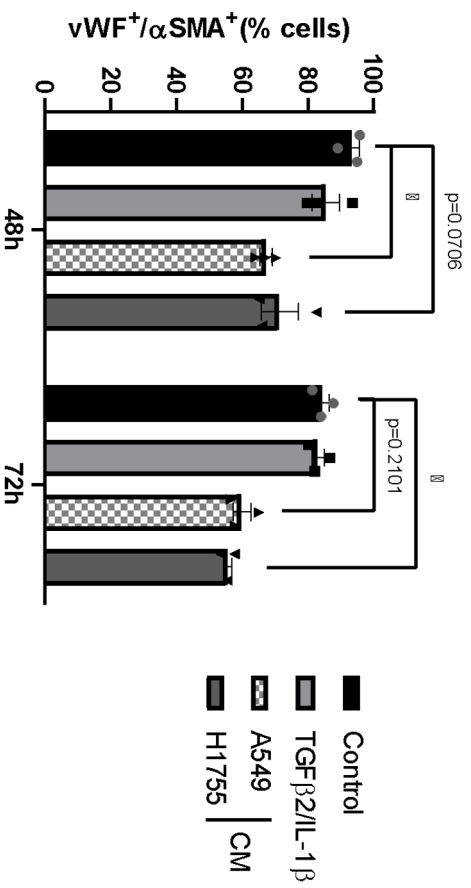
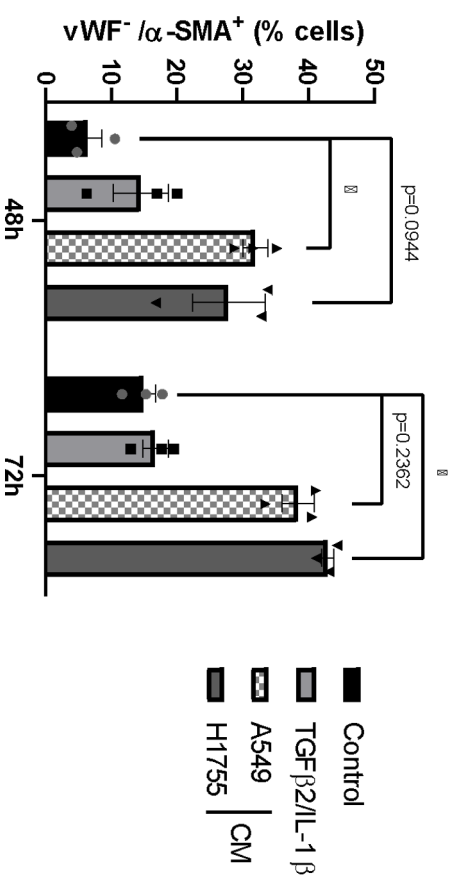


Figure 4

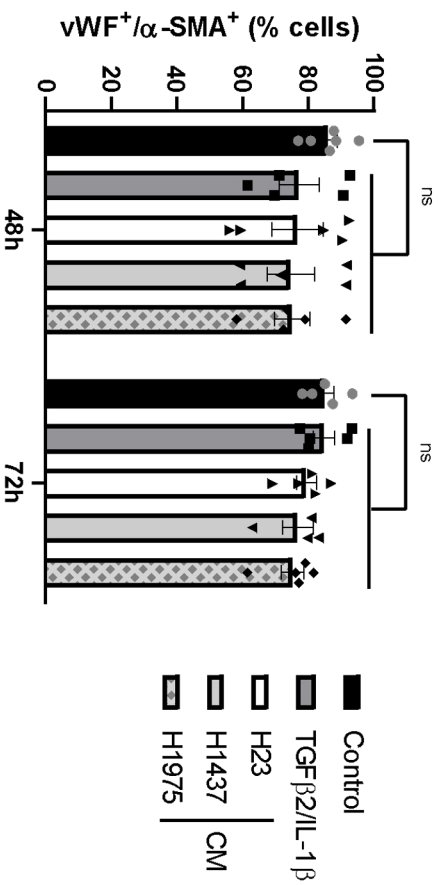
A



B



C



D

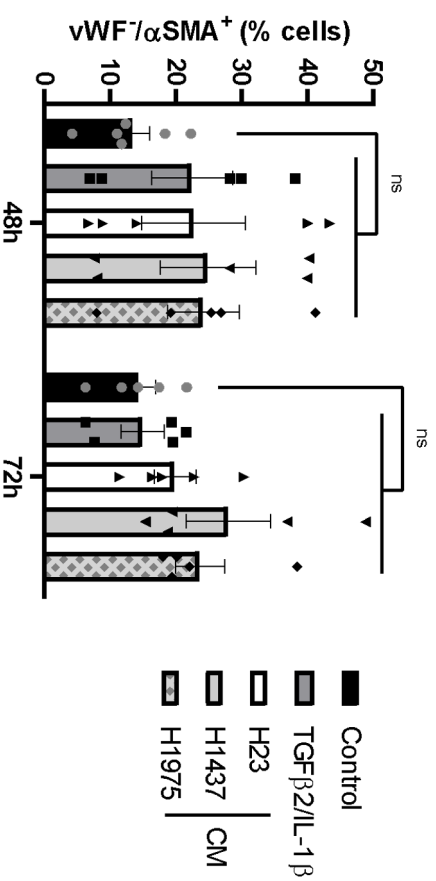


Figure 6

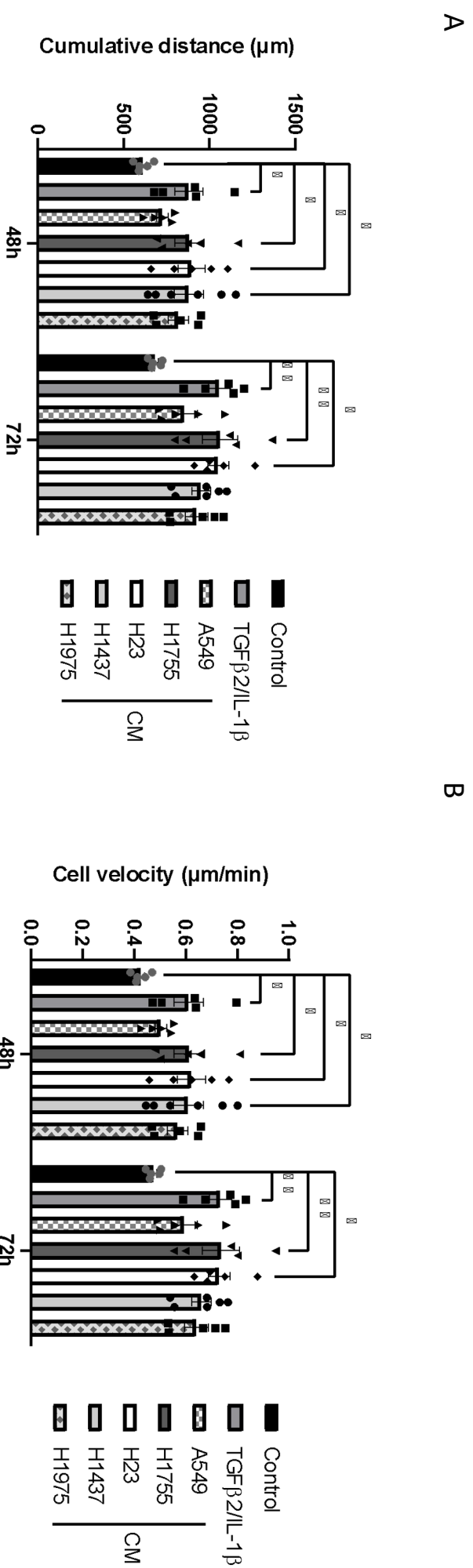
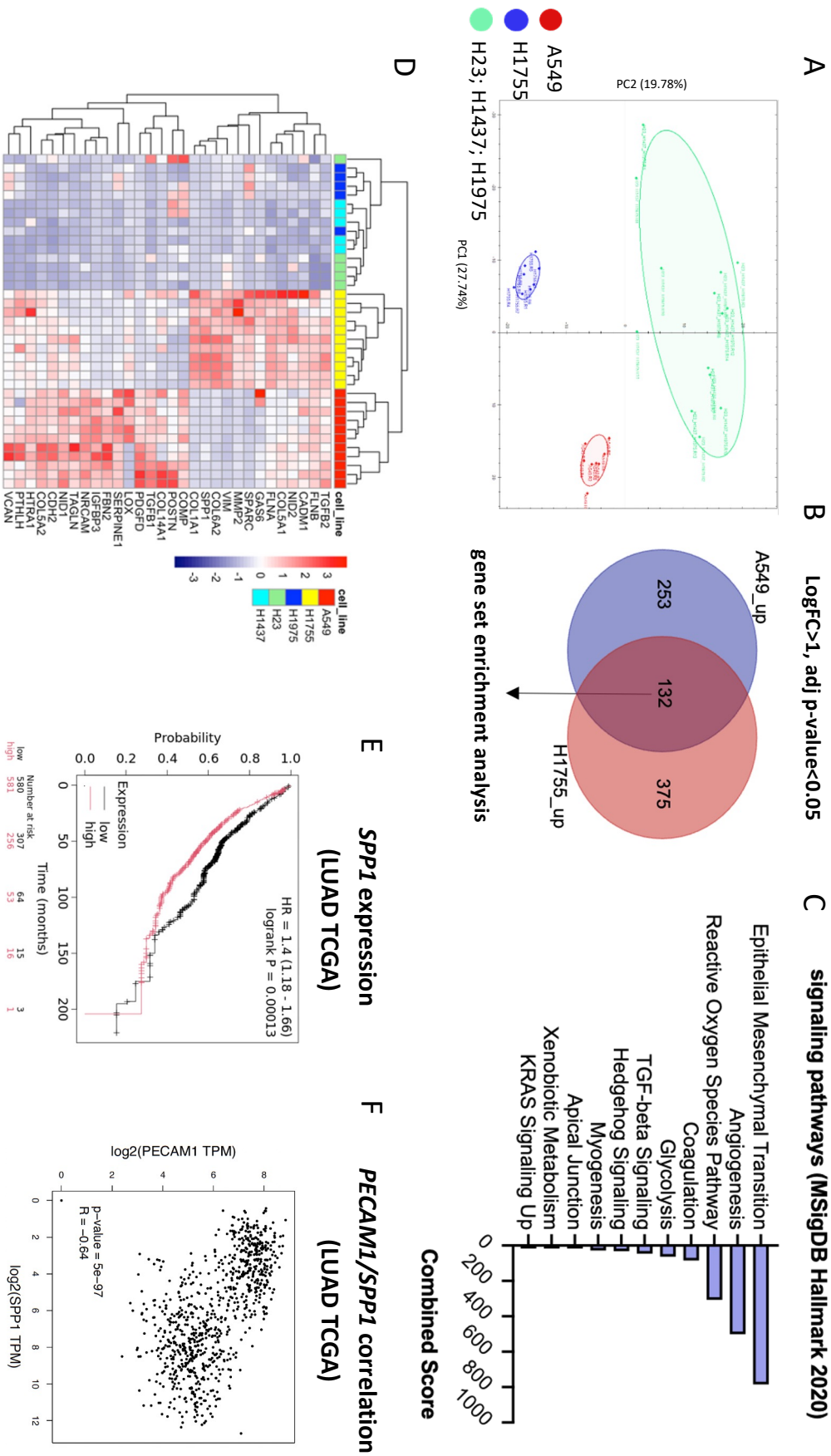
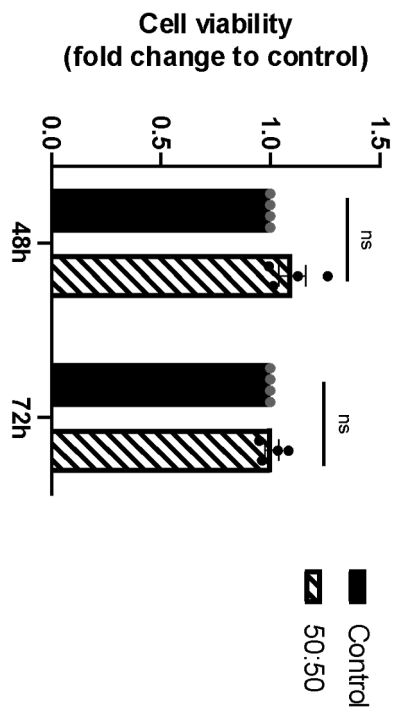


Figure 7

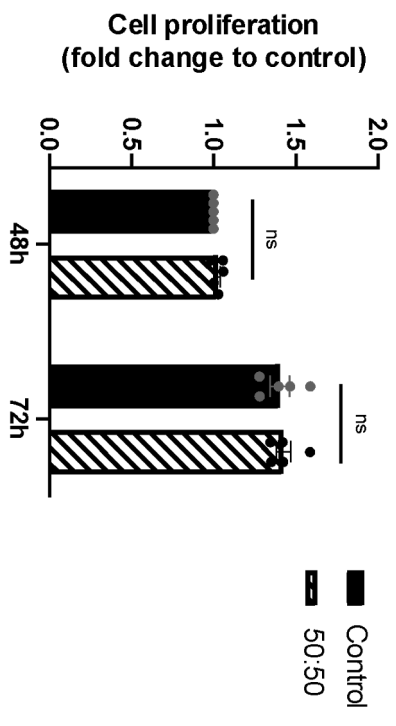


Supplemental Figure 1

A

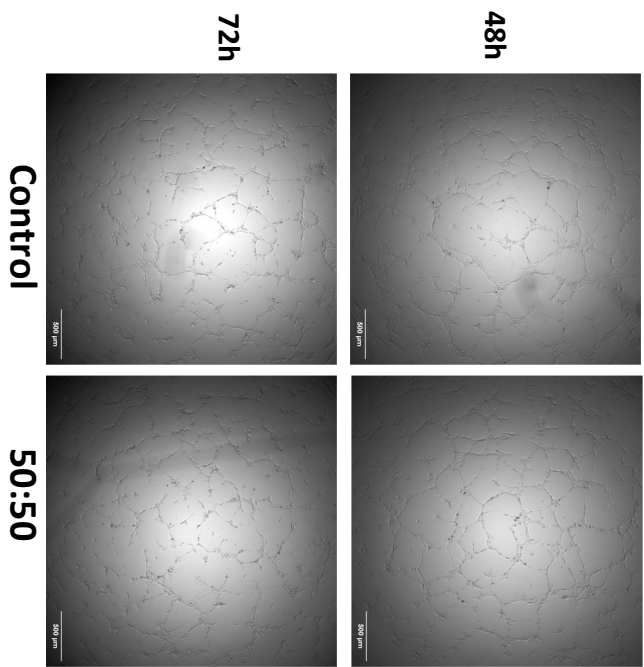


B



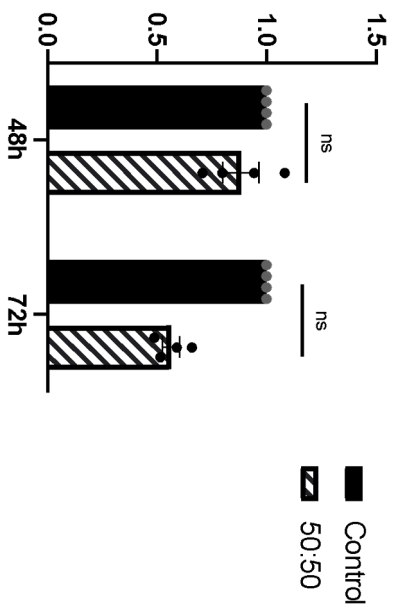
Supplemental Figure 1

C



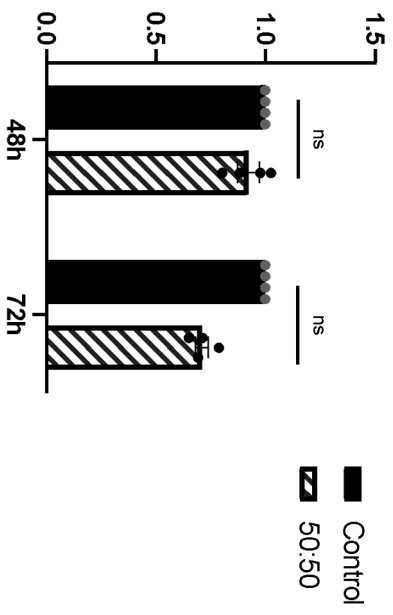
D

Number of meshes
(fold change to control)

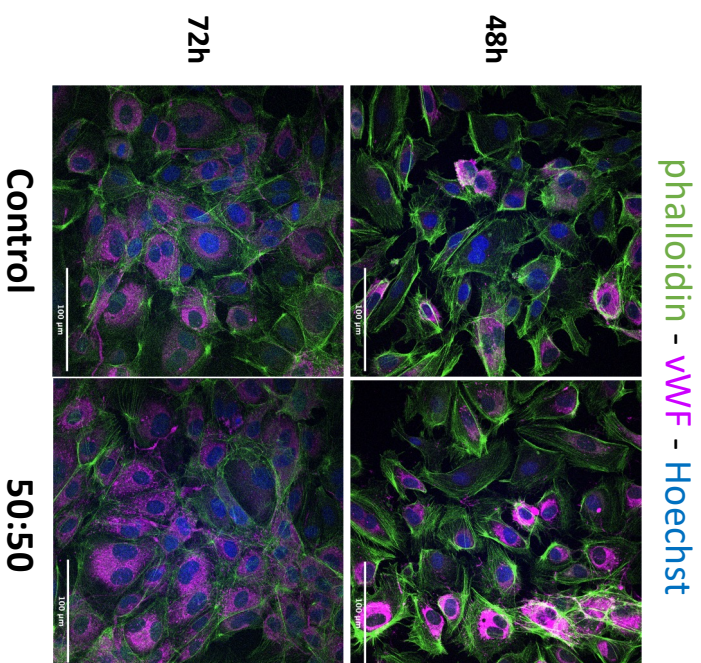


E

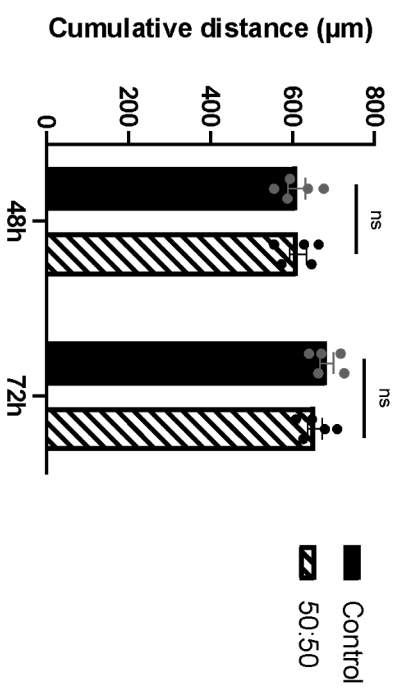
Total master segments length
(fold change to control)



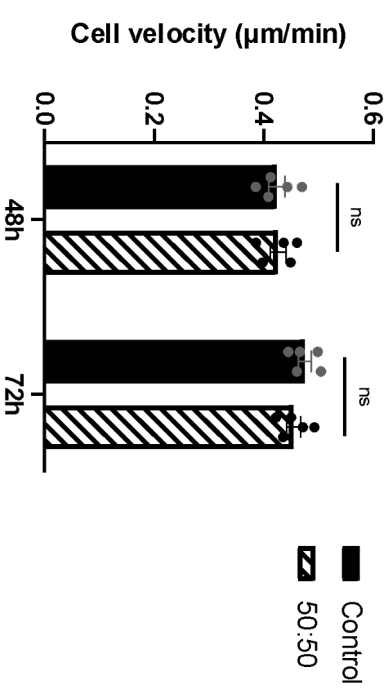
F



G

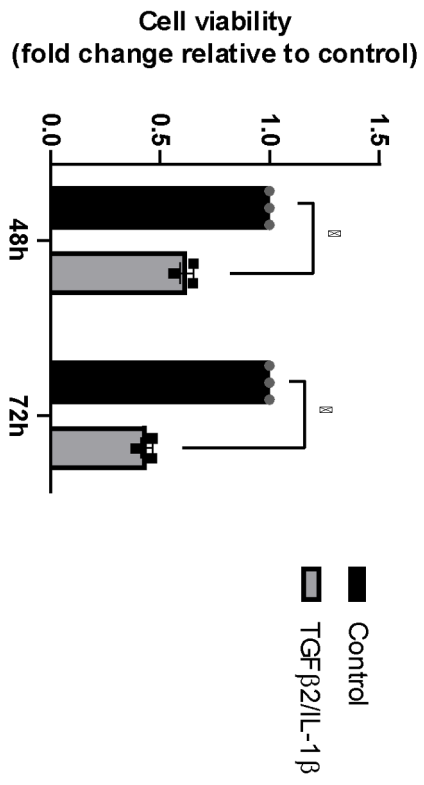


H

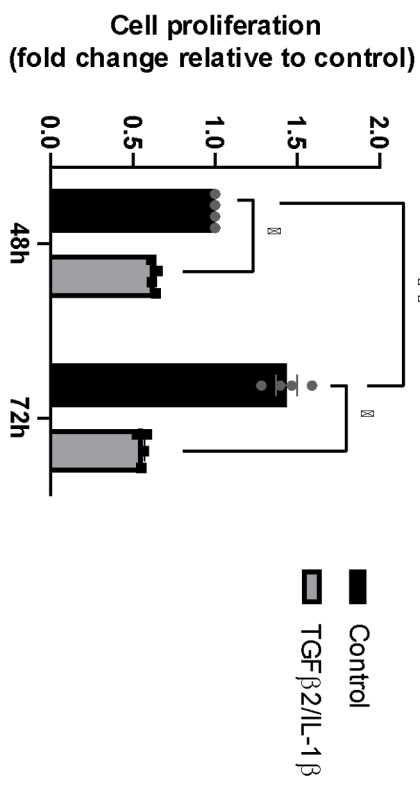


Supplemental Figure 2

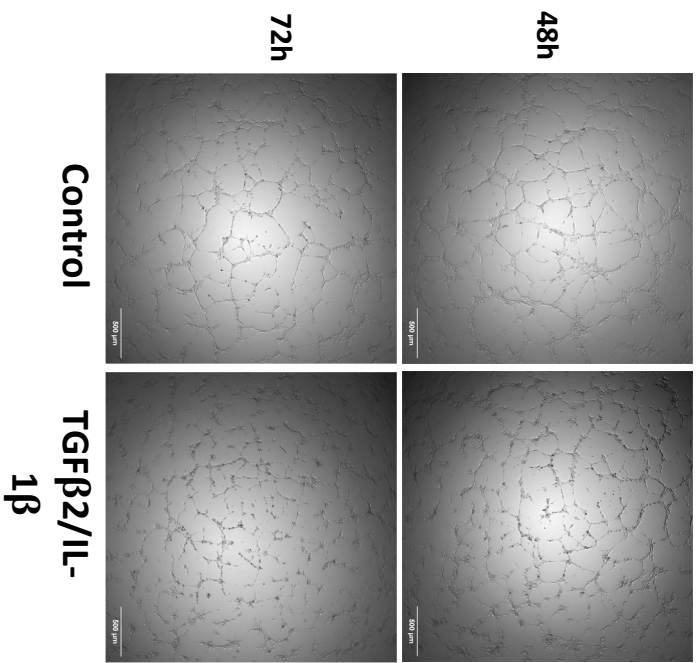
A



B

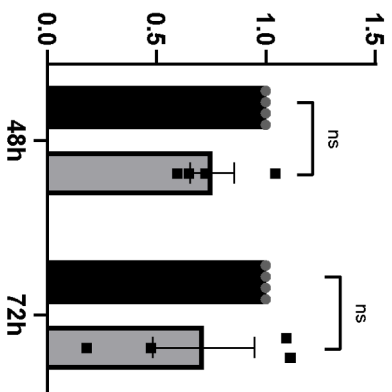


C



D

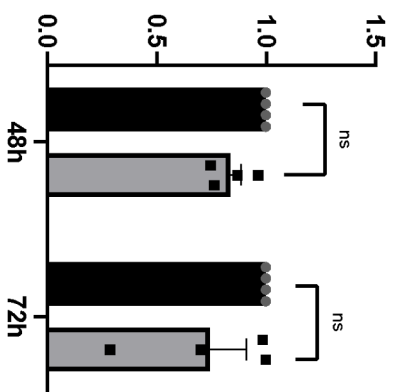
Number of meshes
(fold change relative to control)



■ Control
■ TGFβ2/IL-1β

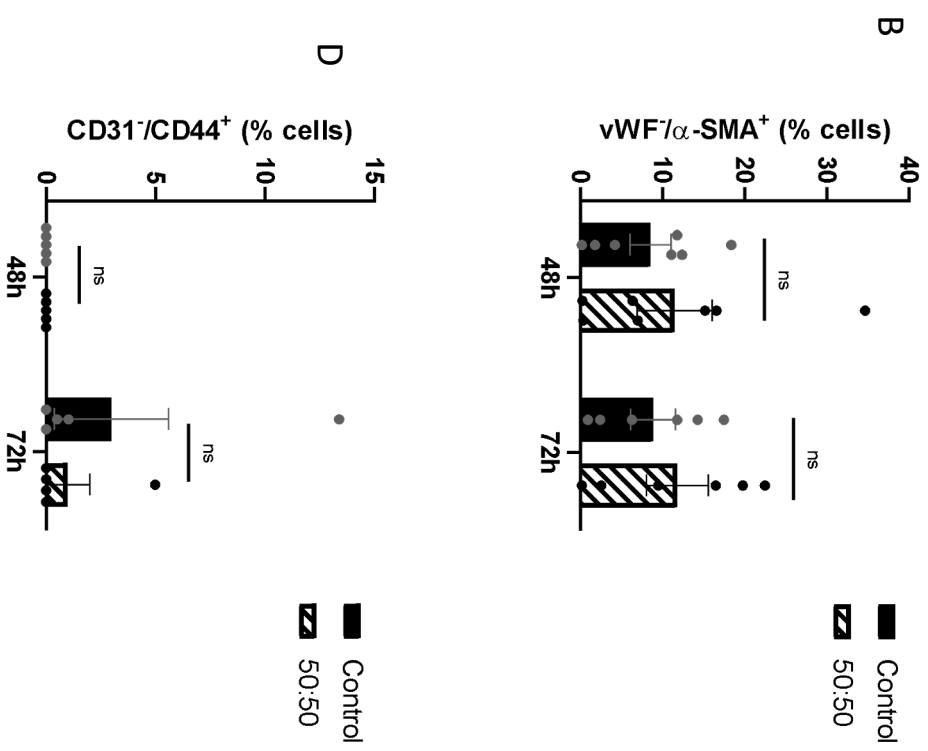
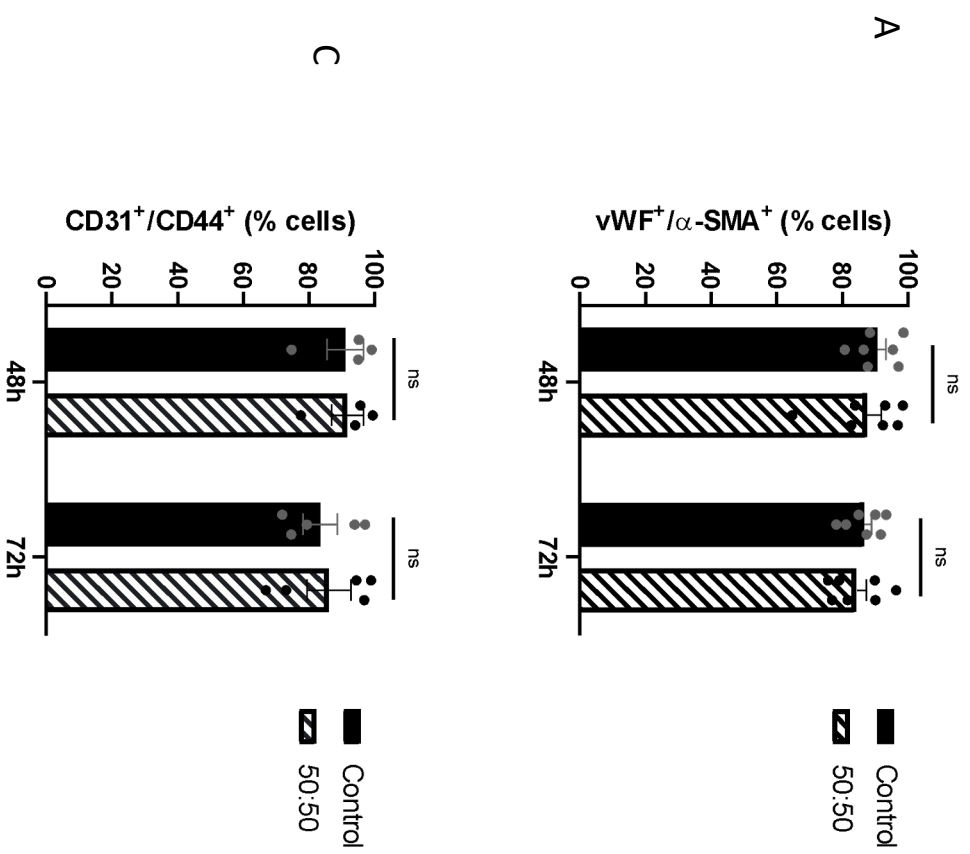
E

Total master segments length
(fold change to control)

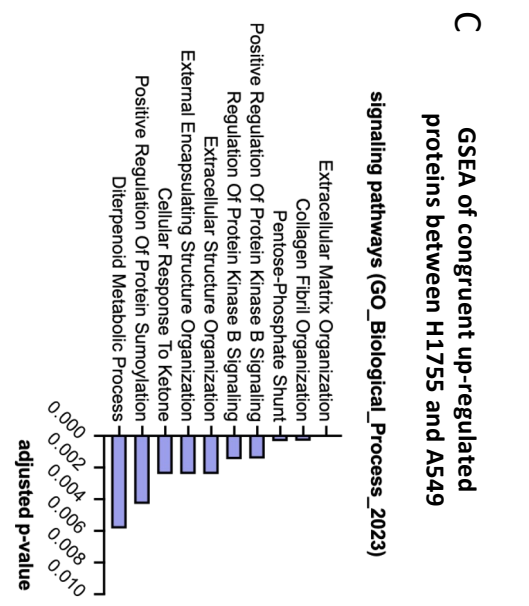
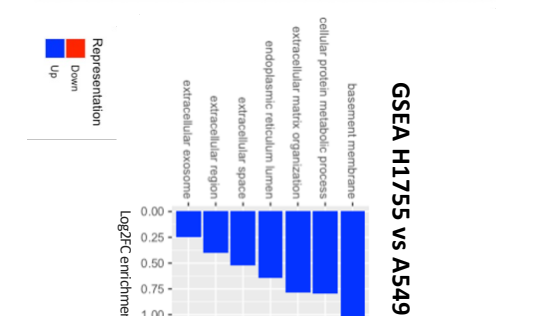
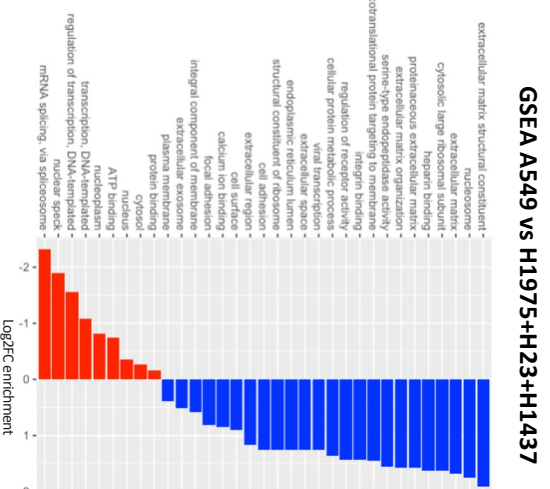
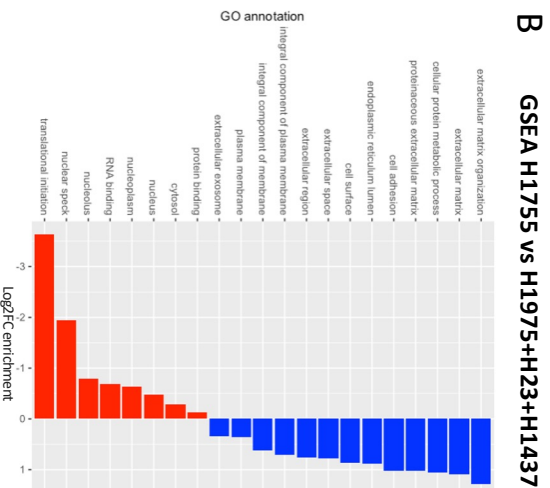
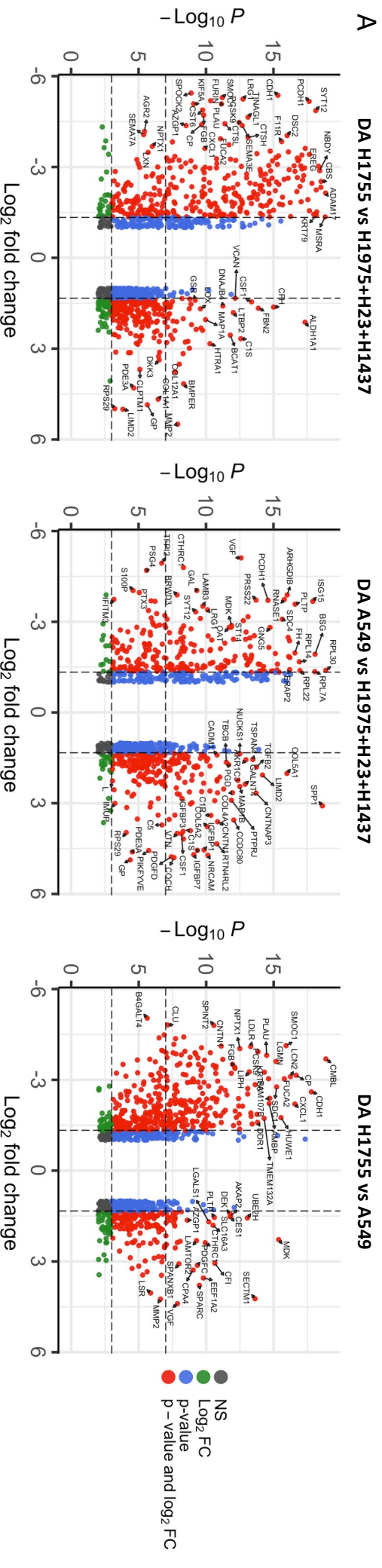


■ Control
■ TGFβ2/IL-1β

Supplemental Figure 3



Supplemental Figure 4



Titre : Modulation du compartiment vasculaire par les cellules tumorales de cancers pulmonaires et son impact sur le micro-environnement immunitaire.

Mots clés : Cancer pulmonaire, microenvironnement tumoral, cellule endothéliale, immunomodulation

Résumé : Les cancers du poumon sont responsables de plus de 1,8 million de décès dans le monde chaque année, dont le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) représentant 85% des cas. Aujourd'hui, l'immunothérapie est le traitement majeur du CBNPC et vise à inverser l'anergie des LTs intra-tumoraux et restaurer leur action antitumorale. Malgré leur efficacité, seulement 15 à 20% des patients sont répondeurs et de fait, une meilleure compréhension du micro-environnement tumoral (TME) est requise. Le compartiment vasculaire est une composante majeure du TME et favorise la croissance tumorale par l'angiogenèse, et en module l'infiltration du système immunitaire. Cependant, la capacité immunorégulatrice des cellules endothéliales (ECs) reste largement sous-étudiée. Dans cette étude nous avons cherché à caractériser les ECs issues de biopsies et de modèles d'études *in vitro* alternatifs.

Ces derniers visent à mimer les communications entre les cellules de CBNPC et des ECs. Notre hypothèse de travail était de déterminer si l'endothélium associé à la tumeur joue un rôle dans l'anergie ou l'activation des cellules immunitaires. Nos résultats montrent que les cocultures peuvent affecter la façon dont les ECs régulent l'inflammation et l'activité des LTs à travers la sécrétion de cytokines et l'expression de récepteurs de costimulation. En effet, les ECs ayant été conditionnées par les cellules tumorales diminuent la prolifération des LT CD4⁺ et participent à la mise en place d'un environnement immunosuppresseur en promouvant les LTs régulateurs et la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-tumoral M2-like. En conclusion, cette étude souligne l'importance du compartiment vasculaire dans l'immunomodulation du TME et l'importance de le prendre en considération pour l'optimisation de traitements dans le CBNPC.

Title : Modulating the vascular compartment by lung cancer cells and how it affects the immune microenvironment.

Keywords : Lung cancer, tumor microenvironment, endothelial cell, immunomodulation

Abstract : Lung cancer is responsible for more than 1.8 million deaths worldwide each year, with non-small cell lung cancer (NSCLC) accounting for 85% of cases. Today, immunotherapy is the leading treatment for NSCLC, aiming to reverse the anergy of intra-tumoral LTs and restore their anti-tumor activity. Despite their efficacy, only 15-20% of patients respond, thus a better understanding of the tumor microenvironment (TME) is needed. The vascular compartment is an important component of the TME. It promotes tumor growth through angiogenesis and modulates immune infiltration. However, immune regulatory capacity of endothelial cells (ECs) remains largely unstudied. In this study, we characterized ECs from biopsies and alternative *in vitro* models. These are designed

to mimic the communication between NSCLC cells and ECs. Our working hypothesis was to determine whether tumor-associated endothelium plays a role in immune cell anergy or activation. Our results show that cocultures can influence the way ECs regulate inflammation and LT activity through cytokine secretion and costimulatory receptor expression. Indeed, ECs conditioned by tumor cells decrease CD4⁺ LT proliferation and participate in the establishment of an immunosuppressive environment by promoting regulatory LTs and macrophage polarization toward a pro-tumor M2-like phenotype. In conclusion, this study highlights the importance of the vascular compartment in the immunomodulation of TME and the need to take it into account when optimizing treatments for NSCLC.