

Mémoire

Auteur : Adam, Lola

Promoteur(s) : Sadzot, Catherine

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2023-2024

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/21063>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Laboratoire de Virologie et d'Immunologie (Giga, CHU)

Promotrice : Pr. Catherine Sadzot

Encadrant : Maxime Dubois

Impact d'oHSV-P2G, un Herpès Virus oncolytique exprimant un antagoniste de CXCR4, sur la polarisation et la phagocytose des macrophages et de la microglie dans le contexte du Glioblastome

Lola Adam

-

Master en Biochimie et
Biologie moléculaire et cellulaire

-

Août/Septembre 2024

Université de Liège

-

Département
des Sciences de la Vie

-

Faculté des Sciences

Table des matières

I.	INTRODUCTION	1
1.	LE GLIOBLASTOME IDH <i>WILD-TYPE</i> : VUE D'ENSEMBLE	1
2.	LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL	2
2.1.	<i>Les cellules cancéreuses</i>	2
2.2.	<i>Les cellules immunitaires</i>	2
2.2.1.	Lignée lymphoïde	2
2.2.2.	Lignée myéloïde	3
2.3.	<i>L'hypoxie</i>	4
2.4.	<i>L'angiogenèse</i>	4
2.5.	<i>Les cytokines et chimiokines</i>	4
3.	LES MACROPHAGES ET LA MICROGLIE, DEUX INTERVENANTS CLES	5
3.1.	<i>Description</i>	5
3.2.	<i>La polarisation des TAMMs : le Yin et le Yang</i>	6
4.	LA PHAGOCYTOSE	8
4.1.	<i>Généralités</i>	8
4.2.	<i>Inhibition de la phagocytose par la tumeur</i>	9
5.	FONCTIONNEMENT DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL	10
6.	LA VOIE CXCL12/CXCR4	12
6.1.	<i>Généralités</i>	12
6.2.	<i>Implications</i>	13
6.2.1.	La migration des GSCs et la formation de récurrences	14
6.2.2.	L'angiogenèse	14
6.2.3.	L'immunosuppression	14
6.2.4.	Les implications thérapeutiques	14
7.	A LA RECHERCHE DE SOLUTIONS	15
7.1.	<i>Les traitements standards</i>	15
7.2.	<i>L'immunothérapie, une approche intéressante</i>	16
8.	LA VIROTHÉRAPIE ONCOLYTIQUE, LA SOLUTION ?	17
8.1.	<i>La virothérapie oncolytique</i>	17
8.2.	<i>Les virus oncolytiques</i>	18
8.3.	<i>Les méthodes d'administration des traitements par virothérapie</i>	18
9.	LE VIRUS DE L'HERPES SIMPLEX (HSV-1)	19
9.1.	<i>Description d'HSV-1</i>	19
9.2.	<i>HSV-1 en tant que virus oncolytique</i>	20
9.3.	<i>HSV-1 dans le cadre de cette étude</i>	23
II.	OBJECTIFS	25
III.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
1.	GENERALITES	26
2.	ETUDE DES MDMs	27
2.1.	<i>Buffy coat</i>	27
2.2.	<i>Analyse transcriptionnelle des marqueurs de polarisation des MDMs</i>	28
2.3.	<i>Étude de la capacité phagocytose de l'amyloïde par les MDMs</i>	28
3.	ETUDE DES HMC3	29
3.1.	<i>Analyse transcriptionnelle des marqueurs de polarisation des HMC3</i>	29
3.2.	<i>Étude de la capacité de phagocytose de l'amyloïde par les HMC3</i>	29
3.3.	<i>Étude de la capacité de phagocytose des GB138RFP par les HMC3</i>	30
4.	PRODUCTION VIRALE ET TEST DE QUALITÉ	30
4.1.	<i>Production et purification des virus oHSV-WT et oHSV-P2G</i>	30
4.2.	<i>Western blot</i>	31
5.	ANALYSES STATISTIQUES	31
6.	CONDITIONS EXPÉRIMENTALES	32
IV.	RÉSULTATS	33
1.	MISE EN CONTEXTE	33
2.	RESULTATS PRELIMINAIRES A LA BASE DE CETTE ETUDE	33

3.	ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE PAR RT-QPCR DE LA POLARISATION DES TAMMS	34
3.1.	<i>Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes M1-like et M2-like dans les MDMs</i>	34
3.1.1.	Polarisation des MDMs en un phénotype M1-like ou M2-like	34
3.1.2.	Polarisation des MDMs par le microenvironnement tumoral.....	36
3.1.3.	Effet d'oHSV-P2G sur la polarisation des MDMs	37
3.1.4.	Effet d'oHSV-P2G sur la polarisation des MDMs en présence d'IFN γ	39
3.2.	<i>Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes M1-like et M2-like dans les HMC3</i>	40
3.2.1.	Polarisation des HMC3 en un phénotype M1-like ou M2-like.....	40
3.2.2.	Polarisation des HMC3 par le microenvironnement tumoral	42
3.2.3.	Effet d'oHSV-P2G sur la polarisation des HMC3	43
3.2.4.	Effet d'oHSV-P2G sur la polarisation des HMC3 en présence d'IFN γ	44
4.	ANALYSE DE LA CAPACITE DE PHAGOCYTOSE DES TAMMS.....	46
4.1.	<i>Capacité de phagocytose des MDMs</i>	46
4.2.	<i>Capacité de phagocytose des HMC3</i>	48
4.2.1.	Effet du virus oHSV-P2G sur la phagocytose de l'amyloïde par la microglie.....	48
4.2.2.	Effet du virus oHSV-P2G sur la phagocytose des cellules de glioblastome par la microglie	50
V.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	52
VI.	CONCLUSION	59
VII.	BIBLIOGRAPHIE	61
VIII.	ANNEXES	66
1.	MATERIEL ET METHODES.....	66
2.	EXPERIENCES PRELIMINAIRES	71
3.	PHAGOCYTOSE	74

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma promotrice, Pr. Catherine Sadzot, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, et pour la confiance qu'elle m'a accordée, indispensable à la réalisation de ce mémoire. Merci de m'avoir permis de travailler sur ce projet si captivant, d'avoir suivi son développement avec attention, et d'avoir apporté une aide précieuse lors de sa rédaction.

Je souhaite également chaleureusement remercier mon encadrant, Maxime Dubois, pour m'avoir supervisée et conseillée tout au long de ce projet et de mon apprentissage. Merci d'avoir répondu à mes nombreuses questions, toujours avec patience et bienveillance, et de m'avoir guidée dans la rédaction de ce travail .

Je voudrais aussi remercier tous les membres du laboratoire, tant les employés que les autres mémorants, pour leur bonne humeur et l'ambiance de travail agréable qui ont accompagné ces semaines de recherche. Un merci tout particulier au Dr. Marielle Lebrun et à Cédric Lassence, pour leurs nombreux conseils et pour leur disponibilité.

Merci également aux différentes plateformes du Giga, avec lesquelles j'ai été en contact de près ou de loin, pour les formations que j'ai pu suivre et les conseils reçus, qui m'ont permis de mener à bien mes expériences.

Enfin, un grand merci à mon entourage, et en particulier à mes parents, pour leur soutien indéfectible tout long de mes études et leurs encouragements constants.

Liste des abréviations

Abréviations	
CD47	Cluster of Differentiation 47
CED	Convection Enhanced Delivery
CMHI/II	Complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I/II
CXCL12/SDF-1	Stromal Cell-derived Factor 1
E	Early
ECL	Electro-chimiluminescence
fA β	Fragments d'amyloïde β
FDA	Food and Drug Administration
GBM	Glioblastome IDH wild-type
GFP	Green Fluorescent Protein
GPCR	G Protein-coupled receptor
GSC	Glioblastoma Stems Like Cell
HIFs	Hypoxia Inducible Factors (facteurs induits par l'hypoxie)
HVEM	HerpesVirus Entry Mediator
IE	Immediate early
IFN γ	Interféron gamma
IL10	Interleukine 10
IL12	Interleukine 12
IL6	Interleukine 6
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
ITIMs	Immune-receptor Tyrosine-based Inhibition Motifs
L	Late
LPS	Lipopolysaccharide
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MDMs	Macrophages Derived Monocytes
MDSCs	Myeloid-Derived Suppressor Cells (cellules myéloïdes suppressives)
MFI	Median Fluorescence Intensity
MMP	Métalloprotéinase
NSC	Neural Stem Cell (cellule souche neurale)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMPs	Pathogen-Associated molecular patterns (Motifs moléculaires associés aux pathogènes)
RFP	Red Fluorescent Protein
RR	Ribonucléotide réductase
RT-qPCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SIRP α	Signal Regulatory Protein alpha
SNC	Système nerveux central
SVZ	Subventricular Zone (zone sous-ventriculaire)
TAM	Tyro3, Axl, Mer

TAMMs	Tumor Associated Macrophages and Microglia (macrophages et microglie associés à la tumeur)
TAP	Transporter Associated with Antigen Presentation
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TLR	Toll-Like Receptor
TME	Tumor Micro-environment (micro-environnement tumoral)
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
TREM-2	Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells 2
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VZV	Varicella-Zoster Virus

I. Introduction

1. Le glioblastome IDH *wild-type* : vue d'ensemble

Le glioblastome IDH *wild-type* (GBM, **Figure 1**) est une tumeur cérébrale primaire, classée comme grade 4 selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en raison de ses caractéristiques histologiques, pathologiques et moléculaires¹⁻⁴. Le GBM représente 14,3% des tumeurs toutes confondues et 33% des tumeurs du système nerveux central (SNC)^{4,5}. Il s'agit de la forme de gliomes la plus fréquente (50%) et la plus létale^{3,6,7}. Son agressivité réduit l'espérance de vie médiane à seulement 15 mois, avec un âge médian de diagnostic de 65 ans^{1,8,9}.

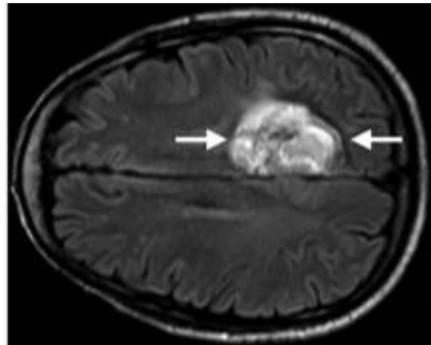


Figure 1. Glioblastome IDH *wild-type* grade 4 (OMS). Image IRM transversale de la tumeur fronto-pariétale d'une patiente de 64 ans. Les flèches indiquent la tumeur¹⁰.

Les facteurs à l'origine du développement du GBM ne sont pas encore bien établis. Bien que l'exposition à de fortes doses de rayonnements ionisants soit pointée du doigt, d'autres facteurs tels que l'obésité ou les antécédents cancéreux familiaux pourraient également jouer un rôle, le principal facteur de risque restant l'âge^{3,9}. L'origine exacte du développement du GBM est encore en discussion. Une des théories suggère que les cellules à l'origine du GBM seraient les cellules souches neurales (*Neural Stem Cells*, NSCs) et/ou les précurseurs des cellules gliales, car elles conservent la capacité de se diviser, ce qui rend leur ADN plus sensible aux mutations^{9,11}. Une deuxième théorie met plutôt en cause les astrocytes et/ou les cellules gliales déjà matures, qui se différencient avant de devenir cancéreuses¹².

Le GBM se développe principalement au niveau des lobes frontaux et temporaux ainsi que du cervelet⁴. Il est hautement hétérogène tant au niveau intra- qu'inter-tumoral⁸. Il est constitué de cellules tumorales, mais également de divers types cellulaires (cellules immunitaires, cellules endothéliales, ...) gravitant autour de la tumeur^{8,13,14}. L'hétérogénéité intra-tumorale se marque par la présence de sous-populations de cellules co-existantes, avec des caractéristiques cellulaires et moléculaires différentes¹⁵. Cela permet à la tumeur de s'adapter à divers microenvironnements cérébraux et de faire face au système immunitaire

et aux traitements. De plus, il existe une grande hétérogénéité entre les patients, dont les tumeurs montrent des évolutions et des réponses aux traitements variées^{15,16}.

Le GBM se développe au sein d'un microenvironnement tumoral (*Tumor Micro-environment*, TME) complexe, particulièrement immunosuppresseur (microenvironnement dit « froid ») et caractérisé par une angiogenèse et une hypoxie marquées¹⁷. Il montre une prolifération cellulaire importante ainsi qu'une capacité à envahir d'autres sites du cerveau et à recruter différents types cellulaires^{6,18}. Le TME entraîne une résistance aux traitements standards (décrits au point 7) et des phénomènes de récurrences, contribuant à son mauvais pronostic vital^{6,8}.

2. Le microenvironnement tumoral

L'agressivité du GBM est principalement médiée par le TME, un réseau complexe d'interactions formé entre la tumeur, les cellules résidentes du cerveau et les cellules immunitaires^{6,13,19}. Ce réseau se forme par contacts cellule-cellule et par la sécrétion de facteurs et de cytokines impliquant diverses voies signalétiques¹⁹. Il forme un environnement angiogénique, hypoxique et immunosuppresseur, favorable au maintien, à la progression et à la récurrence de la tumeur^{6,8,14,19-21}.

2.1. Les cellules cancéreuses

Comme décrit brièvement au point 1, le GBM montre une forte hétérogénéité et plasticité, avec diverses sous-populations cellulaires présentant des caractéristiques cellulaires et moléculaires différentes^{13,15}. Une des sous-populations primordiales dans l'agressivité de la tumeur concerne les cellules appelées « *Glioblastoma Stem Like Cells* » (GSCs)^{3,14}. Il s'agit de cellules de GBM présentant des caractéristiques de cellules souches, qui leur donnent la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en plusieurs lignées cellulaires neuronales^{6,9}. Elles restent, par contre, majoritairement quiescentes, les rendant résistantes aux traitements qui ciblent les cellules en division⁶. Les GSCs sont connues également pour leur capacité de migration, dans des zones du cerveau inaccessibles à la résection⁹. La chirurgie et les thérapies étant inefficaces sur les GSCs, ces cellules souches sont donc responsables de récurrences, en se différenciant en cellules tumorales, qui à leur tour prolifèrent et forment de nouvelles tumeurs¹³. Elles sont *in fine* en grande partie responsables du mauvais pronostic des patients atteints de GBM^{3,22}.

2.2. Les cellules immunitaires

2.2.1. Lignée lymphoïde

Le TME est constitué tout d'abord des cellules de la lignée lymphoïde, représentée notamment par les lymphocytes T, composants majeurs du système immunitaire adaptatif^{13,23}. Ces derniers sont classés en plusieurs sous-types, sur base des molécules de surface qu'ils expriment et de leurs fonctions respectives²⁴. Parmi ces sous-types, les cellules T cytotoxiques (CD8+) jouent un rôle clé dans la protection

contre les pathogènes intracellulaires, par leur capacité à tuer les cellules cibles²³. Ils participent aussi à la réponse antitumorale et sont responsables notamment de l'éradication des cellules cancéreuses^{13,24}. Les cellules T helper (CD4+) et les cellules T régulatrices (CD4+ FOXP3+) coordonnent l'immunité via la production de cytokines impactant l'activité des autres cellules de l'immunité²⁴. Les T helper ont plutôt un pouvoir activateur sur les T cytotoxiques et les macrophages²⁴. Ils participent à la protection de l'hôte contre les corps étrangers par production de cytokines pro-inflammatoires (Interféron gamma, IFN γ) et jouent également un rôle antitumoral²⁵. A contrario, les T régulatrices sont des cellules immunosuppressives qui permettent de maintenir la tolérance immunitaire par production de cytokines anti-inflammatoires comme l'Interleukine 10 (IL10), ou le *Transforming Growth Factor β* (TGF- β)²³. Cette fonction les amène à jouer un rôle plutôt pro-tumoral dans le cadre des cancers.

Bien que les cellules T ne représentent qu'environ 2% de la tumeur, elles jouent un rôle important dans la réponse immunitaire antitumorale^{13,24}. Elles sont en revanche impactées par le TME, aboutissant à des dysfonctions et impactant le pronostic vital des patients²⁴. Dans le contexte du GBM, les cellules T cytotoxiques, bien que majoritaires par rapport aux cellules T helper et T régulatrices, sont souvent non effectives¹³. De plus, les T régulatrices sont particulièrement recrutées au niveau de la tumeur, contribuant à l'environnement immunosuppresseur, en inhibant la réponse immunitaire médiée par les T cytotoxiques^{9,13,24}. L'influence des cellules T, à la fois positive et négative sur le développement des cancers, les rend particulièrement décrites dans la littérature scientifique^{13,24}.

2.2.2. Lignée myéloïde

En termes de proportion, la lignée myéloïde est majoritairement représentée au sein du TME, constituant près de 30 à 40% des cellules de la tumeur¹³. Cette lignée inclut les cellules myéloïdes suppressives (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*, MDSCs), les cellules dendritiques et les neutrophiles, mais également les macrophages et la microglie associés à la tumeur (*Tumor Associated Macrophages and Microglia*, TAMMs)¹³. En plus d'être la population la plus importante, les TAMMs représentent la première ligne de défense du cerveau via leurs différentes fonctions, dont la phagocytose^{26,27}. Toutefois, dans le contexte du GBM, les TAMMs sont principalement représentés par le phénotype dit *M2-like* (décrit au point 3), impliqué dans la réponse pro-tumorale/anti-inflammatoire du système immunitaire, favorisant l'immunosuppression du TME, et dans l'invasion des cellules tumorales, en impactant le remodelage de la matrice extracellulaire^{6,20,28}. Ils sont associés au développement et à la progression de la tumeur ainsi qu'au mauvais pronostic des patients, ce qui en fait une cible thérapeutique majeure^{13,20}.

2.3. L'hypoxie

Le GBM est caractérisé par une forte hypoxie, désignant le manque d'apport en oxygène^{19,29}. La teneur en oxygène varie considérablement entre les différentes régions du SNC²⁹. Une faible teneur en oxygène participe notamment au maintien des cellules souches neurales²⁹. Dans le contexte du GBM, l'hypoxie s'installe lorsque la demande en oxygène due à la prolifération des cellules tumorales dépasse l'apport en oxygène fourni par diffusion et angiogenèse¹⁹. Le centre de la masse tumorale, devenant très dense, est isolé de toute source de nutriments et d'oxygène, le rendant particulièrement hypoxique. L'hypoxie est cruciale pour le développement tumoral car elle favorise la néo-angiogenèse, la résistance aux thérapies, l'invasion tumorale et le maintien des cellules souches cancéreuses^{19,29}. Ces aspects sont médiés par l'expression accrue de facteurs induits par l'hypoxie (*Hypoxia Inducible Factors*, HIF), qui activent diverses voies de signalisation²¹. Une voie particulièrement activée est celle qui contrôle la néo-angiogenèse, via le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)²¹. Les nouveaux vaisseaux sanguins apportent oxygène et nutriments, favorisant la prolifération cellulaire, et créant ainsi un nouveau centre hypoxique²¹.

2.4. L'angiogenèse

L'angiogenèse particulièrement prononcée au sein du GBM le distingue des gliomes de grades inférieurs³⁰. Ce processus aboutit à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, nécessaires à la bonne irrigation des tissus et des organes, et est hautement régulé dans des conditions physiologiques³¹. Cette régulation dépend de l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques³¹. L'hypoxie favorise l'angiogenèse, en stimulant la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le TGF- β ou encore l'angiopoïétine³¹. Dans le contexte du GBM, l'augmentation de la vascularisation peut être liée à une prolifération endothéliale à partir de vaisseaux préexistants, ou à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en réponse aux facteurs angiogéniques relargués par les cellules tumorales³⁰. Cette vascularisation soutient le développement tumoral en fournissant les importantes quantités d'oxygène et de nutriments nécessaires³². De plus, certaines études ont montré la présence de vaisseaux sanguins formés par des cellules tumorales³³. Ce phénomène, appelé mimétisme vasculaire, résulte de la capacité des cellules tumorales à acquérir des caractéristiques endothéliales et ainsi à former des pseudo-vaisseaux sanguins^{21,33}. La tumeur utilise cette source alternative en nutriments et en oxygène afin de répondre à ses besoins élevés^{21,33}.

2.5. Les cytokines et chimiokines

Le TME comprend également des cytokines (< 70 kDa) et des chimiokines (cytokines chimio-attractives, 8-14 kDa). Il s'agit de protéines de signalisation, sécrétées de manière autocrine, paracrine ou endocrine, et qui régulent le développement embryonnaire, l'hématopoïèse et la réponse immunitaire³⁴. Diverses cytokines et chimiokines sont spécifiquement décrites dans le cadre du GBM. Elles jouent un rôle clé dans

la formation du TME et permettent les interactions entre toutes les cellules qui le composent. Le GBM engendre d'ailleurs une expression particulière de ces molécules, impactant son développement et sa progression³⁴.

3. Les macrophages et la microglie, deux intervenants clés

Comme décrit avant, les macrophages et la microglie associés aux tumeurs (*Tumor Associated Macrophages and Microglia*, TAMMs) font partie intégrante du TME, dont ils constituent une part importante, tant au niveau de leur proportion, qu'au niveau de leur rôle dans le développement tumoral.

3.1. Description

De manière générale, les macrophages sont des cellules immunitaires polyvalentes capables de phagocyter les cellules mortes ou endommagées, les protéines mal repliées, les pathogènes et les débris, ainsi que de réaliser la présentation des antigènes^{19,35}. Ils jouent un rôle dans l'homéostasie et dans la physiologie lors du développement et constituent une partie essentielle de l'immunité innée¹³.

La microglie quant à elle, représente les cellules immunitaires résidentes du cerveau et les seules cellules myéloïdes du parenchyme cérébral, et constitue jusqu'à 20% des cellules gliales^{26,35,36}. Elle est impliquée dans le développement du cerveau et son homéostasie, en interagissant avec les cellules gliales et les neurones et en favorisant l'angiogenèse^{6,20,26,35,36}. La microglie est très malléable en termes de morphologie, de phénotype et de fonction pour répondre aux besoins du cerveau selon les signaux perçus³⁷. La microglie est présente notamment au niveau de la zone sous-ventriculaire (SVZ), où elle exprime certains marqueurs qui stimulent la neurogenèse³⁸. Elle est aussi impliquée dans la régulation de l'architecture synaptique du cerveau par son activité phagocytaire, intervenant également pour les cellules endommagées, les débris cellulaires et les pathogènes^{6,35,36}. En tant que première ligne de défense immunitaire du cerveau, elle joue un rôle crucial dans la réponse immunitaire du SNC³⁶.

Les TAMMs sont très hétérogènes en termes d'origine, de localisation et de fonction⁸. Bien que la microglie et les macrophages aient des origines et des localisations différentes, ils partagent des fonctions similaires, avec des marqueurs communs mais des signatures phénotypiques différentes^{6,39}. Les macrophages, produits à l'âge adulte, proviennent des monocytes de la moelle osseuse, tandis que la microglie, dérive de précurseurs érythro-myéloïdes du sac vitellin lors du développement embryonnaire^{5,6,8,19,20,36}. Dans le GBM, les macrophages sont généralement sédentaires et se trouvent principalement dans les zones vasculaires, tandis que la microglie est stationnaire et ramifiée, se localisant au niveau des zones péri-tumorales⁸.

3.2. La polarisation des TAMMs : le Yin et le Yang

Dans un contexte tumoral, les TAMMs constituent la plus grande population de cellules infiltrantes³⁹. Bien qu'aux premiers abords ils contribuent à l'homéostasie du cerveau, ils sont aussi associés à la progression de la tumeur et au mauvais pronostic des patients³⁹. Ceci est dû à leur plasticité phénotypique et à leur diversité fonctionnelle importantes^{13,19}. Cette caractéristique commune leur permet d'adopter un large panel de fonctions et de profils d'expression, en réponse à différents signaux, comme la présence de pathogènes, de cellules cancéreuses, ou de lésions^{6,8,13}. Dans le cadre du GBM, les cytokines anti-inflammatoires sécrétées par les cellules tumorales modulent le phénotype des TAMMs, en leur conférant des propriétés immunosuppressives, permettant aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire et de se mettre dans des conditions propices à leur développement^{20,40}.

Les TAMMs présentent un spectre phénotypique allant de *M1-like* dits pro-inflammatoires/antitumoraux, à *M2-like* dits anti-inflammatoires/pro-tumoraux selon les signaux perçus^{6,20,28}. Cette classification simplifiée, issue d'expériences immunologiques *in vitro*, s'inspire de la dichotomie T helper 1/T helper 2 et représente des phénotypes extrêmes^{6,19,28}. En réalité, il existe une gamme complexe de phénotypes intermédiaires, avec des marqueurs *M1-like* et *M2-like* co-existant mais s'antagonisant mutuellement^{5,19,28}. Les TAMMs peuvent donc exprimer des facteurs à la fois *M1-like* et *M2-like*¹³. La polarisation est un processus dynamique, permettant aux phénotypes *M1-like* et *M2-like* de s'inverser en réponse à divers stimuli^{6,20}. Quant aux cellules présentes en conditions physiologiques, dites M0, elles ne coïncident pas tout à fait au centre du spectre, mais représentent en réalité une version atténuée des *M2-like*⁶.

La balance entre les phénotypes *M1-like* et *M2-like* est importante en conditions physiologiques, car toute dérégulation peut entraîner des dysfonctionnements de la réponse immunitaire⁴¹. En effet, les TAMMs *M1-like* permettent de contrer l'infection en induisant une réponse immunitaire inflammatoire, tandis que les *M2-like* induisent ensuite une réponse anti-inflammatoire favorisant la réparation des tissus endommagés et le retour à une situation homéostatique⁴¹.

Les TAMMs convergent vers un phénotype *M1-like* en réponse à l'Interféron gamma (l'IFN γ), relargué par les leucocytes en cas d'inflammation, ou au lipopolysaccharide (LPS), en cas d'infection bactérienne^{5,40} (**Figure 2**). Ils produisent alors à leur tour des cytokines pro-inflammatoires telles que le *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF α), l'Interleukine 6 (IL6), ou l'Interleukine 12 (IL12), responsables de la réponse pro-inflammatoire et antitumorale^{28,42}. L'activation des TAMMs *M1-like* permet d'alerter le système immunitaire adaptatif via la présentation d'antigènes, d'inhiber l'angiogenèse et d'activer la réponse des *T helper* et des cellules *Natural Killer* (NK)^{6,20,43}. Dans le contexte du GBM, ce phénotype activé classique est associé à une réponse immunitaire vigoureuse contre les cellules tumorales⁶.

En présence de cytokines anti-inflammatoires, comme IL4, IL10, ou TGF- β , les TAMMs adoptent un phénotype *M2-like*^{5,40} (**Figure 2**). Les *M2-like* relarguent alors des cytokines et facteurs anti-inflammatoires/pro-tumoraux comme TGF- β , IL10, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), MMP (métalloprotéinase), et CXCL12 afin de diminuer la réponse immunitaire^{5,6,43}. Dans un contexte sain, les *M2-like* jouent un rôle important car ils permettent d'arrêter et/ou de réguler l'inflammation induite par les *M1-like*. Néanmoins, dans un contexte cancéreux, ils sont associés à la progression de la maladie, en promouvant l'angiogenèse et en maintenant l'auto-renouvellement des cellules cancéreuses^{13,20,28,43}. Par ailleurs, ils contrecarrent la réponse immunitaire en inhibant les cellules T cytotoxiques, mais aussi en induisant la maturation des CD4+ en T régulatrices, leur prolifération et leur recrutement^{13,28,43}. Ce recrutement est rendu possible par la sécrétion des MMPs qui participent au remodelage de la matrice extracellulaire⁴³. Les *M2-like* sont également connus pour être associés à la résistance aux thérapies contre le GBM^{28,44}.

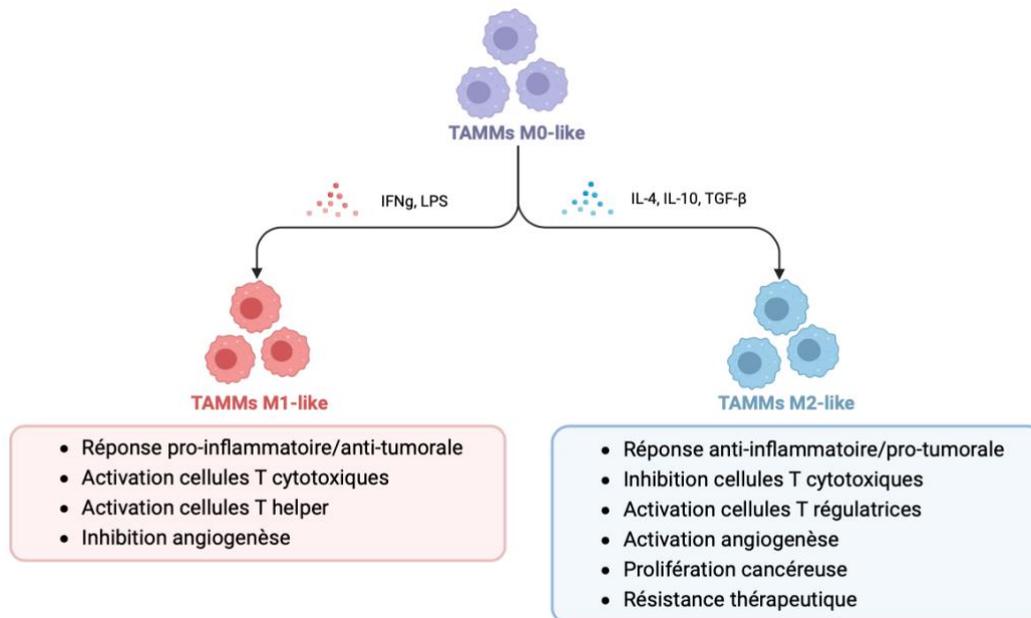


Figure 2. Polarisation des TAMMs en un phénotype M1-like ou M2-like. Les macrophages et la microglie associés à la tumeur (Tumor Associated Macrophages and Microglia, TAMMs) présentent une plasticité phénotypique importante. Ils convergent vers un phénotype M1-like en réponse à l'Interféron gamma (IFN γ) ou au lipopolysaccharide (LPS). Ce phénotype est responsable de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, induisant une réponse immunitaire anti-tumorale. Il est également associé à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et T helper et à l'inhibition de l'angiogenèse. Les TAMMs convergent vers un phénotype M2-like en réponse à l'Interleukine 4 (IL4), à l'Interleukine 10 (IL10) ou au Transforming Growth Factor β (TGF- β). Ce phénotype est responsable de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, induisant une réponse immunitaire pro-tumorale. Il est également associé à l'inhibition des lymphocytes T cytotoxiques, à l'activation des lymphocytes T régulateurs, à l'activation de l'angiogenèse, à la prolifération des cellules cancéreuses et à la résistance aux thérapies anti-cancéreuses. Figure réalisée avec BioRender.

4. La phagocytose

La description du GBM et de son TME a montré un rôle important des TAMMs dans le contexte de la réponse immunitaire, par leur implication majeure dans le caractère immunologiquement « froid » du GBM. Les TAMMs sont également connus pour assurer la phagocytose, qui est une fonction importante de la réponse immunitaire dans le cadre de tumeurs.

4.1. Généralités

Le terme « phagocytose » est d'origine grecque, et signifie « le processus cellulaire de manger »²⁷. Il s'agit « de reconnaître, d'engloutir et de digérer des organismes ou des structures »²⁷. Ce processus repose sur l'interaction entre les cellules ou débris cibles et les cellules phagocytaires⁴⁵. Les cellules présentatrices d'antigènes (APC) telles que les cellules dendritiques, les monocytes, les neutrophiles et les macrophages réalisent la phagocytose et la présentation des antigènes qui en dérivent^{27,46}. Elles servent de lien entre l'immunité innée et adaptative⁴⁶. Dans le SNC, ce rôle est assuré par les cellules de microglie²⁷. Bien que les astrocytes et les cellules gliales aient également la capacité de phagocyter, la microglie se distingue par son efficacité²⁶. Dans le contexte du GBM, l'activité phagocytaire des TAMMs est influencée par le TME et par les cellules tumorales²⁶.

La phagocytose est induite par l'exposition de signaux « eat-me » ou par la diminution de signaux « don't eat-me » à la surface des cellules²⁶. Ce processus est médié par différents récepteurs et les voies de signalisation associées, qui participent à la polymérisation et à la réorganisation de l'actine, permettant l'engloutissement de la cellule cible via la formation d'un phagosome^{26,47}. La phagocytose se déroule en trois étapes, chacune associée à des signaux spécifiques, « find-me », « eat-me » et « digest-me »^{47,48}. La première étape, correspondant à la reconnaissance de la cible (« find-me »), repose sur l'interaction récepteur/ligand^{47,48}. Ensuite, l'internalisation de la cible (« eat-me ») est réalisée par formation d'un phagosome, grâce au réarrangement du cytosquelette^{47,48}. Enfin, la digestion (« digest-me ») correspond à la fusion du phagosome avec les lysosomes, formant le phagolysosome, qui permet la dégradation enzymatique de la cible^{47,48}. Différents types de récepteurs sont activés selon les molécules signales rencontrées, avec un certain degré de spécificité^{26,47}. Les Toll-like receptors (TLRs) sont impliqués dans la reconnaissance des pathogènes via les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPS) tels que le LPS, les nucléotides viraux et les fragments d'amyloïde β (A β). Les TAMs (Tyro3, Axl, Mer) reconnaissent les cellules en apoptose et les *Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells 2* (TREM-2) reconnaissent les cellules mortes et les protéines agrégées^{26,47}. D'autres récepteurs, souvent non identifiés, participent également à la phagocytose^{26,47}.

4.2. Inhibition de la phagocytose par la tumeur

Les cellules cancéreuses sont capables d'échapper à la phagocytose par expression de signaux « don't eat-me » propres aux cellules saines, notamment celui lié à l'axe de signalisation CD47 (*Cluster of Differentiation 47*)/SIRP α (*Signal Regulatory Protein alpha*), qui est une voie responsable de l'inhibition de la phagocytose^{3,49}. CD47, exprimé par les cellules saines, agit en envoyant un signal « don't eat me » par liaison au récepteur SIRP α des cellules phagocytaires du système immunitaire inné³. Au niveau du système nerveux, CD47 protège les synapses actives de l'action des cellules de la microglie⁴⁹.

SIRP α se trouve dans une zone éloignée de la synapse phagocytaire, riche en phosphatases, qui empêchent son activation²⁷. Lorsque CD47 se lie au domaine NH2 terminal (domaine extracellulaire) du récepteur SIRP α , il en modifie la localisation vers une région riche en kinases Src^{49,50}. Ces kinases phosphorylent les *Immune-receptor Tyrosine-based Inhibition Motifs* (ITIMs) présents dans le domaine intracellulaire de SIRP α ^{49,50}. Cela recrute et active des phosphatases-tyrosine SHP-1/SHP-2, qui déphosphorylent d'autres molécules en aval, empêchant le dépôt de myosine IIA à la synapse phagocytaire, bloquant ainsi la phagocytose^{42,50} (**Figure 3**).

De nombreux cancers échappent au système immunitaire inné en surexprimant CD47, qui sert de molécule anti-phagocytose (signal « don't eat me ») en surpassant les signaux « eat-me »⁴⁹. Cela est observé dans le cadre du GBM, et en particulier chez les GSCs, où CD47 se lie au récepteur SIRP α présent à la surface des TAMMs^{20,50}.

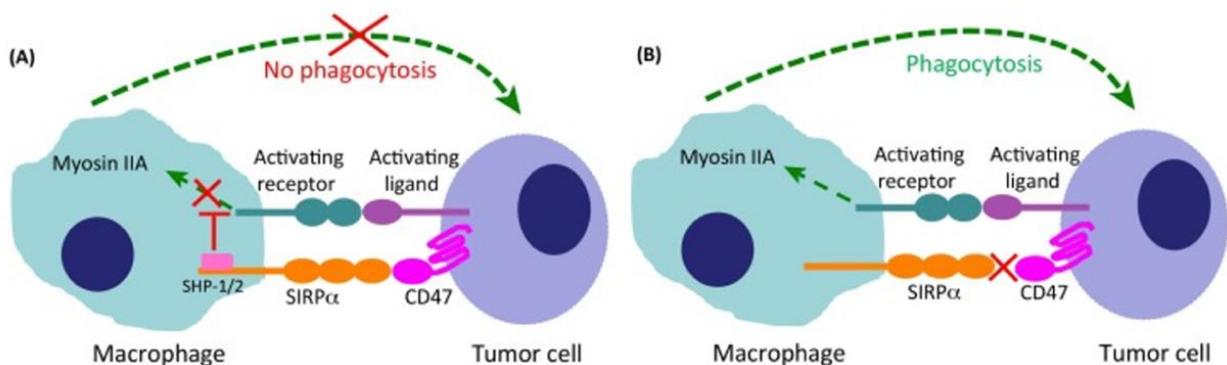


Figure 3. Axe de signalisation CD47/SIRP α . A. Inhibition de la phagocytose par interaction entre CD47 et SIRP α . B. Activation de la phagocytose lorsque CD47 ne lie pas SIRP α . L'axe de signalisation CD47/SIRP α est utilisé par les cellules cancéreuses afin d'échapper à la phagocytose par les macrophages et la microglie associés à la tumeur (Tumor Associated Macrophages and Microglia, TAMMs). La protéine CD47 exprimée par les cellules cancéreuses se lie au domaine extracellulaire du récepteur SIRP α exprimé par les TAMMs. Ceci induit la phosphorylation du domaine intracellulaire de SIRP α , ce qui active les phosphatases-tyrosine SHP-1/2, qui empêchent le dépôt de myosine IIA, bloquant la phagocytose⁵¹.

5. Fonctionnement du microenvironnement tumoral

Les principaux types cellulaires, les facteurs et les molécules constituant le TME entretiennent des liens étroits et s'influencent mutuellement, ce qui impacte la dynamique du GBM (**Figure 4**). L'ensemble des interactions complexes entre les composants du TME lui permet de moduler le système immunitaire, en créant un environnement dit « immunologiquement froid », qui se rajoute à l'immunogénicité intrinsèquement faible des gliomes^{19,21}. Ce contexte contribue à la progression du GBM et à sa résistance aux traitements, qui sont *in fine* responsables du mauvais pronostic vital des patients²⁰.

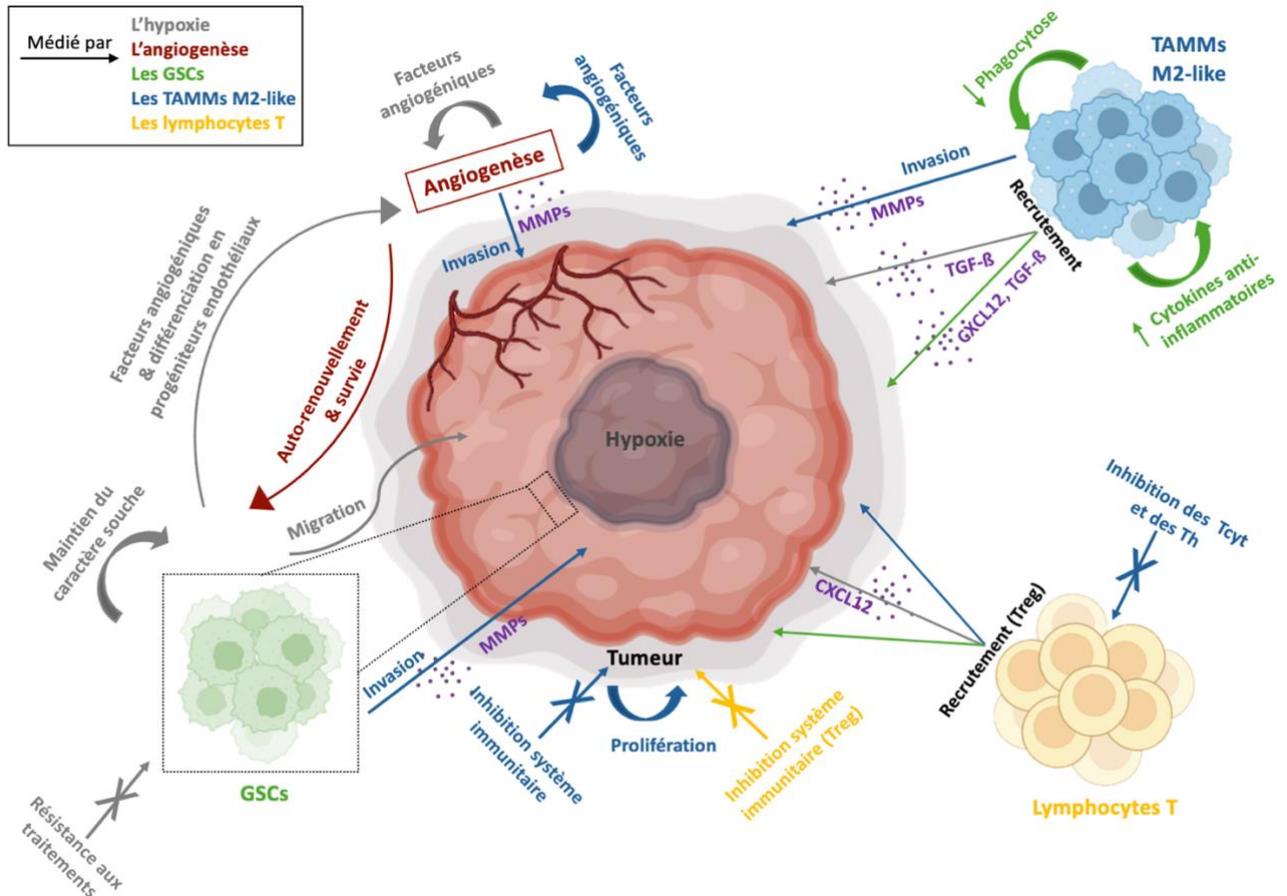


Figure 4. Le microenvironnement tumoral (TME) du GBM, ses intervenants et leurs interactions. Le TME est composé des cellules cancéreuses (dont les Glioblastoma Stem Like Cells, GSCs), des cellules immunitaires (dont les macrophages et la microglie associés à la tumeur (Tumor Associated Macrophages and Microglia, TAMMs) et les lymphocytes T). Il est caractérisé par une hypoxie et une angiogenèse importantes. Les composants entretiennent des liens par contact cellule-cellule et par production de cytokines. L'hypoxie maintient le caractère souche des GSCs, permet leur migration vers d'autres sites et les rend résistantes aux traitements. Ceci permet aux GSCs de constituer un pool de cellules prêtes à former des récurrences. L'hypoxie stimule l'angiogenèse en régulant les facteurs pro-angiogéniques et en promouvant la différenciation des GSCs en précurseurs endothéliaux. L'angiogenèse influence à son tour les GSCs en favorisant leur auto-renouvellement et leur survie. Les TAMMs sont recrutés par la sécrétion de TGF-β (Transforming Growth Factor β) induite par l'hypoxie, et par sécrétion de TGF-β et de la chimiokine chimio-attractante CXCL12 par les GSCs. Ils sont influencés en un phénotype M2-like, diminuant leur capacité de phagocytose et augmentant leur sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. Ils sont alors responsables de l'inhibition du système immunitaire, de la prolifération des cellules tumorales et de l'inhibition de la réponse médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (Tcyt) et des T helpers (Th). Ils sécrètent des métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui permettent l'invasion des GSCs, des cellules progénitrices endothéliales et leur propre migration. Les Lymphocytes T régulateurs (Treg) sont recrutés en conditions hypoxiques par attraction de CXCL12, par les TAMMs M2-like et par les GSCs. Ils sont responsables également de l'inhibition du système immunitaire face au GBM. Les TAMMs M2-like et les T reg façonnent le contexte immunologiquement « froid » du GBM. Figure réalisée avec BioRender et PowerPoint.

Au début du développement du GBM, les TAMMs présentent majoritairement un phénotype *M1-like*, pro-inflammatoire²⁰. Cependant, à mesure que la tumeur progresse, les TAMMs sont recrutés vers le site tumoral et polarisent en un phénotype *M2-like*, pro-tumoral^{1,18,20}. Ce phénotype *M2-like* devient prédominant, et contribue activement au caractère immunologiquement « froid » du GBM.

Le recrutement de TAMMs *M2-like* est étroitement lié à l'hypoxie et aux GSCs⁶. L'hypoxie modifie en effet le pattern d'expression de chimiokines du TME, notamment en augmentant l'expression de TGF- β , qui favorise le recrutement des TAMMs au site de la tumeur⁶. Les GSCs sont également responsables du recrutement des TAMMs, par sécrétion de chimiokines et de facteurs attractants^{6,29}. En plus de les recruter, les GSCs polarisent les TAMMs en un phénotype *M2-like* par sécrétion de divers facteurs, comme TGF- β ^{13,28,39,40}. Les GSCs accentuent le caractère immunosuppresseur des TAMMs *M2-like*, en diminuant leur capacité de phagocytose et en augmentant leur production de cytokines anti-inflammatoires [64]. Le recrutement des TAMMs et leur polarisation *M2-like* sont principalement médiés par la voie de signalisation CXCL12/CXCR4 (décrite au point 6), où les GSCs sécrètent la chimiokine chémo-attractante CXCL12, attirant ainsi les TAMMs exprimant le récepteur CXCR4^{6,13,20}. Ceci est accentué par les conditions hypoxiques qui modifient l'expression des chimiokines dans les niches du GBM et du récepteur CXCR4 des cellules immunitaires^{6,13,20}.

Une fois au sein de la tumeur, les TAMMs *M2-like* influencent divers aspects du développement tumoral¹³. Ils maintiennent l'auto-renouvellement et la prolifération des cellules tumorales, en sécrétant des facteurs comme TGF- β et IL6^{6,13}. De plus, ils libèrent des métalloprotéinases de matrice (MMPs)¹². Dans un contexte sain, celles-ci dégradent la matrice extracellulaire, nécessaire au recrutement des cellules impliquées dans la réparation tissulaire après une inflammation¹². Dans le contexte du GBM, elles facilitent l'invasion des cellules tumorales, des cellules endothéliales progénitrices, ainsi que leur propre migration vers le site de la tumeur^{6,13,36}. Ensuite, les TAMMs stimulent la néovascularisation, par sécrétion de facteurs impliqués dans l'angiogenèse comme le VEGF, sécrété aussi par le GBM^{6,13}. Ce processus est particulièrement actif en condition d'hypoxie^{8,42}. Enfin, ils jouent un rôle clé dans l'immunosuppression du TME, en inhibant la réponse des cellules T cytotoxiques et helper, en recrutant des T régulatrices au niveau de la tumeur et en diminuant l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (CMHII) des cellules du GBM¹³. Les TAMMs *M2-like* relarguent des molécules immunosuppressives comme IL6, IL10 ou encore TGF- β , qui permettent à la tumeur d'échapper au système immunitaire²⁰. Ces diverses caractéristiques et fonctions des TAMMs *M2-like* sont déterminantes dans la réponse inefficace du système immunitaire face au GBM, consolidant le caractère immunologiquement « froid » de cette tumeur.

Par ailleurs, l'hypoxie qui maintient le caractère souche des cellules du GBM et favorise l'angiogenèse, altère la prolifération des T cytotoxiques et leurs activités, dont l'expression des cytokines pro-inflammatoires²⁹. Elle induit également la formation des T régulatrices et leur recrutement, en impactant les cytokines du TME³². Dans le contexte tumoral, les T régulatrices recrutées au niveau du TME inhibent la réponse antitumorale du système immunitaire⁵².

Les cellules de l'immunité, et en particulier les TAMMs, sont donc des intervenants clés dans le développement tumoral¹⁸. En plus d'être la population cellulaire dominante du TME et de contribuer à son caractère immunosuppresseur, ces cellules sont impliquées dans diverses voies signalétiques, notamment via l'expression du récepteur CXCR4, qui amplifie leurs propriétés immunosuppressives en réponse à la voie signalétique CXCL12/CXCR4^{5,18,19,21,40}.

6. La voie CXCL12/CXCR4

L'immunosuppression, au-delà des interactions intrinsèques entre les composants du TME, est renforcée par diverses voies signalétiques. Parmi celles-ci, la voie CXCL12/CXCR4 est déterminante dans l'agressivité du GBM, car elle est associée à la progression tumorale, à la récurrence et donc à un mauvais pronostic du patient²¹. L'intérêt porté à cette voie dans le contexte de tumeurs ne cesse de croître ces dernières années, en raison de son rôle dans le trafic des cellules immunitaires et cancéreuses²¹. En effet, cette voie contribue au processus métastatique de nombreux cancers²¹. Dans le cadre du GBM, la voie CXCL12/CXCR4 médie la migration des GSCs, l'immunosuppression et l'angiogenèse caractéristiques du TME, ainsi que la formation de récurrences et la résistance des GSCs²¹. Elle est particulièrement intéressante à étudier dans le cadre de l'immunosuppression médiée par les TAMMs.

6.1. Généralités

CXCL12, également connu sous le nom de *Stromal Cell-Derived Factor 1* (SDF-1), est une chimiokine de 8 kDa de motif C-X-C, composée de 68 acides aminés²¹. Les chimiokines, appartenant à la famille des cytokines, sont connues pour leurs propriétés chémo-attractives²¹. Au niveau fonctionnel, CXCL12 est à la fois homéostatique, car formée constitutivement, et inflammatoire, car induite en réponse à des stimuli²¹. CXCL12 est un facteur sécrété de manière autocrine et paracrine par diverses cellules (cellules immunitaires, endothéliales et mésenchymateuses) et interagit avec les récepteurs CXCR4 et CXCR7^{21,27,53}. Les chimiokines, dont CXCL12, régulent la migration et la localisation cellulaire pendant le développement⁵³. Leurs propriétés chimio-attractives orchestrent la migration des cellules immunitaires vers les sites d'inflammation^{21,53} [51, 29].

CXCR4 est un récepteur couplé à une protéine G (*G Protein-coupled receptor*, GPCR) de 48 kDa, composé de 352 acides aminés et de 7 domaines transmembranaires, qui a pour unique ligand CXCL12²¹. CXCR4

intervient dans l'homéostasie tissulaire et dans la migration cellulaire^{14,21}. Il est exprimé à la surface de plusieurs types cellulaires tels que les lymphocytes, les macrophages, la microglie, les neutrophiles, les cellules endothéliales, les cellules gliales, les neurones ou encore les fibroblastes stromaux^{21,53,54}. Par son interaction avec CXCL12, CXCR4 régule le trafic des cellules souches, un rôle qu'il joue depuis l'embryogenèse jusqu'à l'âge adulte²¹.

6.2. Implications

L'élément clé de la voie signalétique CXCL12/CXCR4 réside dans l'attraction entre le ligand CXCL12 et le récepteur CXCR4. Ceci l'implique dans la migration et dans le recrutement de divers types cellulaires au niveau du TME, contribuant au développement tumoral (**Figure 5**). CXCR4 est surexprimé dans de nombreux cancers, dont les cancers du cerveau et en particulier le GBM où sa surexpression est considérée comme un marqueur de malignité²¹. Le promoteur de CXCR4 est notamment régulé par les HIFs, qui augmentent son expression par les cellules cancéreuses, endothéliales et immunitaires en conditions hypoxiques^{21,22}. De plus, les cellules de GBM sont responsables de la sécrétion anormale de CXCL12 et ce phénomène est également accentué par l'hypoxie^{21,22}.

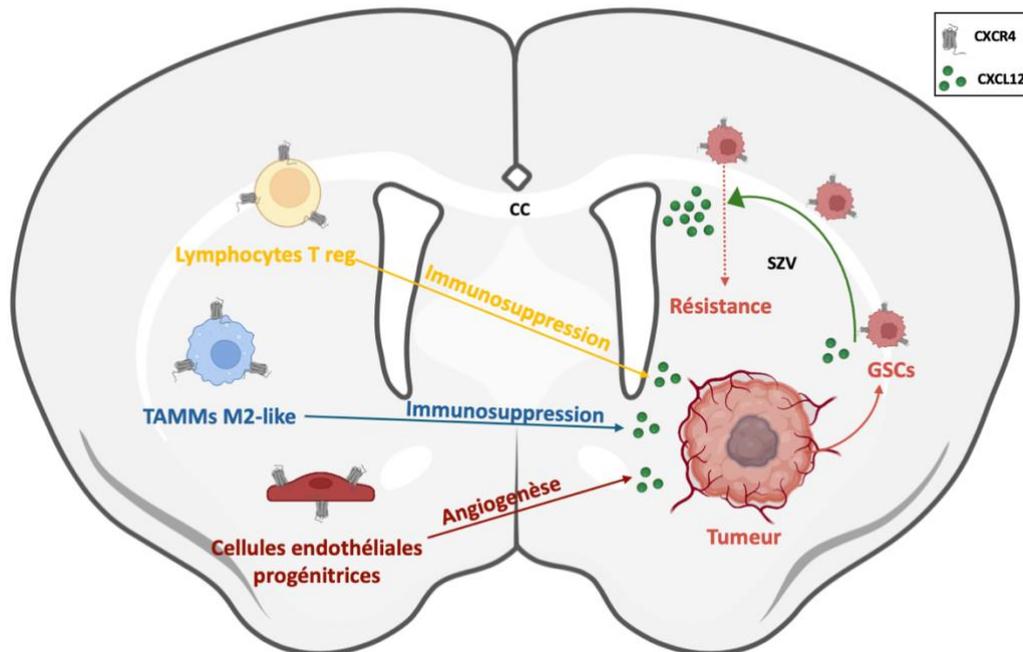


Figure 5. Voie de signalisation CXCL12/CXCR4 et ses implications dans le cadre du GBM. La voie CXCL12/CXCR4 implique la chimiokine CXCL12, qui attire les cellules exprimant le récepteur CXCR4. CXCL12 est sécrété par les cellules du GBM et par les tissus de la zone sous-ventriculaire (Subventricular Zone, SVZ) tandis que CXCR4 est exprimé par les cellules de GBM et en particulier les GSCs (Glioblastoma Stem Like Cells), les lymphocytes T régulateurs (T reg), les macrophages et la microglie associés à la tumeur de phénotype M2-like (Tumor Associated Macrophages and Microglia, TAMMs) et les cellules endothéliales. Le gradient de CXCL12 formé par la SVZ est responsable de la migration des GSCs via le corps calleux (CC) vers cette zone, où les GSCs se retrouvent dans des conditions favorables à leur résistance aux thérapies. La sécrétion de CXCL12 par la tumeur est responsable de l'attraction des lymphocytes T reg, des TAMMs M2-like et des cellules endothéliales progénitrices vers la tumeur. Les T reg et les TAMMs sont responsables du caractère immunosuppresseur de la tumeur et les cellules endothéliales de la forte angiogenèse. Figure réalisée avec BioRender et PowerPoint.

6.2.1. La migration des GSCs et la formation de récurrences

La voie CXCL12/CXCR4 est responsable de la migration des GSCs, contribuant ainsi à la formation de récurrences. Les cellules cancéreuses exprimant le récepteur CXCR4 envahissent les sites adjacents à la tumeur, riches en CXCL12²¹. Les GSCs sont particulièrement affectées par ce phénomène³. Une zone notamment envahie est la zone sous-ventriculaire (*Subventricular Zone, SVZ*), située à la frontière entre les deux ventricules latéraux du cerveau²². Cette zone est constituée d'un neuroépithélium favorable à la formation et au maintien des cellules souches neurales (*Neural Stem Cells, NSCs*)⁴². Elle permet leur longévité, les rendant particulièrement susceptibles à des dommages à l'ADN et à des mutations, pouvant les conduire à une forme cancéreuse²¹. Les GSCs exprimant CXCR4 migrent vers la SVZ via le corps calleux, en suivant le gradient CXCL12 libéré par les cellules de cette zone^{21,42}. Une fois dans la SVZ, les GSCs deviennent inaccessibles à la résection et bénéficient de conditions favorisant leur résistance aux thérapies, leur caractère indifférencié et leur état de dormance^{21,22}.

6.2.2. L'angiogenèse

La voie CXCL12/CXCR4 est également un moteur de l'importante angiogenèse du GBM. Les cellules du GBM, et en particulier les GSCs, sécrètent CXCL12 qui induit le recrutement des cellules progénitrices endothéliales exprimant CXCR4, afin d'augmenter l'angiogenèse sur le site tumoral²¹. De plus, l'interaction entre CXCL12 et CXCR4 favorise la production de VEGF par les cellules tumorales, stimulant ainsi l'angiogenèse^{53,55}. Cela explique en partie la proximité des GSCs avec les vaisseaux sanguins⁵⁵.

6.2.3. L'immunosuppression

La voie CXCL12/CXCR4, et en particulier la sécrétion anormale de CXCL12, est impliquée dans le caractère immunosuppresseur de la tumeur⁵³. Sous l'influence de la voie CXCL12/CXCR4, les TAMMs présents aux alentours de la tumeur adoptent un phénotype *M2-like* dit pro-tumoral et anti-inflammatoire²¹. En plus de les polariser, cette voie de signalisation recrute ces cellules sur le site même de la tumeur²¹. Les TAMMs *M2-like* renforcent alors le contexte immunologique froid du TME, qui est encore accentué par le recrutement des cellules T régulatrices^{19,21,40}.

Pour faciliter la migration des cellules cancéreuses et immunitaires ainsi que l'angiogenèse, la voie CXCL12/CXCR4 induit également la surexpression de métalloprotéinases de matrice (MMPs) par les TAMMs, remodelant ainsi la matrice extracellulaire^{14,21}.

6.2.4. Les implications thérapeutiques

La corrélation entre le mauvais pronostic des patients et l'expression des marqueurs CXCL12 et CXCR4 semble indiquer un rôle central de cette voie de signalisation dans le GBM. Par conséquent, elle

représente une cible thérapeutique prometteuse, et en particulier dans le contexte immunosuppresseif du TME²¹. Des molécules ciblant cette voie ont déjà été étudiées, comme l'AMD3100 (Plerixafor Mozobil™), qui est une molécule bicyclame antagoniste (inhibiteur allostérique) de CXCR4^{7,22}. Il a déjà été approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour le traitement contre le mélanome²². Il montre cependant quelques points problématiques pour le traitement du GBM, tels que sa faible capacité à passer la barrière hémato-encéphalique et son manque de spécificité envers les cellules tumorales. L'expression de CXCR4 par d'autres types cellulaires (cellules immunitaires, cellules souches, cellules endothéliales) empêche son utilisation par voie systémique. Ces limitations favorisent l'utilisation de thérapies plus ciblées afin de limiter les effets secondaires. Il existe également des peptides antagonistes inhibiteurs de CXCR4, dont P2G qui se montre particulièrement efficace⁵⁶. P2G est une version mutée de CXCL12, appelée ainsi en raison de sa substitution de la proline du deuxième acide aminé en glycine. CXCL12 contient deux sites de liaison aux récepteurs dans la région N-terminale. RFFESH est impliqué dans le contact initial avec le récepteur, tandis que KPVLSYR est nécessaire à l'induction du signal par un changement de conformation de CXCR4⁵⁶. Il a été démontré que seuls les deux premiers acides aminés du site de liaison KPVLSYR sont nécessaires pour le changement de conformation de CXCR4 et donc pour la transduction du signal⁵⁶. La mutation P2G permet donc à la chimiokine de se lier au récepteur CXCR4 sans induire la voie signalétique associée. Le transgène P2G agit donc en tant qu'inhibiteur compétitif de CXCL12 endogène.

7. A la recherche de solutions

7.1. Les traitements standards

En oncologie, le traitement du GBM est un défi majeur et crucial. Le traitement standard contre le GBM consiste en une résection maximale de la tumeur, suivie d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie au temozolomide (TMZ), un agent alkylant de l'ADN approuvé par la FDA^{3,4,6,57}. Cependant, cette combinaison de thérapies montre des limites en raison de l'hétérogénéité de la tumeur, de la perméabilité sélective de la barrière hémato-encéphalique et de l'immunosuppression du TME^{17,19,57}.

Comme expliqué précédemment, le GBM présente une hétérogénéité cellulaire importante, avec notamment la présence de GSCs^{3,14}. Ces cellules constituent un problème conséquent quant au traitement des patients. En effet, les GSCs résident principalement dans des zones hypoxiques ou nécrotiques et peuvent infiltrer les zones cérébrales adjacentes³. Une de celles-ci est la zone sous-ventriculaire (SVZ), où elles se trouvent protégées de la résection^{3,7,14}. Au sein de ces zones, les GSCs sont résistantes non seulement à la chimiothérapie en raison d'une surexpression de pompes à efflux, mais également à la radiothérapie, car l'hypoxie empêche la formation de radicaux libres responsables de l'endommagement de l'ADN^{7,14}. Par ailleurs, leur faible activité mitotique limite aussi l'effet des thérapies

ciblant les cellules en division⁶. De plus, elles sont impliquées dans le caractère immunosuppresseur de la tumeur¹. Enfin, leurs caractéristiques de cellules souches leur donnent la capacité de former des tumeurs secondaires^{6,9,13}. L'hétérogénéité de la tumeur se manifeste également au niveau des signatures métaboliques qui peuvent différer entre les cellules d'une même tumeur¹⁹. Ceci est entre autres dû à la vascularité et donc à l'apport de nutriments et d'oxygène qui varie d'un endroit à l'autre de la tumeur¹⁹. Ainsi, les GSCs participent de manière importante à la progression et à la récurrence de la tumeur, ainsi qu'à sa résistance aux différentes thérapies et à son caractère immunosuppresseur^{1,19}.

Un autre défi dans le traitement du GBM concerne la perméabilité sélective de la barrière hémato-encéphalique, contrôlée par les astrocytes, les neurones et les cellules endothéliales qui la composent⁴. Cette caractéristique implique que les médicaments administrés doivent être capables de la traverser. Ceci limite les choix de traitements, malgré plusieurs molécules déjà approuvées par la FDA^{4,57}. Par exemple, l'AMD3100 (Plerixafor), antagoniste de CXCR4, passe difficilement la barrière hémato-encéphalique, ce qui limite son utilisation dans le cadre du GBM^{7,22}.

7.2. L'immunothérapie, une approche intéressante

Les stratégies thérapeutiques traditionnelles visent principalement à l'élimination directe de la tumeur. Il s'agit de thérapies ciblées qui ont pour objectif de bloquer la croissance et/ou la progression de la tumeur, en interférant avec des anomalies moléculaires ou avec des mécanismes qui sont à l'origine du développement ou de la propagation des cellules cancéreuses. Pourtant, une autre approche intéressante pour le GBM concerne les traitements d'immunothérapie spécifiques. Ceux-ci ont pour but de restaurer l'efficacité du système immunitaire, en agissant sur des cibles particulières de la tumeur ou de son microenvironnement. Cependant, ces deux approches ne sont pas totalement indépendantes et les frontières ne sont pas limpides. En effet, les thérapies ciblées aboutissent tout de même à une activation du système immunitaire, et les immunothérapies peuvent passer par des étapes préliminaires ciblant les cellules cancéreuses et aboutissent *in fine* à leur destruction.

L'immunothérapie comprend l'inhibition des « *immune checkpoints* », voies de signalisation permettant de maintenir l'auto-tolérance du système immunitaire, ou encore l'utilisation de cellules T modifiées par des récepteurs d'antigènes chimériques (*Chimeric Antigen Receptors modified T cells*, CAR-T cells)^{8,57}. Elle englobe également la vaccinothérapie qui consiste en des vaccins ciblant des antigènes tumoraux pour induire une réponse immunitaire contre la tumeur³. L'utilisation de virus oncolytiques (décrite au point 8) peut également moduler la réponse immune dans le cadre de cancers⁵⁸.

L'immunothérapie a montré des résultats prometteurs dans le cadre de cancers qui présentent une certaine immunogénicité intrinsèque. Elle présente cependant encore certains défis pour les cancers immunosuppresseurs, dont le microenvironnement froid doit être rendu permissif à cette approche. C'est le cas du GBM, qui présente un caractère immunosuppresseur marqué, notamment médié par les TAMMs *M2-like*¹. Ces derniers représentent une cible thérapeutique intéressante, de par leur rôle important dans l'immunosuppression qui est à la base de l'agressivité de la tumeur¹³. Ils font dès lors l'objet de nombreuses recherches ces dernières années, visant à inhiber leur recrutement, leur polarisation *M2-like*, ou à favoriser leur élimination ou leur reprogrammation^{6,13,44}. Ceci conduit à l'exploration de nouvelles solutions thérapeutiques par immunothérapie, qui inclut plusieurs approches souvent combinées pour en améliorer l'efficacité^{1,57}.

8. La virothérapie oncolytique, la solution ?

8.1. La virothérapie oncolytique

Parmi les traitements d'immunothérapie qui sont étudiés dans le cadre de cancers, la virothérapie se démarque particulièrement pour le GBM. La virothérapie oncolytique est une approche antitumorale basée sur l'utilisation d'un virus génétiquement modifié, capable d'infecter les cellules tumorales, de s'y répliquer et d'induire leur mort cellulaire^{1,3,17,18,58}. L'intérêt réside également dans leur capacité à activer le système immunitaire inné et adaptatif^{3,17,58}. L'activation immunitaire est déclenchée par les antigènes viraux eux-mêmes et par les antigènes tumoraux libérés lors de la lyse cellulaire⁵⁸. Grâce aux avancées du génie génétique, la virothérapie oncolytique est de plus en plus étudiée en clinique, car les virus oncolytiques peuvent être conçus de manière à viser spécifiquement les cellules cancéreuses⁵⁸. De plus, ils peuvent être armés pour exprimer un ou plusieurs transgènes spécifiques, leur permettant de servir de vecteur pour induire la production de transgènes thérapeutiques par les cellules infectées^{3,17}. Ils peuvent dès lors cibler plusieurs aspects des cancers, y compris les cellules immunitaires, l'angiogenèse ou des voies de signalisation spécifiques⁵⁸.

Dans le contexte du GBM, la virothérapie oncolytique paraît adaptée car la tumeur se restreint au cerveau et que les potentielles métastases se trouvent à proximité de la tumeur initiale³. La perméabilité sélective de la barrière hémato-encéphalique limite souvent l'efficacité thérapeutique, mais le virus pouvant être injecté de manière intra-tumorale, ceci permet de contrer cette problématique³. De plus, le virus oncolytique peut se propager dans les cellules cancéreuses et ainsi atteindre les GSCs dans les zones du cerveau les plus difficiles d'accès. L'avantage de pouvoir armer le virus permet, par exemple, de cibler spécifiquement la voie CXCL12/CXCR4, qui est à l'origine du mauvais pronostic des patients²¹.

8.2. Les virus oncolytiques

Diverses familles de virus sont utilisées dans le cadre de la virothérapie oncolytique, notamment les Herpès virus, les Rétro virus, les Adénovirus, le virus de la Vaccine, les Réovirus et les Poliovirus^{58,59}. Le virus oncolytique de l'Herpès Simplex 1 (oHSV-1), de la sous-famille des Alphaherpès virus humains, se révèle particulièrement prometteur⁵⁹. Il est d'ailleurs parmi ceux ayant atteint la phase III dans de nombreux essais cliniques⁵⁹. Tout d'abord, son génome de grande taille (~152 kb) contient environ 30 kb encodant pour des gènes non essentiels à la viabilité du virus, ce qui offre une grande flexibilité pour l'insertion de longs transgènes d'intérêt à la place^{59,60}. Ensuite, la réplication d'HSV-1 se déroule sous forme d'épisome circulaire au sein du noyau des cellules cibles, éliminant le risque de mutagenèse et d'insertion dans le génome humain, ce qui apporte une certaine sécurité^{59,60}. De plus, HSV-1 est omniprésent sous forme latente dans la population humaine⁶¹. Environ 70% de la population mondiale est porteuse de ce virus, ce qui signifie qu'il y a une immunité préexistante, qui n'empêche cependant pas sa réplication transitoire dans le cadre de son utilisation thérapeutique⁶¹. La sécurité est aussi assurée par sa sensibilité aux drogues antivirales comme l'Acyclovir⁵⁹.

L'intérêt pour HSV-1 en tant que virus oncolytique a amené à des avancées significatives. En 2015, la FDA a approuvé le premier virus herpès simplex 1 oncolytique, le Talimogene laherparepvec (T-VEC, Imlygic®), pour le traitement du mélanome métastatique¹⁸. Ce succès a été suivi en 2021, par l'approbation au Japon du Tesseraturev, un herpès simplex 1 oncolytique (G47 delta, Delytact®) par le *Ministry of Health, Labour and Welfare* pour le traitement de gliomes^{18,58,62}.

Le neurotropisme naturel d'HSV-1, c'est-à-dire sa capacité à infecter et se propager dans les systèmes nerveux central et périphérique, le rend particulièrement pertinent pour le traitement de gliomes^{59,63}. Lorsqu'il est utilisé sous sa forme atténuée et sécurisée (oHSV-1), ce virus peut se répliquer efficacement dans les cellules tumorales, en évitant tout risque pour les tissus sains avoisinants^{59,63}. Son importante région génomique disponible pour l'ajout d'un transgène permet, par exemple, de cibler spécifiquement la voie CXCL12/CXCR4. Ainsi oHSV-1 représente une option thérapeutique prometteuse pour le GBM.

8.3. Les méthodes d'administration des traitements par virothérapie

La manière d'administrer les traitements de virothérapie oncolytique aux patients est primordiale pour l'efficacité du traitement⁶⁴. Plusieurs stratégies sont étudiées en phases pré-clinique et clinique⁶⁴. L'injection intra-tumorale est une technique précise en termes de concentration et de localisation, mais assez compliquée à administrer et nécessite plusieurs injections⁶⁴. L'injection par intraveineuse est pratique à administrer et capable d'atteindre les métastases, mais nécessite une haute spécificité⁶⁴. L'injection péritonéale est également facile à mettre en place, mais l'absorption n'est pas optimale⁶⁴.

Dans le cadre du GBM, plusieurs techniques sont proposées¹⁶. Tout d'abord, l'injection par intraveineuse, qui élimine le besoin de chirurgie mais qui est freinée par la barrière hémato-encéphalique¹⁶. De plus, il y a un risque de réduction de charge virale, par neutralisation virale systémique ou par séquestration hors cible¹⁶. L'injection intra-tumorale est une méthode locale et précise qui diminue le risque d'effets secondaires systémiques et qui atteint directement la cible, éliminant le problème du passage de la barrière hémato-encéphalique¹⁶. Elle est d'ailleurs utilisée pour l'injection du G47 delta (Delytact®)⁶². Elle reste par contre une stratégie assez invasive (nécessité de chirurgie), devant être répétée plusieurs fois, et parfois limitée par l'emplacement de la tumeur¹⁶. L'injection intrathécale concerne l'administration du traitement dans l'espace où circule le liquide céphalo-rachidien⁶⁴. Elle est étudiée pour le traitement de tumeurs du SNC, par exemple pour le traitement de la méningite néoplasique de patients atteints de GBM, et pourrait donc être envisagée aussi pour le GBM⁶⁴.

9. Le Virus de l'Herpès Simplex (HSV-1)

9.1. Description d'HSV-1

HSV-1 fait partie de la famille des Herpesviridae, qui est divisée en 3 sous-familles de virus de mammifères : les Alphaherpès virus, les Bêtaherpès virus et les Gammaherpès virus⁶³. HSV-1 appartient aux Alphaherpès virus, tout comme HSV-2 et le virus de la varicelle-zona (*Varicella-Zoster Virus*, VZV)⁶³. Il fait partie de la classe I de la classification de Baltimore et est responsable de l'herpès labial/génital¹⁸. Il infecte les cellules épithéliales et neurales mais peut aussi toucher les lymphocytes et les fibroblastes. Il peut réaliser un cycle d'infection lytique ou latent⁶⁵. Lors d'une infection primaire lytique, des particules virales sont produites et excrétées par la cellule hôte primaire (cellules épithéliales)⁶⁵. Les particules virales ainsi produites peuvent infecter des cibles secondaires, dont les cellules nerveuses, où le virus peut entrer en latence, c'est-à-dire en dormance, empêchant leur reconnaissance par le système immunitaire⁶⁵. Le virus peut alors se réactiver en réponse à divers facteurs liés à l'hôte, retourner au niveau du site d'infection primaire et reprendre une réplication lytique⁶⁵.

HSV-1 est un virus enveloppé avec un génome d'environ 152 kb, encapsulé dans une capsidie icosaédrique^{18,59}. Il utilise ses glycoprotéines d'enveloppe pour entrer dans la cellule hôte^{18,63}. Les glycoprotéines B et C (gB et gC) se lient d'abord au sulfate d'héparane à la surface de la cellule cible, puis les glycoprotéines B et D (gB et gD) se lient à leur récepteur spécifique, le médiateur d'entrée de l'herpès virus (*HerpesVirus Entry Mediator*, HVEM) et la nectine-1^{18,63}. Cette liaison induit la fusion de l'enveloppe virale avec les bicouches lipidiques de la membrane cellulaire^{18,58}. La fusion est facilitée par les glycoprotéines B, H et L (gB, gH et gL)⁶³. Le virus est alors libéré dans le cytosol et transporté au niveau du noyau par le cytosquelette⁵⁸. La nucléocapsidie est exposée à la membrane nucléaire et le génome y

est injecté via un pore nucléaire⁵⁸. Une fois dans le noyau cellulaire, le génome viral est circularisé, et HSV-1 induit alors sa propre transcription et production de protéines virales en prenant possession du système de transcription et de synthèse protéique de son hôte^{18,58}.

Le génome d'HSV-1 est organisé en séquences uniques courtes et longues (*Unique short sequences, U_s/Unique long sequences U_L*), encadrées par des séquences répétées inversées terminales/internes de la région courte/longue (*Terminal/Internal Repeated sequences of the short/long region TR_s/IR_s, TR_L/IR_L*). Il contient également deux origines de réplication, ORI_s dans la région courte et ORI_L dans la région longue. Les gènes d'HSV-1 sont divisés en trois catégories, selon leur ordre de transcription par la polymérase de l'hôte et de traduction : les gènes *immediate-early* (IE), *early* (E) et *late* (L)⁵⁸. Les gènes IE sont impliqués dans l'expression des gènes viraux (en particulier des gènes E et L), les gènes E dans la réplication thêta de l'ADN et la synthèse de l'ADN par rolling circle, et les gènes L dans l'assemblage des virions et la lyse de la cellule hôte (L). Les particules virales passent à travers l'enveloppe nucléaire pour former une enveloppe primaire temporaire puis migrent du réticulum endoplasmique vers le Golgi, pour former l'enveloppe secondaire finale. Les particules virales ainsi formées sont ensuite libérées par exocytose ou par lyse cellulaire⁶⁵.

9.2. HSV-1 en tant que virus oncolytique

Plusieurs modifications génétiques sont couramment réalisées chez HSV-1, afin de l'atténuer et d'éliminer tout risque de pathogénicité⁶⁰. Le virus modifié est alors considéré comme le virus oncolytique oHSV-1. Plusieurs délétions/mutations sont décrites dans la littérature, celles utilisées dans le cadre de cette étude étant décrites ci-dessous (**Figure 6**).

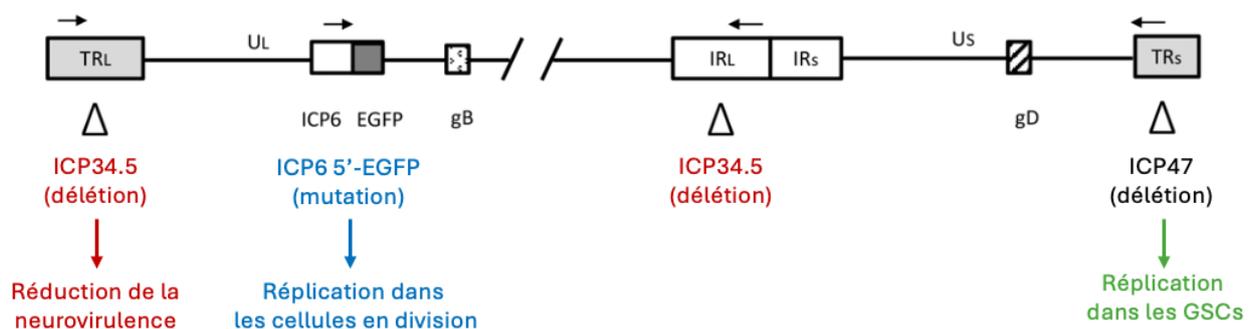


Figure 6. Modifications génétiques couramment réalisées chez oHSV-1. Le génome d'HSV-1 est organisé en séquences uniques courtes et longues (*Unique short sequences, U_s/Unique long sequences U_L*), encadrées par des séquences répétées inversées terminales/internes de la région longue/courte (*Terminal/Internal Repeated sequences of the short/long region, TR_L/IR_L, TR_s/IR_s*). Les modifications génétiques d'oHSV-1 concernent ICP34.5 (délétion des deux copies du gène Gamma34.5), ICP6 (mutation du gène UL39) et ICP47 (délétion du gène US12). Elles permettent de réduire la neurovirulence, de restreindre la réplication uniquement dans les cellules en division et la réplication dans les Glioblastoma Stem Like Cells (GSCs). gB : Glycoprotéine B ; gD : Glycoprotéine D. Figure réalisée avec PowerPoint.

Premièrement, la délétion des deux copies du gène *Gamma34.5* (gène *late*, L), codant pour ICP34.5, permet de diminuer la neurovirulence car ICP34.5 est connu pour inhiber l'autophagie^{18,60} (**Figure 7**). Cette mutation restreint également l'infection aux cellules cancéreuses. En effet, lors d'une infection virale dans des cellules saines, la protéine kinase R (PKR) phosphoryle eIF2 α (facteur d'initiation de la traduction eucaryote), arrêtant ainsi la synthèse des protéines cellulaires. La protéine ICP34.5 déphosphoryle eIF2 α , permettant ainsi la synthèse de protéines virales. En déléant ICP34.5, la réplication virale est limitée dans les cellules saines. Par contre, dans les cellules cancéreuses où PKR est sous-exprimé, la traduction des transcrits viraux est maintenue. En revanche, cette mutation a pour conséquence d'induire une mauvaise réplication virale dans les GSCs car ces dernières maintiennent une expression de PKR^{18,60}.

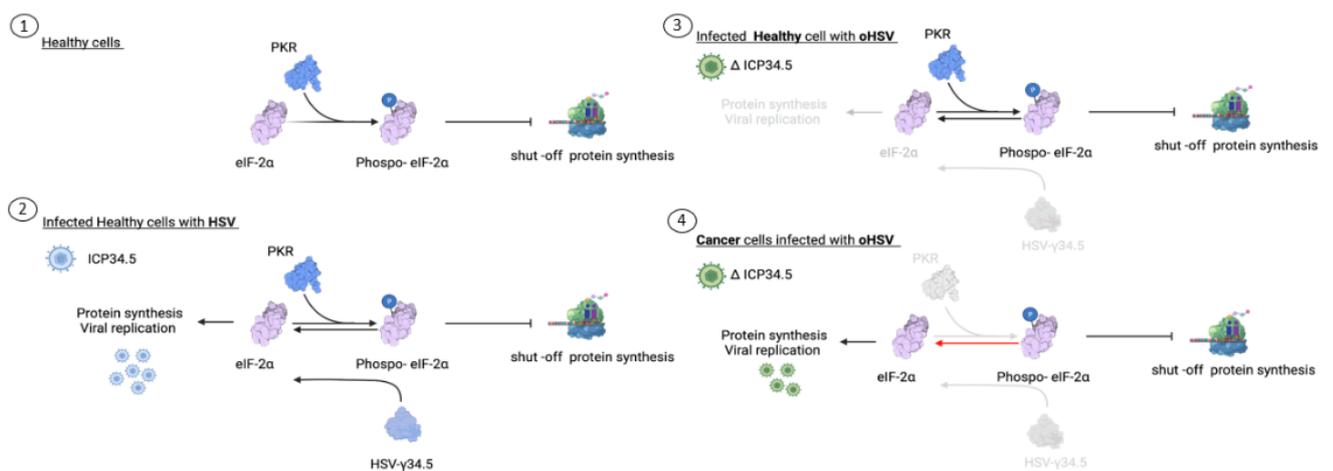


Figure 7. Délétion des deux copies du gènes *Gamma34.5* codant pour ICP34.5 chez oHSV-1. 1) Dans les cellules saines, PKR phosphoryle eIF2 α lors d'une infection, arrêtant la synthèse protéique. 2) Lors d'une infection par HSV-1, ICP34.5 déphosphoryle eIF2 α , réactivant la synthèse protéique. 3) La délétion d'ICP34.5 empêche la synthèse protéique et donc la réplication virale dans les cellules saines. 4) La synthèse protéique et donc la réplication virale sont maintenues dans les cellules cancéreuses sous-exprimant PKR. Figure réalisée par Judit Sanchez Gil.

Ensuite, la deuxième modification concerne la mutation ponctuelle du gène *UL39* (gène *early*, E), codant pour ICP6, qui est la grande sous-unité de la ribonucléotide réductase (RR) virale (**Figure 8**). Celle-ci est essentielle pour maintenir un taux suffisant de nucléotides pour la synthèse d'ADN^{18,60}. La mutation d'ICP6 maintient la réplication virale dans les cellules tumorales ou dans les cellules saines en division car la RR cellulaire est active dans ces cellules qui se divisent. Par contre, la réplication du virus muté au niveau de sa RR est impossible dans les cellules post-mitotiques saines qui ne se divisent pas, dans lesquelles la RR cellulaire n'est pas active. Cette mutation permet donc de restreindre l'infection aux cellules en division rapide, telles que les cellules cancéreuses^{18,60}.



Figure 8. Mutation ponctuelle du gène UL39 codant pour ICP6 chez oHSV-1. 1) La ribonucléotide réductase (RR), active dans les cellules en division, réduit les NTPs en dNTPs pour la synthèse d'ADN. 2) La RR n'est pas active dans les cellules qui ne sont pas en division. 3) ICP6, RR virale, permet la synthèse d'ADN dans les cellules en division. 4) ICP6 permet la synthèse d'ADN également dans les cellules qui ne sont pas en division. 5) La mutation d'ICP6 maintient la synthèse d'ADN dans les cellules en division. 6) La mutation d'ICP6 ne permet pas la synthèse d'ADN dans les cellules qui ne sont pas en division. Figure réalisée par Judit Sanchez Gil.

Enfin, la délétion du gène *US12* (gène *immediate-early*, IE), codant pour ICP47 permet de restaurer la présentation des antigènes dans un contexte CMHI (Complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I), car ICP47 induit une diminution de l'expression de CMHI en interagissant avec le transporteur associé à la présentation des antigènes (*Transporter Associated with Antigen Presentation*, TAP)^{18,60} (Figure 9). De plus, cette délétion place le gène *US11*, initialement exprimé en gène *late*, sous le contrôle du promoteur *immediate-early* d'*US12*. *US11* lie l'ARN double brin, empêchant l'activation de PKR et donc la phosphorylation d'eIF2 α , ce qui restaure la synthèse protéique. La réplication virale, impactée par la double délétion des gènes *Gamma34.5* est donc en partie rétablie par la délétion d'*US12* et surtout dans les GSCs où la réplication du virus muté en *Gamma34.5* est particulièrement impactée^{18,60}.

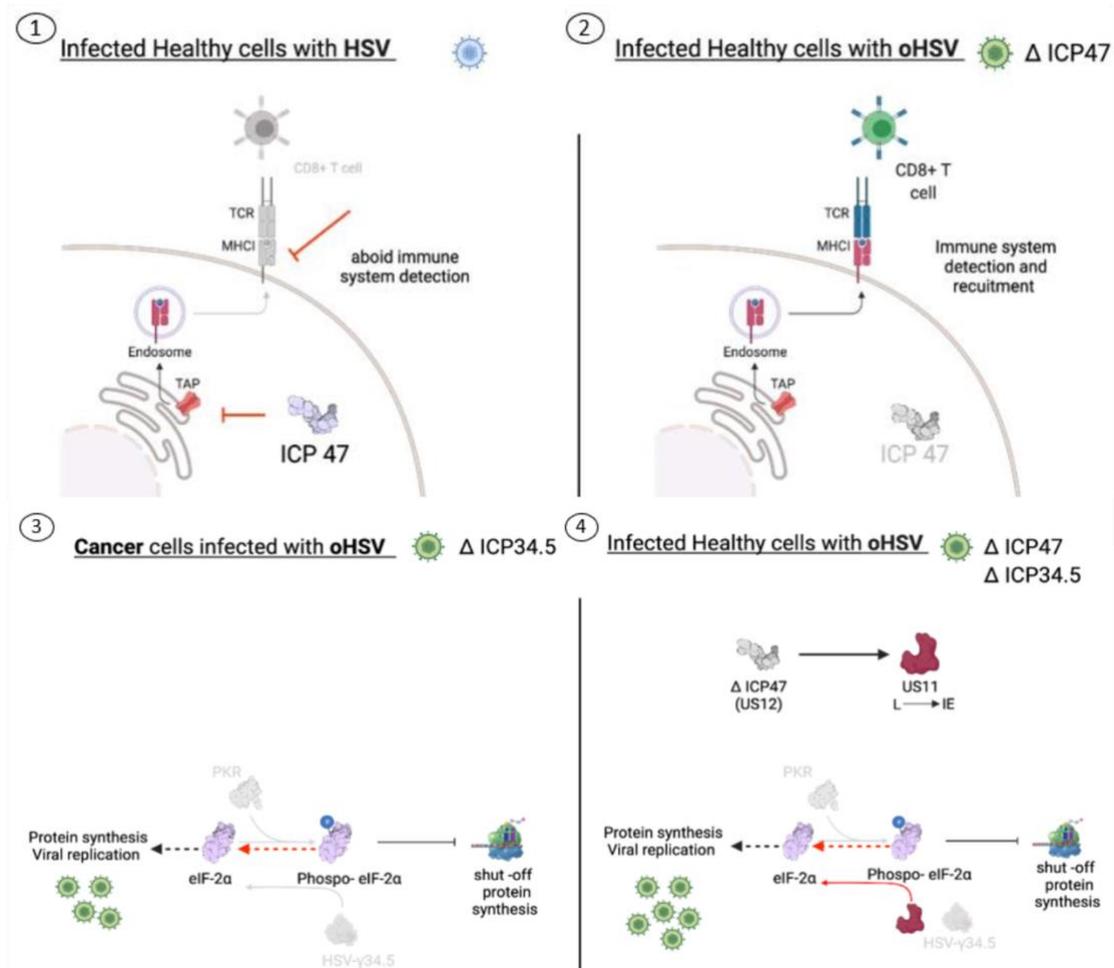


Figure 9. Délétion du gène US12 codant pour ICP47 chez oHSV-1. 1) ICP47 induit une diminution de l'expression de CMHI lors de l'infection d'une cellule saine par HSV-1, en interagissant avec le transporteur associé à la présentation des antigènes (Transporter Associated with Antigen Presentation, TAP). 2) La délétion d'ICP47 permet de restaurer la détection de l'infection par le système immunitaire. 3) La réplication virale dans les cellules cancéreuses, en particulier dans les GSCs (Glioblastoma Stem Like Cells), est impactée par la délétion d'ICP34.5. 4) La délétion d'ICP47 place le gène US11, initialement sous le contrôle d'un promoteur late, sous le contrôle du promoteur immediate-early d'US12. US11 empêche l'activation de PKR et restaure la synthèse protéique. Figure réalisée par Judit Sanchez Gil.

En plus des atténuations, le virus oHSV-1 peut être armé d'un transgène, afin d'améliorer son activité⁶⁰. Plusieurs types de transgènes ont déjà été décrits en littérature⁶⁰. Ils peuvent correspondre à des cytokines, des facteurs immunomodulateurs, des facteurs anti-angiogéniques, des inhibiteurs du TME ou encore des protéines cytotoxiques⁶⁰. Par exemple, le T-VEC (Imlytic®) est armé de GM-CSF, permettant d'augmenter l'immunité antitumorale médiée par l'hôte⁶⁶. G47delta-mIL12 exprime quant à lui l'IL12 murine, qui possède une activité anti-angiogénique⁶⁰.

9.3. HSV-1 dans le cadre de cette étude

Cette étude s'intéresse au traitement du GBM par virothérapie, en se concentrant particulièrement sur la voie CXCL12/CXCR4 et en particulier ses implications sur la polarisation des TAMMs. La virothérapie se montre comme thérapie de choix pour antagoniser la voie CXCL12/CXCR4, et en particulier via le virus oncolytique oHSV-1 en raison de son tropisme cérébral. Dans le cadre de cette étude, oHSV-1 est exploité

principalement pour sa capacité à véhiculer un transgène, en particulier P2G, et secondairement pour sa capacité à lyser les cellules cancéreuses et à activer le système immunitaire. Ce virus, nommé oHSV-P2G, est atténué comme décrit précédemment (Δ ICP34.5, Δ ICP6, Δ ICP47) et modifié pour exprimer la GFP (**Figure 10**). Il a déjà fait l'objet d'études au sein du laboratoire. Sa capacité à inhiber la migration des GSCs vers le SVZ, ainsi que leur auto-renouvellement a été démontrée. De plus, dans le cadre d'études *in vivo*, des souris atteintes de GBM et traitées avec ce virus armé ont montré une meilleure survie par rapport à des souris contrôles non traitées. La taille de la tumeur était d'ailleurs drastiquement diminuée. Il reste encore à démontrer les effets de ce virus sur l'angiogenèse ainsi que sur le système immunitaire.

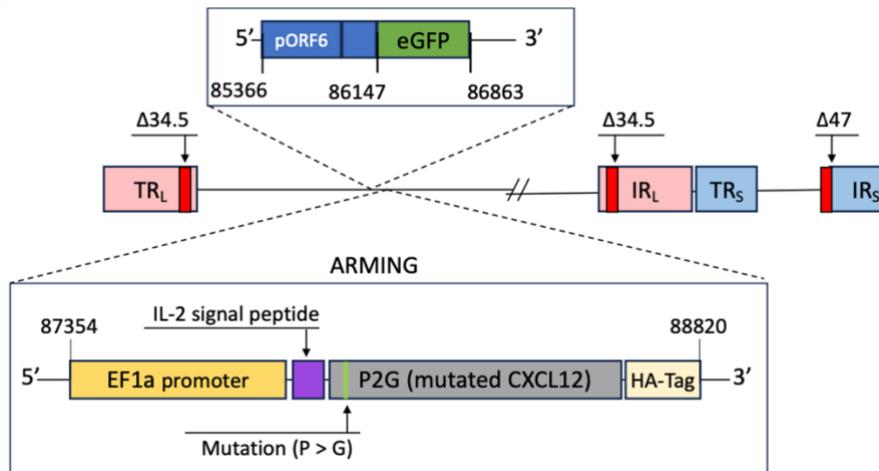


Figure 10. Génome d'oHSV-P2G. oHSV-P2G est atténué (Δ ICP34.5, Δ ICP6, Δ ICP47) et modifié pour exprimer la Green Fluorescent Protein (GFP). Il est armé de la chimiokine CXCL12 mutée au niveau de son deuxième acide aminé (proline en glycine, P2G), sous le contrôle du promoteur eucaryote pEF1a et taguée par un HA-tag.

II. Objectifs

Cette étude se concentre sur la caractérisation du virus oncolytique oHSV-P2G, exprimant P2G, un antagoniste de la voie CXCL12/CXCR4. Ce virus est étudié pour son influence sur la polarisation des TAMMs, qui présentent un spectre phénotypique caractérisé par les phénotypes extrêmes *M1-like* (pro-inflammatoire/antitumoral) et *M2-like* (anti-inflammatoire/pro-tumoral). En outre, le virus oHSV-P2G est également étudié pour son effet sur la capacité de phagocytose des TAMMs, qui constitue une de leurs fonctions principales, et qui est primordiale pour l'activité du système immunitaire face au GBM.

L'objectif de ce travail est ainsi d'évaluer l'effet du virus oncolytique oHSV-P2G sur les TAMMs, en étudiant son impact sur :

- 1) la polarisation des macrophages et de la microglie, en partant de l'hypothèse que oHSV-P2G, par sa capacité à inhiber la voie CXCL12/CXCR4, pourrait induire une polarisation vers un phénotype M1-like,
- 2) la fonction de phagocytose des macrophages et de la microglie.

Ces deux aspects seront caractérisés en comparant l'effet du virus oHSV-P2G, exprimant l'inhibiteur de CXCR4 et celui d'oHSV non-armé (oHSV *wild-type*, oHSV-WT), sur des macrophages humains dérivés de monocytes (MDMs) isolés à partir d'un *buffy coat*, ainsi que sur la lignée cellulaire HMC3 (microglie humaine) utilisés comme modèles expérimentaux.

III. Matériel et méthodes

1. GENERALITES

Types cellulaires

La microglie est étudiée à partir de la lignée cellulaire humaine HMC3, tandis que les macrophages humains proviennent de monocytes différenciés (*Macrophages Derived Monocytes*, MDMs). Ceux-ci sont obtenus par isolation de monocytes de sang par *buffy coats* (poches de sang frais, fournies anonymement par la Croix-Rouge) et par différenciation grâce au *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF). Les cellules de glioblastome utilisées, nommées GB138, proviennent de cellules primaires d'un patient, récupérées par le laboratoire de B. Rogister (ULiège – CHU). Celles-ci sont modifiées afin d'exprimer la luciférase (GB138/Luc+, nommée GB138) ou la luciférase et la RFP (GB138/Luc+/RFP+, nommée GB138RFP). Les cellules sont incubées à 37°C, 5% de CO₂.

Virus

Le virus *wild-type* oHSV-WT (oHSV-WT, fQuik1 oHSV WT-gD delta47/IE_US11 cl 2.1) est atténué (Δ ICP34.5, Δ ICP6, Δ ICP47), et modifié pour exprimer la GFP pour les manipulations *in vitro*, et la luciférase pour les manipulations *in vivo* (**Tableau 1**). Le virus oHSV-P2G (fQuik1 oHSV WT-gD P2G after GFP delta47/IE_US11 cl4.3), atténué de manière identique à oHSV-WT, est modifié pour exprimer la GFP, et armé de la chimiokine P2G (HA-tag) sous le contrôle du promoteur eucaryote pEF1a (**Tableau 1**). Les modifications génétiques et l'insertion des transgènes sont effectuées par clonage du génome d'HSV-1 dans un chromosome artificiel bactérien (*Bacterial Artificial Chromosome*, BAC) et par recombinaison hétérologue. Les virus sont conservés dans du PBS 10% glycérol à -80°C. La MOI (*Multiplicity Of Infection*) correspond au rapport entre le nombre de particules virales et le nombre total de cellules.

Nom	Acronyme	Atténuations	Transgène
fQuik1 oHSV WT-gD delta47/IE_US11 cl 2.1	oHSV-WT	Δ ICP34.5, Δ ICP6, Δ ICP47	GFP
fQuik1 oHSV WT-gD P2G after GFP delta47/IE_US11 cl4.3	oHSV-P2G	Δ ICP34.5, Δ ICP6, Δ ICP47	GFP, pEF1aP2G

Tableau 1. Liste des virus utilisés, leurs acronymes, atténuations et transgènes.

Milieux de culture

Type cellulaire	Milieu de culture de base	Milieu de culture lors des traitements
HMC3	DMEM-F12 10% FBS 1% Pen/strep	DMEM-F12 1% Pen/Strep
GB138 et GB138RFP	DMEM-HG 10% FBS 1% Pen/Strep	DMEM-HG 1% Pen/Strep
MDMs	RPMI 20% FBS 1% Pen/Strep 100 ng/mL M-CSF	RPMI 1% Pen/Strep 100 ng/mL M-CSF

Tableau 2. Milieux de culture utilisés selon le type cellulaire.

Polarisation

Les HMC3 et les MDMs sont polarisés en un phénotype *M1-like* par ajout d'Interféron gamma (IFN γ , 50 ng/mL) ou en un phénotype *M2-like* par ajout d'Interleukine 4 (IL4, 50 ng/mL).

Milieux conditionnés

Les cellules GB138 sont cultivées dans des flasques T175 avec du milieu DMEM-HG 10% FBS 1% Pen/Strep jusqu'à 80% de confluence. Après lavage au PBS, le milieu est remplacé par du milieu DMEM-F12 1% Pen/Strep. Le milieu conditionné non infecté (mNI) est préparé sans infection des GB138, tandis que les milieux conditionnés oHSV-WT (mWT) et oHSV-P2G (mP2G) sont réalisés par infection des GB138 par les virus oHSV-WT et oHSV-P2G (MOI = 1), respectivement. Après 3 jours d'incubation, les milieux sont filtrés (0,1 μ m), et les filtrats obtenus constituent les milieux conditionnés.

Préparation de l'amyloïde (fA β)

Un mélange de 50% d'amyloïde fA β 1-42 Fluor 488 (1 mg/mL) et 50% d'amyloïde fA β 1-42 non fluorescent (2 mg/mL), est incubé à 37°C sous agitation à 300 rpm pendant 24h à l'obscurité pour permettre leur agrégation.

Réactifs

La liste complète des réactifs, fournisseurs et références (si nécessaire) est présentée en **Annexe 1**.

2. ETUDE DES MDMs

2.1. Buffy coat

Au jour 0, du sang frais fourni par la Croix-Rouge est dilué 2 fois dans du PBS, ajouté délicatement sur du Lymphoprep (50 mL de sang pour 15 mL de Lymphoprep), puis centrifugé 30 minutes à 1200 rpm (sans frein). Les cellules mononucléaires du sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) sont récupérées et centrifugées 5 minutes à 1200 rpm (sans frein). Les PBMCs sont dilués dans du PBS jusqu'à une concentration de 10⁸ cellules/mL. Les monocytes sont isolés via le kit « *EasySep human CD14 positive selection kit* » (StemCell™ Technologies), et re-suspendus dans du milieu RPMI 20% FBS 1%

Pen/Strep 100 ng/mL M-CSF à une concentration de 8×10^5 cellules/mL afin de les différencier en macrophages. 400 000 cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits. Au jour 2, le milieu de culture est changé (RPMI 20% FBS 1% Pen/Strep 100 ng/mL M-CSF) et les cellules en suspension récupérées par centrifugation (5 minutes à 1200 rpm).

2.2. Analyse transcriptionnelle des marqueurs de polarisation des MDMs

Au jour 5, les MDMs sont traités pendant 48h selon les conditions du **Tableau 3**. L'ARN des cellules est extrait à l'aide du kit « *NucleoSpin® RNA Kit* » (Macherey-Nagel) et sa concentration est mesurée avec un NanoDrop. La rétrotranscription de l'ARN en cDNA est réalisée à l'aide du kit « *RevertAid H Minus First Stand cDNA Syntheses Kit* » (Thermo Scientific®). Pour l'amplification par qPCR, un mélange contenant 4 µL de cDNA (2,5 ng/µL), 1 µL de mix d'amorces sens et antisens (4 µM) spécifiques aux ARNm cibles (**Annexe 2**) et 5 µL de SYBR® Green est réalisé. La qPCR est réalisée avec le Thermocycler LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche) selon le programme suivant : activation de l'enzyme (3 minutes - 95°C), amplification (45 cycles ; 5 secondes - 95°C ; 30 secondes - 60°C), courbe de fusion (10 secondes - 95°C ; 10 secondes - 60°C ; 95°C), refroidissement (10 secondes - 40°C). Chaque condition est réalisée en triplicat. La quantité relative d'ARNm est calculée selon les Ct (*threshold cycle*), correspondant au cycle à partir duquel la fluorescence de la courbe d'amplification s'intersecte avec le seuil de fluorescence déterminé par le thermocycler. Les données sont normalisées au *house keeping gene* (*TBPh*).

2.3. Étude de la capacité phagocytose de l'amyloïde par les MDMs

Au jour 5, les MDMs sont traités pendant 48h selon les conditions du **Tableau 3**. Au jour 7, l'amyloïde (3 ng/mL) est ajouté et incubé pendant 2h ou 6h dans du milieu RPMI 20% FBS 1% Pen/Strep 100 ng/mL M-CSF. Ensuite, les cellules sont décrochées (Trypsine, incubation à 37°C), centrifugées (5 minutes à 300 rcf à 4°C), lavées au FACS buffer (PBS 3% FBS) et centrifugées à nouveau. Elles sont ensuite marquées au ZombieNIR (1/500, 20 minutes à l'obscurité), lavées au FACS buffer et centrifugées (5 minutes à 300 rcf à 4°C). Enfin, elles sont fixées à la PAF 4% (10 minutes à l'obscurité), lavées au FACS buffer et centrifugées (5 minutes à 700 rcf à 4°C). L'analyse est réalisée sur FACS Fortessa® (ZombieNIR : APC-Cy7, fAβ : FITC). La stratégie de sélection des cellules ayant phagocyté du fAβ, c'est-à-dire positives au Fluor 488 (FITC+) est présentée en **Annexe 3**. Elle consiste à sélectionner les cellules parmi les débris cellulaires/cellules mortes, à isoler les singulets de cellules parmi les doublets et à retenir les cellules vivantes parmi les mortes. Les deux populations de cellules (FITC+/FITC-) sont délimitées via un contrôle négatif (cellules non incubées avec du fAβ). Différents paramètres sont extraits de l'analyse : le pourcentage de cellules positives (FITC+), l'intensité de fluorescence médiane (*Median Fluorescent Intensity*, MFI) calculée sur l'ensemble des cellules, correspondant à la médiane des cellules qui sont les plus fluorescentes, et la MFI

calculées sur les cellules FITC+ (MFI [FITC+]), correspondant à la médiane des cellules positives au FITC+ qui sont les plus fluorescentes.

3. ETUDE DES HMC3

3.1. Analyse transcriptionnelle des marqueurs de polarisation des HMC3

200 000 cellules HMC3 sont mises en culture pendant 48h dans des plaques 12 puits selon les conditions du **Tableau 4**. L'ARN des cellules est extrait à l'aide kit « *NucleoSpin® RNA Kit* » (Macherey-Nagel) et la concentration en ARN est mesurée avec un NanoDrop. La rétrotranscription de l'ARN en cDNA est réalisée à l'aide kit « *RevertAid H Minus First Stand cDNA Syntheses Kit* » (Thermo Scientific®). Pour l'amplification par qPCR, un mélange comprenant 4 µL de cDNA (2,5 ng/µL), 1 µL de mix d'amorces sens et antisens (4 µM) spécifiques aux ARNm cibles (**Annexe 2**) et 5 µL de SYBR® Green est réalisé. Chaque condition est réalisée en triplicat. La qPCR est réalisée avec le thermocycler LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche) selon le programme suivant : activation de l'enzyme (3 minutes - 95°C), amplification (45 cycles ; 5 secondes - 95°C ; 30 secondes - 60°C), courbe de fusion (10 secondes - 95°C ; 10 secondes - 60°C ; 95°C), refroidissement (10 secondes - 40°C). La quantité relative d'ARNm est calculée selon les Ct (*threshold cycle*), correspondant au cycle à partir duquel la fluorescence de la courbe d'amplification s'intersecte avec le seuil de fluorescence déterminé par le thermocycler. Les données sont normalisées au *house keeping gene* (*TBPh*).

3.2. Étude de la capacité de phagocytose de l'amyloïde par les HMC3

Analyse FACS de la phagocytose des HMC3 en milieux conditionnés

Au jour 0, 100 000 HMC3 sont mises en culture dans du milieu DMEM-F12 10% FBS 1% Pen/Strep dans des plaques 12 puits. Après 6h d'incubation, le milieu est remplacé par du milieu sans FBS, selon les conditions du **Tableau 4**. Au jour 3, l'amyloïde (3,75 ng/mL) est ajouté et incubé pendant 2h ou 6h dans du milieu DMEM-F12 1% Pen/Strep. Ensuite, les cellules sont décrochées (Trypsine, incubation à 37°C), centrifugées (5 minutes à 300 rcf à 4°C), lavées au FACS buffer (PBS 3% FBS) et centrifugées à nouveau. Elles sont marquées au ZombieNIR (1/500, 20 minutes à l'obscurité), lavées au FACS buffer et centrifugées. Enfin, elles sont fixées à la PAF 4% (10 minutes à l'obscurité), lavées au FACS buffer et centrifugées (5 minutes à 700 rcf à 4°C). Du FACS buffer est ajouté pour l'analyse, qui est réalisée sur le FACS Fortessa® (ZombieNIR : APC-Cy7, fAβ : FITC). La stratégie de sélection des cellules ayant phagocyté du fAβ, c'est-à-dire positives au Fluor 488 (FITC+) est présentée en **Annexe 3**, et correspond à celle des MDMs (voir point 2.3).

Analyse en immunofluorescence de la phagocytose des HMC3 en milieux conditionnés

Au jour 0, 100 000 HMC3 sont mises en culture du milieu DMEM-F12 10% FBS 1% Pen/Strep (plaques 12 puits). Après 6h d'incubation, le milieu est remplacé par du milieu sans FBS, selon les conditions du

Tableau 4. Au jour 3, l'amyloïde (3,75 ng/mL) est ajouté et incubé pendant 6h dans du milieu DMEM-F12 1% Pen/Strep. Les cellules sont décrochées (Trypsine, incubation à 37°C), centrifugées (10 minutes à 500 g), fixées à la PAF 4% (20 minutes à l'obscurité) puis lavées au FACS buffer (PBS 3% FBS) et centrifugées (10 minutes à 850 g). L'anticorps primaire anti-HSP90 (souris, 3,5 µg/mL, mise en évidence du cytoplasme) est incubé toute la nuit à l'obscurité puis les cellules sont lavées au FACS buffer et centrifugées. L'anticorps secondaire anti-souris (1/250) est ajouté pendant 1 heure 30 à l'obscurité puis les cellules sont lavées au FACS buffer et centrifugées (10 minutes à 850 g). Le marqueur de noyaux Hoechst (1 µg/mL) est ajouté 10 minutes à l'obscurité puis les cellules sont lavées au FACS buffer, centrifugées, et observées au microscope confocal (Confocal Zeiss HR LSM 980, Airyscan, 63x).

3.3. Étude de la capacité de phagocytose des GB138RFP par les HMC3

Au jour 0, 150 000 HMC3 sont mises en culture dans du milieu DMEM-F12 10% FBS 1% Pen/Strep dans des plaques 6 puits. Après 6h d'incubation, le milieu est remplacé par du milieu sans FBS selon les conditions du **Tableau 4**. Au jour 2, les GB138RFP sont ajoutées à un ratio de 1 :3 (HMC3 : GB138RFP) dans du milieu DMEM-F12 1% Pen/Strep sans traitement et le tout est incubé 8h. Ensuite, les cellules sont décrochées (Trypsine, incubation à 37°C), centrifugées (5 minutes à 300 rcf à 4°C), lavées au FACS buffer (PBS 3% FBS) et centrifugées à nouveau. Elles sont ensuite marquées au ZombieNIR (1/500, 20 minutes à l'obscurité), lavées au FACS buffer et centrifugées. Elles sont marquées à l'anticorps anti-CD40 (1/50, 30 minutes à 4°C à l'obscurité), lavées au FACS buffer et centrifugées. Enfin, elles sont fixées à la PAF 4% (10 minutes à l'obscurité), lavées au FACS buffer et centrifugées (5 minutes à 700 rcf à 4°C). Du FACS buffer est ajouté pour l'analyse, qui est réalisée sur FACS Fortessa® (ZombieNIR : APC-Cy7, Anti-CD40 : APC, RFP : PE). La stratégie de sélection des cellules marquées au CD40 et ayant phagocyté des GB138RFP (cellules CD40+ et RFP+) est présentée en **Annexe 4**. Elle consiste à sélectionner les cellules parmi les débris cellulaires/cellules mortes, à isoler les singulets de cellules parmi les doublets et à retenir les cellules vivantes parmi les mortes. Ensuite, les différentes populations de cellules sont délimitées via les contrôles négatifs (GB138RFP et HMC3 seules). Les différentes populations sont RFP+/CD40- (GB138RFP, cadrant 1 (Q1)), RFP+/CD40+ (HMC3 ayant phagocyté des GB138RFP, cadrant 2 (Q2)), RFP-/CD40+ (HMC3, cadrant 3 (Q3)) et RFP-/CD40- (GB138RFP n'exprimant pas la RFP, cadrant 4 (Q4)). Le pourcentage de phagocytose est déterminé par $Q2/(Q2+Q3)$ (%).

4. Production virale et test de qualité

4.1. Production et purification des virus oHSV-WT et oHSV-P2G

Les cellules VERO sont mises en culture (flasques T175) à 80-100% de confluence (100% correspond à $1,8 \times 10^7$ cellules) dans du milieu DMEM-HG 10% FBS qui est ensuite remplacé par du milieu VP-SFM sans FBS (7 mL) contenant les virus oHSV-WT ou oHSV-P2G (MOI = 0,005). Les cellules sont incubées dans ce

milieu infectieux pendant 90 minutes à 37°C en agitant les flasques toutes les 15 minutes. Du milieu VP-SFM est ajouté pour obtenir un volume de 20 mL et les cellules sont incubées 24 heures à 37°C suivi de 4 jours supplémentaires à 33°C. Ensuite, du NaCl (0,045 M) et du sulfate de dextran (100 µg/mL) sont ajoutés au milieu pendant une nuit d'incubation à 33°C. Les flasques sont mises en agitation pendant 90 minutes afin de détacher les cellules. Le milieu contenant les cellules est centrifugé 10 minutes à 2200 g à 4°C et le surnageant est filtré (0,8 µm) puis ultra-centrifugé à haute vitesse 1 heure à 41 657-47 850 g à 4°C. Le culot est ensuite lavé au PBS et séché puis re-suspendu dans 50 µL de PBS toute la nuit à 4°C. Du glycérol y est ajouté (10%) et mélangé puis les virus sont aliquotés et conservés à -80°C.

4.2. Western blot

400 000 cellules GB138 sont mises en culture dans du milieu DMEM-HG 10% FBS 1% Pen/Strep (plaques 6 puits). Après 6h d'incubation, le milieu est remplacé par du milieu DMEM-HG 1% Pen/Strep et les cellules sont infectées par les virus oHSV-WT et oHSV-P2G (MOI = 1) toute une nuit. Les protéines du milieu de culture sont précipitées dans de l'acétone (4 volumes d'acétone pour 1 volume de surnageant) pendant 3h à -80°C avec agitation toutes les heures. Après 30 minutes de centrifugation à 13 000 rpm, le culot est séché 10 minutes sous hotte et 30 µL de TR1X (**Annexe 5**) sont ajoutés. Les échantillons sont chauffés 5 minutes à 95°C et mis sur gel (gel de séparation (13%) et de concentration, **Annexe 5**). La migration est réalisée dans le tampon de migration (**Annexe 5**) 15 minutes à 100V, suivies d'1 heure à 150V. Les différentes protéines séparées sur le gel sont transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidène fluoride membrane, GE Healthcare), activée au méthanol dans le tampon de transfert (**Annexe 5**) toute la nuit à 4°C à 50V. La membrane est lavée à l'eau désionisée puis au TBS-T et incubée 30 minutes sous agitation avec du TBS-T 5% lait. Elle est ensuite incubée 2 heures sous agitation avec les anticorps primaires anti-HA-P2G (1/100 dans du TBS-T 5% lait, lapin) et anti-gD (1/1000 dans du TBS-T 5% lait, souris). La membrane est lavée avec du TBS-T puis incubée 1 heure sous agitation avec les anticorps secondaires anti-lapin (1/250 dans du TBS-T 5% lait) et anti-souris (1/250 dans du TBS-T 5% lait). Des lavages sont à nouveau réalisés avec du TBS-T, la membrane est révélée par électrochimiluminescence (ECL, **Annexe 5**) et l'analyse (P2G : ~10 kDa) et gD : ~55 kDa) est réalisée avec l'Amersham ImageQuant™ 800 (Cytiva).

5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées par T-test ou par Test Anova. Pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur <= 0,05 ; ** = p-valeur <= 0,01 ; *** = p-valeur <= 0,001 ; **** = p-valeur <= 0,0001.

6. Conditions expérimentales

Conditions	Composition						
	RPMI 1% Pen/Strep	M-CSF (100 ng/mL)	mNI	mWT	mP2G	IFN γ (50 ng/mL)	IL4 (50 ng/mL)
M0	x	x					
M0 + IFNγ	x	x				x	
M0 + IL4	x	x					x
M0 + mNI		x	x				
M0 + mWT		x		x			
M0 + mP2G		x			x		
M0 + IFNγ + mNI		x	x			x	
M0 + IFNγ mWT		x		x		x	
M0 + IFNγ mP2G		x			x	x	

Tableau 3. Composition des milieux de culture pour chaque condition expérimentale des MDMs. Les milieux conditionnés sont réalisés par filtration du milieu de culture de cellules de GBM (GB138) non infectées (mNI), ou infectées par oHSV-WT (mWT) ou oHSV-P2G (mP2G).

Conditions	Composition					
	DMEM-F12 1% Pen/Strep	mNI	mWT	mP2G	IFN γ (50 ng/mL)	IL4 (50 ng/mL)
M0	x					
M0 + IFNγ	x				x	
M0 + IL4	x					x
M0 + mNI		x				
M0 + mWT			x			
M0 + mP2G				x		
M0 + IFNγ + mNI		x			x	
M0 + IFNγ + mWT			x		x	
M0 + IFNγ + mP2G				x	x	

Tableau 4. Composition des milieux de culture pour chaque condition expérimentale des HMC3 et des GB138/GB138RFP. Les milieux conditionnés sont réalisés par filtration du milieu de culture de cellules de GBM (GB138) non infectées (mNI), ou infectées par oHSV-WT (mWT) ou oHSV-P2G (mP2G).

IV. Résultats

1. Mise en contexte

Compte tenu de l'importance des macrophages et de la microglie (TAMMs) dans le GBM, décrite en littérature et vérifiée *in vivo* au laboratoire, l'effet du virus oHSV-P2G est exploré sur ces deux types cellulaires. L'impact du virus oHSV-P2G sur la polarisation des TAMMs est évalué par une analyse transcriptomique (RT-qPCR), et sur la capacité de phagocytose des TAMMs par cytométrie en flux (FACS). Dans cette étude, les macrophages sont représentés par des macrophages humains dérivés de monocytes (*Macrophages Derived Monocytes*, MDMs) et la microglie humaine par la lignée HMC3.

Le virus armé oHSV-P2G et le virus *wild-type* oHSV-WT sont analysés au travers de milieux conditionnés. Cette technique consiste à mimer le milieu extracellulaire de la tumeur lorsque celle-ci est non infectée (mNI) ou infectée par les virus oHSV-WT (mWT) ou oHSV-P2G (mP2G). L'intérêt réside dans l'obtention d'un milieu comprenant tous les facteurs relargués par la tumeur dans le contexte de son infection par le virus (marqueurs de stress, cytokines dont CXCL12 ou P2G, ...), tout en éliminant les particules virales léthales pour les cellules cultivées par la suite dans ces milieux. De plus, ceci permet de focaliser les résultats sur l'effet du virus oHSV-P2G en tant que vecteur, indépendamment de ses effets lytiques. Les milieux conditionnés sont produits en infectant les cellules GB138 avec les virus oHSV-WT et oHSV-P2G, suivi d'une filtration qui permet d'éliminer les débris cellulaires et les particules virales.

De plus, l'ajout d'IFN γ ou d'IL4 permet d'induire une polarisation en un phénotype *M1-like* ou *M2-like*, respectivement.

Dans les expériences présentées, les cellules sont polarisées (IFN γ ou IL4) et/ou traitées (milieux conditionnés mNI, mWT ou mP2G).

2. Résultats préliminaires à la base de cette étude

Diverses expériences préliminaires ont été menées *in vitro* au laboratoire. Les premières consistent en des vérifications sur la permissivité des cellules de glioblastome (GB138), et sur la production du transgène P2G par le virus oHSV-P2G. La dernière concerne un *bulk RNA sequencing* (RNA-Seq), duquel découlent directement les expériences de ce travail.

Tout d'abord, la capacité d'oHSV-P2G à infecter les GB138 et à proliférer a été comparée à celle d'oHSV-WT par imagerie sur cellules vivantes. Pour une MOI identique (MOI = 1 ou 0,1), les deux virus présentent une courbe de prolifération similaire au cours du temps (IncuCyte, **Annexe 6**). Une diminution comparable de la viabilité des GB138 est également observée avec oHSV-WT et oHSV-P2G, en utilisant un indicateur coloré reflétant leur activité métabolique (résazurine) (**Annexe 7**).

L'expression de la chimiokine P2G par oHSV-P2G a été vérifiée par Western Blot dans les extraits protéiques des milieux de culture de GB138 infectées, en comparaison à des productions virales antérieures. L'expression de P2G a été validée par la détection de son HA-tag à ~10 kDa (**Annexe 8**).

De plus, la présence de P2G dans les milieux conditionnés obtenus après infection de GB138 par oHSV-P2G (mP2G) a été quantifiée par ELISA (**Annexe 9**). La concentration en P2G (exprimée en ng/10⁶ cellules) augmente avec le temps d'infection (18h, 24h, 48h). La concentration en P2G dans le milieu après 48h d'infection correspond également à celle en CXCL12 (données non représentées). De plus, la filtration des milieux n'impacte pas la concentration en P2G (**Annexe 9**). Enfin, les milieux mWT et mP2G n'entraînent pas l'infection des cellules mises en culture dans ceux-ci (données non représentées).

En outre, l'expression de CXCR4 par les GB138 (cellules de glioblastome) et les HMC3 a été analysée par cytométrie en flux (FACS) et montre presque 100% de cellules exprimant CXCR4 (données non représentées).

Une analyse RNA-Seq réalisée au préalable sur les macrophages humains (MDMs), a révélé un important panel de gènes surexprimés ou sous-exprimés dans différentes conditions expérimentales (milieux conditionnés : mNI, mWT et mP2G ; polarisation : IFN γ). Parmi les 100 gènes les plus modulés (analyse DESeq2 sur R), 23 gènes dont l'expression varie le plus dans les milieux conditionnés ont été sélectionnés, certains à caractère *M1-like* (*IL12*, *IDO1*, *TNF α* , *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *C1S*, *C1R*, *MT1G*, *MT2A*, *GBP1*, *GBP5*, *PLAAT4*, *APOL4*, *IL10*) et d'autres à caractère *M2-like* (*CXCR4*, *TNC*, *CD163L1*, *SLC16A10*, *THBS1*, *THBD*, *FN1*, *VCAN*) (**Annexe 10**). La littérature a permis de compléter cette liste avec 5 gènes supplémentaires, à caractère *M1-like* (*INOS*, *IL6*) ou *M2-like* (*MMP2*, *CXCL12*, *SIRP α*). Ces 28 gènes constituent la base de l'étude de l'impact du virus oHSV-P2G sur la polarisation des TAMMs.

3. Analyse transcriptomique par RT-qPCR de la polarisation des TAMMS

La polarisation des TAMMs, et en particulier des MDMs, est étudiée par analyse transcriptomique réalisée par RT-qPCR, sur base des résultats obtenus avec le RNA-Seq (point 2).

3.1. Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes *M1-like* et *M2-like* dans les MDMs

3.1.1. Polarisation des MDMs en un phénotype *M1-like* ou *M2-like*

Dans un premier temps, afin de confirmer la capacité de l'IFN γ et de l'IL4 à induire respectivement une polarisation *M1-like* et *M2-like*, l'expression du set de gènes établi sur base du RNA-Seq et de la littérature a été étudiée par RT-qPCR, sur des MDMs non traités (M0), traités à l'IFN γ (M0 + IFN γ) ou traités à l'IL4 (M0 + IL4).

En condition M0, de nombreux transcrits de gènes *M1-like* sont indétectables et nécessitent un traitement à l'IFN γ pour être détectés. Pour chacun des gènes (*M1-like* et *M2-like*), les valeurs obtenues

dans la condition M0 + IFN γ ont été considérées comme égales à 1 et ont servi à la normalisation des données pour les autres conditions expérimentales. L'hypothèse de travail suggère qu'en absence d'IFN γ (conditions M0 ou M0 + IL4), l'expression des gènes *M1-like* diminue par rapport à celle observée en présence d'IFN γ , tandis que l'expression des gènes *M2-like* augmente.

Analyse des marqueurs M1-like (Figure 11.A). Dans les cellules M0 ou traitées à l'IL4, 12 des 14 gènes *M1-like* analysés sont moins exprimés que dans les cellules traitées à l'IFN γ . Cette diminution d'expression est significative, sauf pour *IL12*. *IL6* est le seul gène surexprimé, mais il ne l'est pas de manière significative. Le gène *INOS* n'a été détecté dans aucune condition expérimentale (ND).

Analyse des marqueurs M2-like (Figure 11.B). Dans les cellules M0 ou traitées à l'IL4, 7 gènes *M2-like* sur 14 sont surexprimés en comparaison aux cellules traitées à l'IFN γ . Cette surexpression est significative pour *CXCR4*. Les autres gènes ne montrent pas de différence d'expression en présence d'IL4. Néanmoins, le marqueur *MMP2* est surexprimé de manière significative par les cellules M0 par rapport aux cellules traitées à l'IFN γ . Le gène *IL4* n'a été détecté dans aucune condition expérimentale (ND).

La majorité des gènes décrits *M1-like* sont donc sur-exprimés de manière significative en présence IFN γ , ce qui suggère que l'IFN γ amène à une polarisation *M1-like* marquée des MDMs. A contrario, l'ajout d'IL4 montre une tendance non significative à surexprimer les gènes décrits *M2-like*. L'IL4 amène donc à une polarisation *M2-like* nuancée des MDMs.

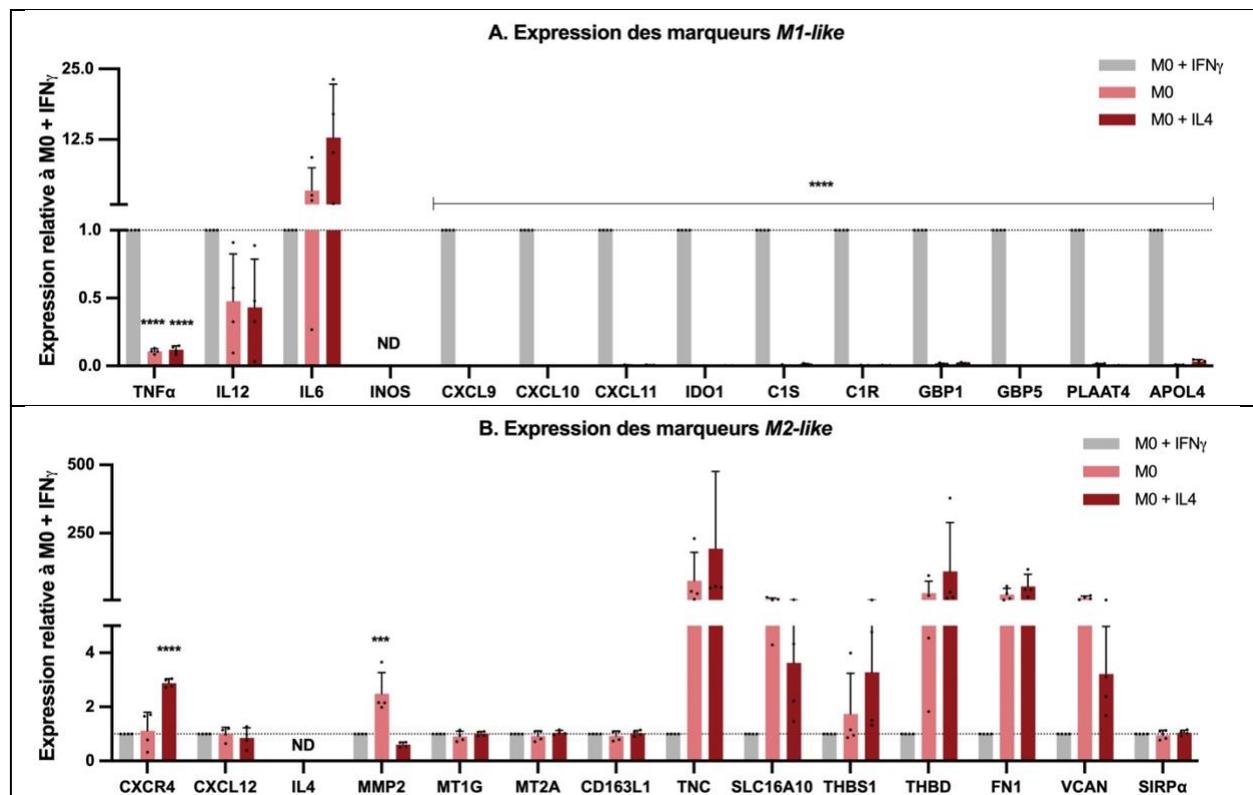


Figure 11. Polarisation des macrophages (MDMs) en un phénotype M1-like par l'IFN γ et M2-like par l'IL4. Expression des marqueurs M1-like (A) et M2-like (B) par les MDMs. Les MDMs sont cultivés sans réactif (M0) ou en présence d'IFN γ (M0 + IFN γ) ou d'IL4 (M0 + IL4) pendant 48h. L'ARN est extrait, rétro-transcrit en ADNc et amplifié par RT-qPCR. L'expression des gènes est normalisée au gène *TBP* (*house keeping gene*) et relativisée à la condition M0 + IFN γ . La RT-qPCR est réalisée en plusieurs réplicats biologiques (N=4), les données représentées en sont la

moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques correspondent au T-test (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur $\leq 0,05$; ** = p-valeur $\leq 0,01$; *** = p-valeur $\leq 0,001$; **** = p-valeur $\leq 0,0001$). ND : non détectable. Figure réalisée avec GraphPad Prism.

3.1.2. Polarisation des MDMs par le microenvironnement tumoral

Ensuite, afin de confirmer la polarisation *M2-like* des MDMs induite par la tumeur, l'expression du set de gènes a été étudiée par RT-qPCR, sur des MDMs traités avec du milieu conditionné de cellules GB138 non infectées (M0 + mNI). Ce milieu permet de mimer le milieu extracellulaire de la tumeur en absence de traitement viral. Ceci a été comparé à l'expression en présence d'IFN γ (M0 + IFN γ).

Les valeurs obtenues dans la condition M0 + IFN γ ont été considérées comme égales à 1 et ont servi à la normalisation des données pour la condition expérimentale M0 + mNI. L'hypothèse de travail suggère qu'en présence de mNI (M0 + mNI), l'expression des gènes *M1-like* diminue par rapport à celle observée en présence d'IFN γ , tandis que l'expression des gènes *M2-like* augmente.

Analyse des gènes *M1-like* (Figure 12.A). Dans les cellules M0 traitées au mNI, 12 des 14 gènes *M1-like* analysés sont sous-exprimés par rapport à leur niveau d'expression dans des cellules polarisées à l'IFN γ . Cette diminution d'expression est significative, sauf pour *IL12*. *IL6* est le seul gène surexprimé, mais il ne l'est pas de manière significative. Le gène *INOS* n'a été détecté dans aucune condition expérimentale (ND).

Analyse des gènes *M2-like* (Figure 12.B). Dans les cellules M0 traitées au mNI, 9 gènes *M2-like* sur les 14 analysés sont surexprimés par rapport aux cellules polarisées à l'IFN γ , mais cette surexpression n'est significative que dans le cas de *MMP2*. Les autres gènes ne montrent pas de différence d'expression en présence de mNI. Le gène *IL4* n'a été détecté dans aucune condition expérimentale (ND).

En présence de mNI, la majorité des gènes décrits *M1-like*, sont sous-exprimés de manière significative et une grande partie des gènes *M2-like* sont surexprimés, comparé aux cellules traitées à l'IFN γ . Le milieu mNI induit donc une polarisation *M2-like* opposée à la polarisation *M1-like* induite par l'IFN γ .

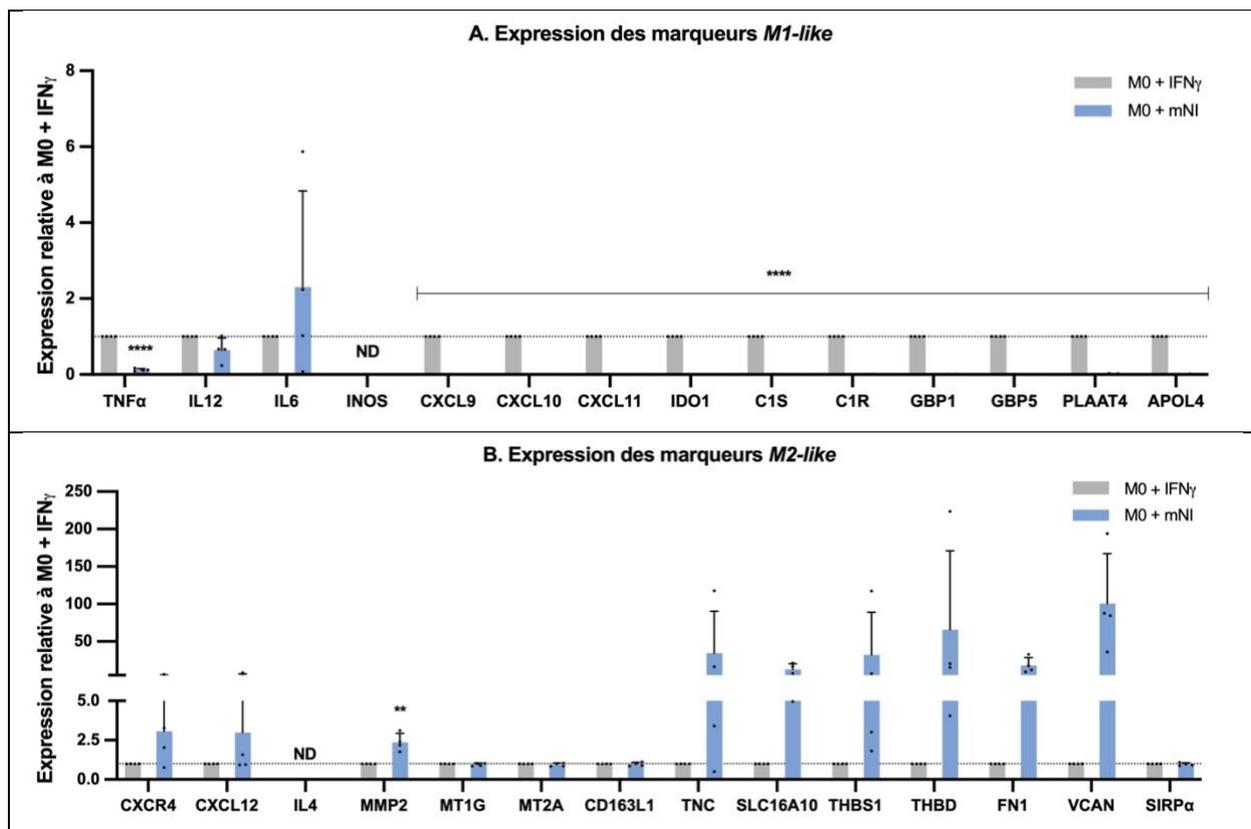


Figure 12. Polarisation des macrophages (MDMs) en un phénotype M2-like par le microenvironnement tumoral (mNI). Expression des marqueurs M1-like (A) et M2-like (B) par les MDMs. Les MDMs sont cultivés en présence d'IFN γ (MO + IFN γ) ou de milieu conditionné de cellules de GBM (GB138) non infectées (MO + mNI) pendant 48h. L'ARN est extrait, rétro-transcrit en ADNc et amplifié par RT-qPCR. L'expression des gènes est normalisée au gène TBPh (house keeping gene) et relativisée à la condition MO + IFN γ . La RT-qPCR est réalisée en plusieurs réplicats biologiques (N=4), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques correspondent au T-test (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur $\leq 0,05$; ** = p-valeur $\leq 0,01$; *** = p-valeur $\leq 0,001$; **** = p-valeur $\leq 0,0001$). ND : non détectable. Figure réalisée avec GraphPad Prism.

3.1.3. Effet d'oHSV-P2G sur la polarisation des MDMs

Afin de déterminer l'impact des virus oHSV-WT et oHSV-P2G sur la polarisation des MDMs, l'expression du set de gènes a été étudiée par RT-qPCR, sur les MDMs non polarisés (MO) et traités avec du milieu conditionné de cellules GB138 traitées avec oHSV-WT (MO + mWT) ou oHSV-P2G (MO + mP2G). Ces milieux permettent de mimer le milieu extracellulaire de la tumeur infectée par oHSV-WT ou oHSV-P2G. Ceci a été comparé à l'expression des cellules non polarisées et traitées au milieu mNI (MO + mNI). Les valeurs obtenues dans la condition MO + mNI ont été considérées comme égales à 1 et ont servi à la normalisation des données pour les autres conditions expérimentales.

Analyse des gènes M1-like (Figure 13.A). Dans les cellules MO traitées au mWT ou au mP2G, la plupart des gènes M1-like analysés ne montrent pas de différence d'expression comparé aux cellules MO traitées au mNI. Certains gènes montrent une surexpression, mais celle-ci est due à un point particulièrement haut, ce qui donne un écart-type important. Aucune différence significative n'est détectée entre les

conditions mWT et mP2G. Les gènes *IL12*, *INOS*, *CXCL11* et *IDO1* n'ont été détectés dans aucune condition expérimentale (ND).

Analyse des gènes M2-like (Figure 13.B). Dans les cellules M0 traitées au mWT ou au mP2G, 11 gènes sur les 14 M2-like analysés ne montrent pas de différence d'expression, ou sont légèrement sous-exprimés par rapport aux cellules M0 traitées au mNI. Cette sous-expression n'est cependant pas significative. *CXCL12* est légèrement surexprimé (non significatif) en présence de mP2G. *TNC* et *THBD* sont également surexprimés en présence de mWT et de mP2G, mais les écarts-types importants ne permettent pas de tirer de conclusion. Aucune différence significative n'est détectée entre les conditions mWT et mP2G. Le gène *IL4* n'a été détecté dans aucune condition expérimentale (ND).

Les milieux conditionnés mWT et mP2G ne changent donc pratiquement pas l'expression des marqueurs M1-/M2-like des MDMs, comparé au milieu conditionné mNI qui induit une polarisation M2-like.

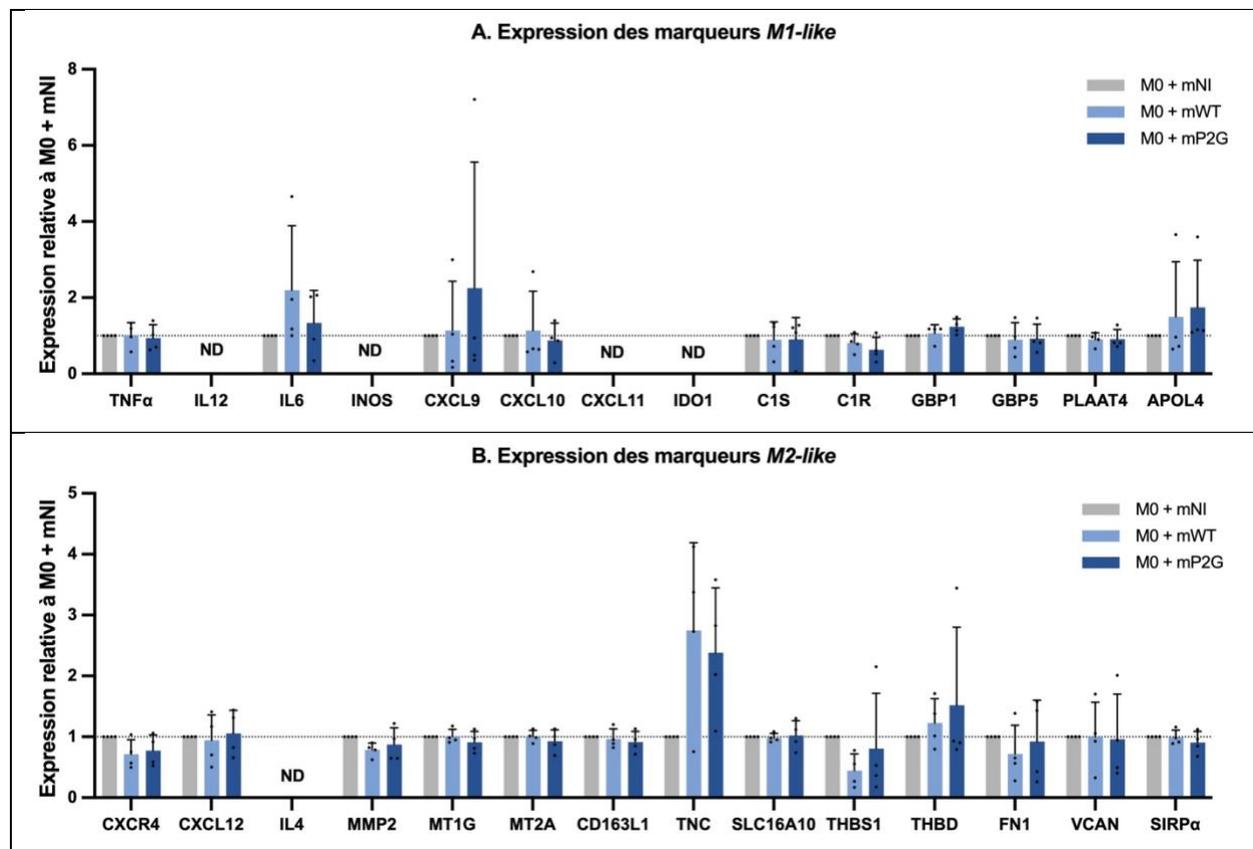


Figure 13. oHSV-P2G n'influence pas la polarisation des macrophages (MDMs). Expression des marqueurs M1-like (A) et M2-like (B) par les MDMs. Les MDMs non polarisés sont cultivés avec du milieu conditionné de cellules de GBM (GBM138) non infectées (M0 + mNI), ou infectées avec oHSV-WT (M0 + mWT) ou oHSV-P2G (M0 + mP2G) pendant 48h. L'ARN est extrait, rétro-transcrit en ADNc et amplifié par RT-qPCR. L'expression des gènes est normalisée au gène *TBPh* (house keeping gene) et relativisée à la condition M0 + mNI. La RT-qPCR est réalisée en plusieurs réplicats biologiques (N=4), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques correspondent au T-test (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur <= 0,05 ; ** = p-valeur <= 0,01 ; *** = p-valeur <= 0,001 ; **** = p-valeur <= 0,0001). ND : non détectable. Figure réalisée avec GraphPad Prism.

3.1.4. Effet d'oHSV-P2G sur la polarisation des MDMs en présence d'IFN γ

Afin de déterminer l'impact des virus oHSV-WT et oHSV-P2G sur la polarisation des MDMs initialement polarisés *M1-like* par ajout d'IFN γ , l'expression du set de gènes a été étudiée par RT-qPCR, sur les MDMs polarisés à l'IFN γ et traités avec du milieu mWT ou mP2G (M0 + IFN γ + mWT ou M0 + IFN γ + mP2G). Ceci a été comparé à l'expression des cellules polarisées à l'IFN γ et traitées au milieu mNI (M1 + IFN γ + mNI). Les valeurs obtenues dans la condition M0 + IFN γ + mNI ont été considérées comme égales à 1 et ont servi à la normalisation des données pour les autres conditions expérimentales.

Analyse des gènes *M1-like* (Figure 14.A). Dans les cellules polarisées à l'IFN γ et traitées avec mWT ou mP2G, seuls les gènes *C1S* et *C1R* sont surexprimés par rapport à leur niveau d'expression dans les cellules polarisées à l'IFN γ et traitées avec mNI. Cette surexpression n'est cependant pas significative. L'expression de *CXCL9*, *CXCL10* et *CXCL11* est par contre diminuée en présence de mWT ou de mP2G, cette diminution n'étant cependant significative que pour *CXCL10* et *CXCL11*. L'expression des autres gènes n'est impactée ni par mWT ni par mP2G. Aucune différence significative n'est détectée entre les conditions mP2G et mWT. Les gènes *IL6* et *INOS* n'ont été détectés dans aucune condition expérimentale (ND).

Analyse des gènes *M2-like* (Figure 14.B). Dans les cellules polarisées à l'IFN γ et traitées au mP2G, la majorité des gènes *M2-like* analysés ne montrent pas de différence d'expression comparé aux cellules polarisées à l'IFN γ et traitées au mNI. Certains gènes sont surexprimés, mais cette surexpression n'est pas significative compte tenu de la très grande variabilité observée entre les réplicats biologiques. Les gènes *IL4* et *THBD* n'ont été détectés dans aucune condition expérimentale (ND).

En présence d'IFN γ , le traitement au mWT ou au mP2G n'influence donc pas l'expression des marqueurs *M1-like* ou *M2-like* des MDMs, comparé au milieu mNI.

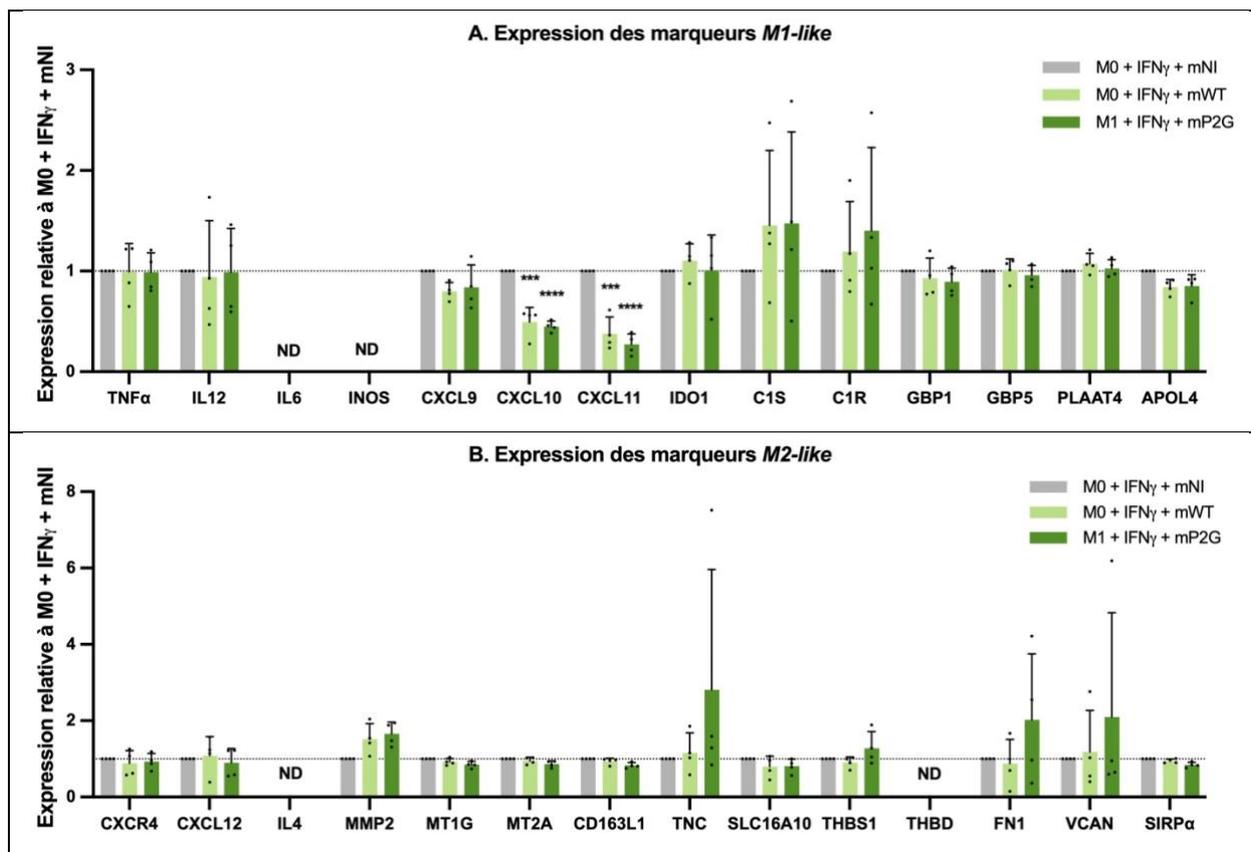


Figure 14. oHSV-P2G n'influence pas la polarisation des macrophages (MDMs) en présence d'IFN γ . Expression des marqueurs M1-like (A) et M2-like (B) par les MDMs. Les MDMs polarisés à l'IFN γ sont cultivées avec du milieu conditionné de cellules de GBM (GB138) non infectées (M0 + IFN γ + mNI), ou infectées avec oHSV-WT (M0 + IFN γ + mWT) ou oHSV-P2G (M0 + IFN γ + mP2G) pendant 48h. L'ARN est extrait, rétro-transcrit en ADNc et amplifié par RTq-PCR. L'expression des gènes est normalisée au gène TBPh (house keeping gene) et relativisée à la condition M0 + IFN γ + mNI. Le milieu mP2G n'influence pas l'expression des marqueurs M2-like. Il ne montre aucune différence avec le milieu mWT. La RT-qPCR est réalisée en plusieurs réplicats biologiques (N=4), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques correspondent au T-test (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur \leq 0,05 ; ** = p-valeur \leq 0,01 ; *** = p-valeur \leq 0,001 ; **** = p-valeur \leq 0,0001). ND : non détectable. Figure réalisée avec GraphPad Prism.

3.2. Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes M1-like et M2-like dans les HMC3

Le milieu mP2G n'impactant pas significativement la polarisation des macrophages (MDMs), il a ensuite été étudié dans le contexte de la microglie (HMC3).

3.2.1. Polarisation des HMC3 en un phénotype M1-like ou M2-like

Dans un premier temps, afin de confirmer la capacité de l'IFN γ et de l'IL4 à induire respectivement une polarisation M1-like et M2-like des HMC3, l'expression du set de gènes établi a été étudiée par RT-qPCR, sur des HMC3 non traitées (M0), traitées à l'IFN γ (M0 + IFN γ) ou traitées à l'IL4 (M0 + IL4).

Comme dans les MDMs, de nombreux gènes M1-like sont indétectables dans les cellules M0 en absence d'IFN γ . Pour chacun des gènes (M1-like et M2-like), les valeurs obtenues dans la condition M0 + IFN γ ont donc été considérées comme égales à 1 et ont servi à la normalisation des données pour les autres conditions expérimentales. L'hypothèse de travail suggère qu'en absence d'IFN γ (conditions M0 ou M0

+ IL4), l'expression des gènes *M1-like* diminue par rapport à celle observée en présence d'IFN γ , tandis que l'expression des gènes *M2-like* augmente.

Analyse des marqueurs M1-like (Figure 15.A). Dans les cellules M0 ou M0 traitées à l'IL4, les 14 gènes *M1-like* analysés sont moins exprimés que dans les cellules traitées à l'IFN γ . Cette diminution d'expression est significative, sauf pour *IL12*, *INOS* et *PLAAT4*.

Analyse des marqueurs M2-like (Figure 15.B). Dans les cellules M0 ou M0 traitées à l'IL4, 11 gènes *M2-like* sur les 14 analysés sont surexprimés en comparaison aux cellules traitées à l'IFN γ . Cependant, cette surexpression n'est pas significative. Les trois autres gènes sont légèrement moins exprimés en présence d'IL4.

L'ajout d'IFN γ permet donc une polarisation *M1-like* des HMC3 et l'ajout d'IL4 amène à une polarisation *M2-like* plus nuancée des HMC3.

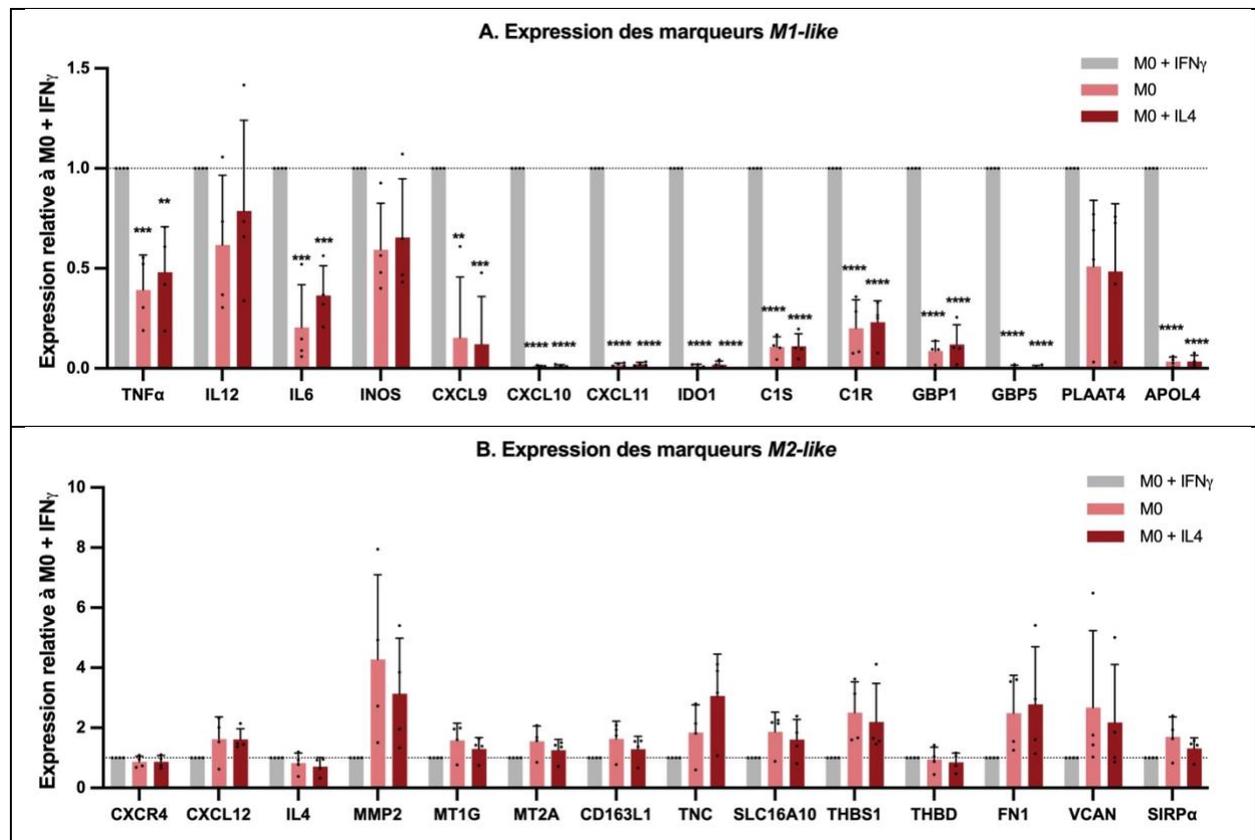


Figure 15. Polarisation de la microglie (HMC3) en un phénotype M1-like par l'IFN γ ou M2-like par l'IL4. Expression des marqueurs M1-like (A) et M2-like (B) par les HMC3. Les HMC3 sont cultivées sans réactif (M0) ou en présence d'IFN γ (M0 + IFN γ) ou d'IL4 (M0 + IL4) pendant 48h. L'ARN est extrait, rétro-transcrit en ADNc et amplifié par RT-qPCR. L'expression des gènes est normalisée au gène *TBPh* (house keeping gene) et relativisée à la condition M0 + IFN γ . La RT-qPCR est réalisée plusieurs réplicats biologiques (N=4), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques correspondent au T-test (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur $\leq 0,05$; ** = p-valeur $\leq 0,01$; *** = p-valeur $\leq 0,001$; **** = p-valeur $\leq 0,0001$). Figure réalisée avec GraphPad Prism.

3.2.2. Polarisation des HMC3 par le microenvironnement tumoral

Ensuite, afin de confirmer la polarisation *M2-like* des HMC3 induite par la tumeur, l'expression du set de gènes a été étudiée par RT-qPCR, sur des HMC3 traitées avec du milieu conditionné de cellules GB138 non infectées (M0 + mNI). Ceci a été comparé à l'expression en présence d'IFN γ (M0 + IFN γ).

Les valeurs obtenues dans la condition M0 + IFN γ ont été considérées comme égales à 1 et ont servi à la normalisation des données pour la condition expérimentale M0 + mNI. L'hypothèse de travail suggère qu'en présence de mNI (M0 + mNI), l'expression des gènes *M1-like* diminue par rapport à celle observée en présence d'IFN γ , tandis que l'expression des gènes *M2-like* augmente.

Analyse des marqueurs *M1-like* (Figure 16.A). Dans les cellules M0 traitées au mNI, tous les gènes *M1-like* analysés sont sous-exprimés par rapport aux cellules M0 polarisées à l'IFN γ . Cette diminution d'expression est significative, sauf pour *IL12*, *INOS* et *PLAAT4*.

Analyse des marqueurs *M2-like* (Figure 16.B). Dans les cellules M0 traitées au mNI, 12 gènes *M2-like* sur les 14 analysés sont surexprimés comparé aux cellules M0 polarisées à l'IFN γ . Cette surexpression n'est cependant pas significative. Parmi les deux marqueurs sous-exprimés, *TNC* ne l'est que légèrement. Par contre, la sous-expression de *THBD* est significative.

En présence de mNI, la majorité des gènes décrits *M1-like* sont sous-exprimés de manière significative par rapport aux cellules M0 traitées à l'IFN γ . Une grande partie des gènes *M2-like* sont surexprimés par rapport aux cellules M0 traitées à l'IFN γ , mais cette surexpression n'est pas significative. Le milieu mNI induit donc une polarisation *M2-like* opposée à la polarisation *M1-like* induite par l'IFN γ .

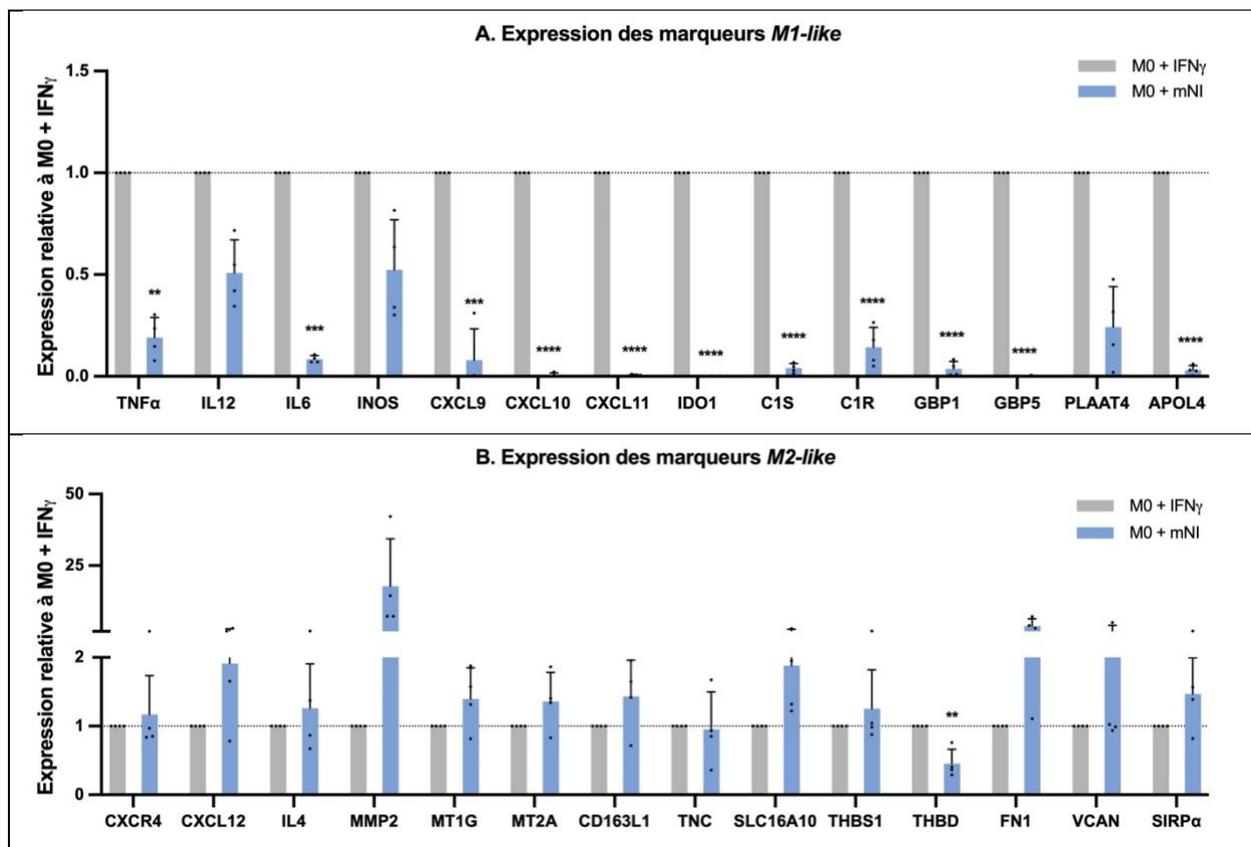


Figure 16. Polarisation de la microglie (HMC3) en un phénotype M2-like par le microenvironnement tumoral (mNI). Expression des marqueurs M1-like (A) et M2-like (B) par les HMC3. Les HMC3 sont cultivées en présence d'IFN γ (M0 + IFN γ) ou de milieu conditionné de cellules de GBM (GB138) non infectées (M0 + mNI) pendant 48h. L'ARN est extrait, rétro-transcrit en ADNc et amplifié par RT-qPCR. L'expression des gènes est normalisée au gène *TBP* (*house keeping gene*) et relativisée à la condition M0 + IFN γ . La RT-qPCR est réalisée en triplicatas biologiques (N=3), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques correspondent au T-test (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur $\leq 0,05$; ** = p-valeur $\leq 0,01$; *** = p-valeur $\leq 0,001$; **** = p-valeur $\leq 0,0001$). Figure réalisée avec GraphPad Prism.

3.2.3. Effet d'oHSV-P2G sur la polarisation des HMC3

Afin de déterminer l'impact des virus oHSV-WT et oHSV-P2G sur la polarisation des HMC3, l'expression du set de gènes a été étudiée par RT-qPCR, sur les HMC3 non polarisées et traitées avec du milieu conditionné de cellules GB138 infectées par oHSV-WT (M0 + mWT) ou oHSV-P2G (M0 + mP2G). Ceci a été comparé à l'expression des HMC3 non polarisées et traitées au milieu mNI (M0 + mNI).

Les valeurs obtenues dans la condition M0 + mNI ont été considérées comme égales à 1 et ont servi à la normalisation des données pour les autres conditions expérimentales.

Analyse des marqueurs M1-like (Figure 17.A). Les cellules M0 traitées au mWT montrent une augmentation de l'expression de la plupart des gènes *M1-like*, par rapport à l'expression dans les cellules M0 traitées au mNI. Néanmoins, seule l'expression d'*IDO1* est significativement augmentée. Le milieu mP2G induit également la surexpression de 10 gènes *M1-like* et cette surexpression est significative pour *IL6*, *IDO1* et *PLAAT4*. La présence de mWT et mP2G induit une diminution de l'expression d'*INOS*, cette

sous-expression étant significative uniquement avec mWT. Les gènes *CXCL10* et *GBP5* n'ont été détectés dans aucune condition expérimentale (ND).

Analyse des marqueurs M2-like (Figure 17.B). L'expression des gènes *M2-like* semble légèrement diminuée dans les cellules M0 traitées avec mWT ou mP2G. L'expression de *MMP2* est significativement diminuée, tandis que l'expression de *CXCR4* est significativement augmentée, et ce uniquement en présence de mP2G. Le gène *IL4* n'a été détecté dans aucune condition expérimentale (ND).

Le milieu conditionné mP2G, induit donc une surexpression de la plupart des marqueurs *M1-like* et une expression légèrement inférieure d'une partie des marqueurs *M2-like*, par rapport au milieu mNI.

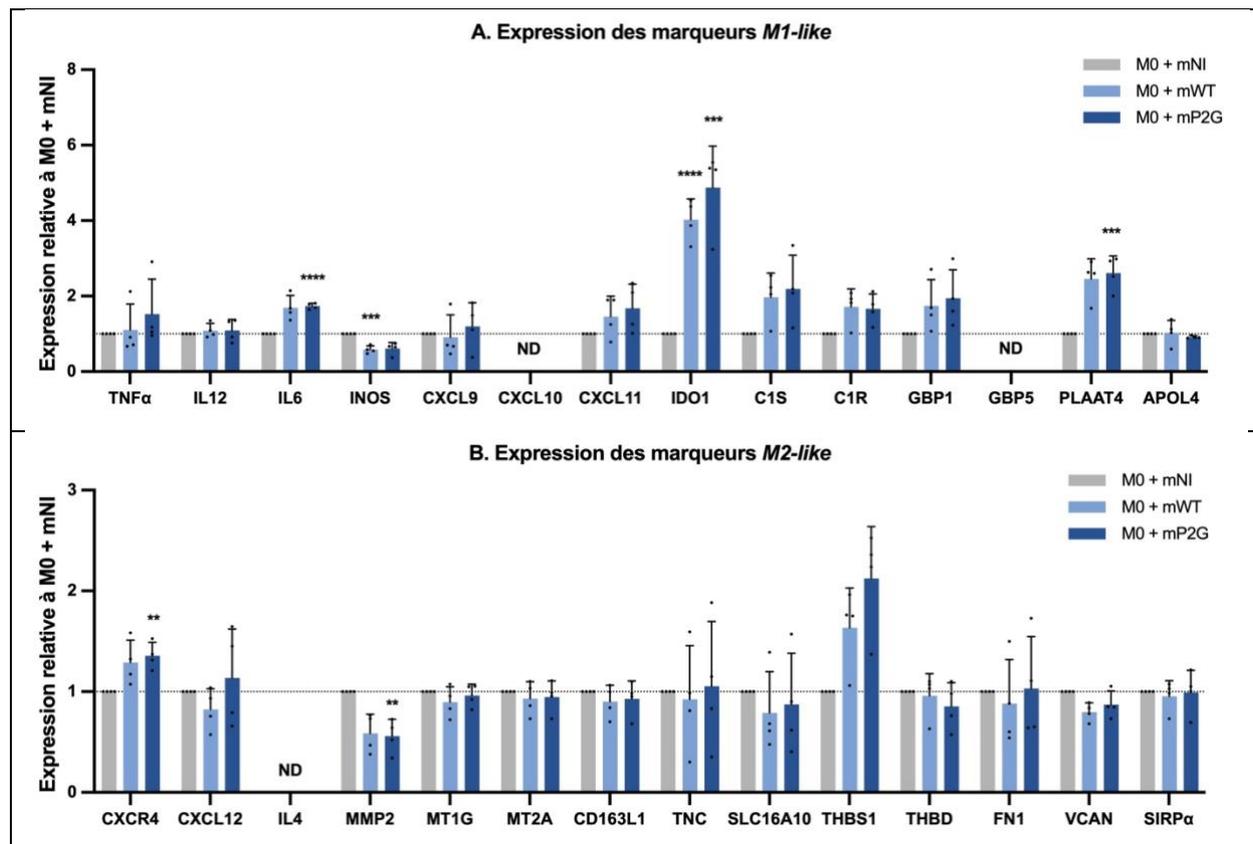


Figure 17. oHSV-P2G induit une polarisation M1-like de la microglie (HMC3). Expression des marqueurs M1-like (A) et M2-like (B) par les HMC3. Les HMC3 non polarisées sont cultivées avec du milieu conditionné de cellules de GBM (GB138) non infectées (M0 + mNI), ou infectées avec oHSV-WT (M0 + mWT) ou oHSV-P2G (M0 + mP2G) pendant 48h. L'ARN est extrait, rétro-transcrit en ADNc et amplifié par RT-qPCR. L'expression des gènes est normalisée au gène *TBPh* (house keeping gene) et relativisée à la condition M0 + mNI. La RT-qPCR est réalisée en plusieurs réplicats biologiques (N=4), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques correspondent au T-test (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur <= 0,05 ; ** = p-valeur <= 0,01 ; *** = p-valeur <= 0,001 ; **** = p-valeur <= 0,0001). ND : non détectable. Figure réalisée avec GraphPad Prism.

3.2.4. Effet d'oHSV-P2G sur la polarisation des HMC3 en présence d'IFN γ

Afin de déterminer l'impact des virus oHSV-WT et oHSV-P2G sur la polarisation des HMC3 initialement polarisées *M1-like* par ajout d'IFN γ , l'expression du set de gènes a été étudiée par RT-qPCR, sur les HMC3 polarisées à l'IFN γ et traitées avec du milieu mWT (M0 + IFN γ + mWT) ou mP2G (M0 + IFN γ + mP2G).

Ceci a été comparé à l'expression des cellules polarisées à l'IFN γ et traitées au milieu mNI (M0 + IFN γ + mNI).

Les valeurs obtenues dans la condition M0 + IFN γ + mNI ont été considérées comme égales à 1 et ont servi à la normalisation des données pour les autres conditions expérimentales.

Analyse des marqueurs M1-like (Figure 18.A). Les cellules polarisées à l'IFN γ et traitées avec mWT ou mP2G, montrent une augmentation de l'expression de la plupart des gènes *M1-like* analysés, par rapport à l'expression dans les cellules polarisées à l'IFN γ et traitées avec mNI. Cette surexpression est significative pour *CXCL9* et *CXCL11*, uniquement dans le cas de mP2G. Les milieux mWT et mP2G induisent également une expression légèrement inférieure de certains gènes, qui est significative pour *INOS* dans le cas de mP2G.

Analyse des marqueurs M2-like (Figure 18.B). Dans les cellules polarisées à l'IFN γ et traitées au mWT ou au mP2G, la majorité des gènes *M2-like* analysés sont sous-exprimés par rapport à l'expression dans les cellules polarisées à l'IFN γ et traitées avec mNI. Cette sous-expression est significative pour *CXCL12*, *MMP2*, *MT1G*, *MT2A*, *CD163L1* et *SIRP α* , uniquement en présence de mP2G. *TNC* est le seul gène surexprimé en présence de mP2G, mais pas de manière significative. Le gène *IL4* n'a été détecté dans aucune condition expérimentale (ND).

Lorsque les HMC3 sont polarisées *M1-like* par l'IFN γ , le traitement avec mWT ou mP2G induit une surexpression d'une majorité de gènes *M1-like* et une légère diminution de l'expression des marqueurs *M2-like*. L'effet de mP2G est plus marqué que celui de mWT.

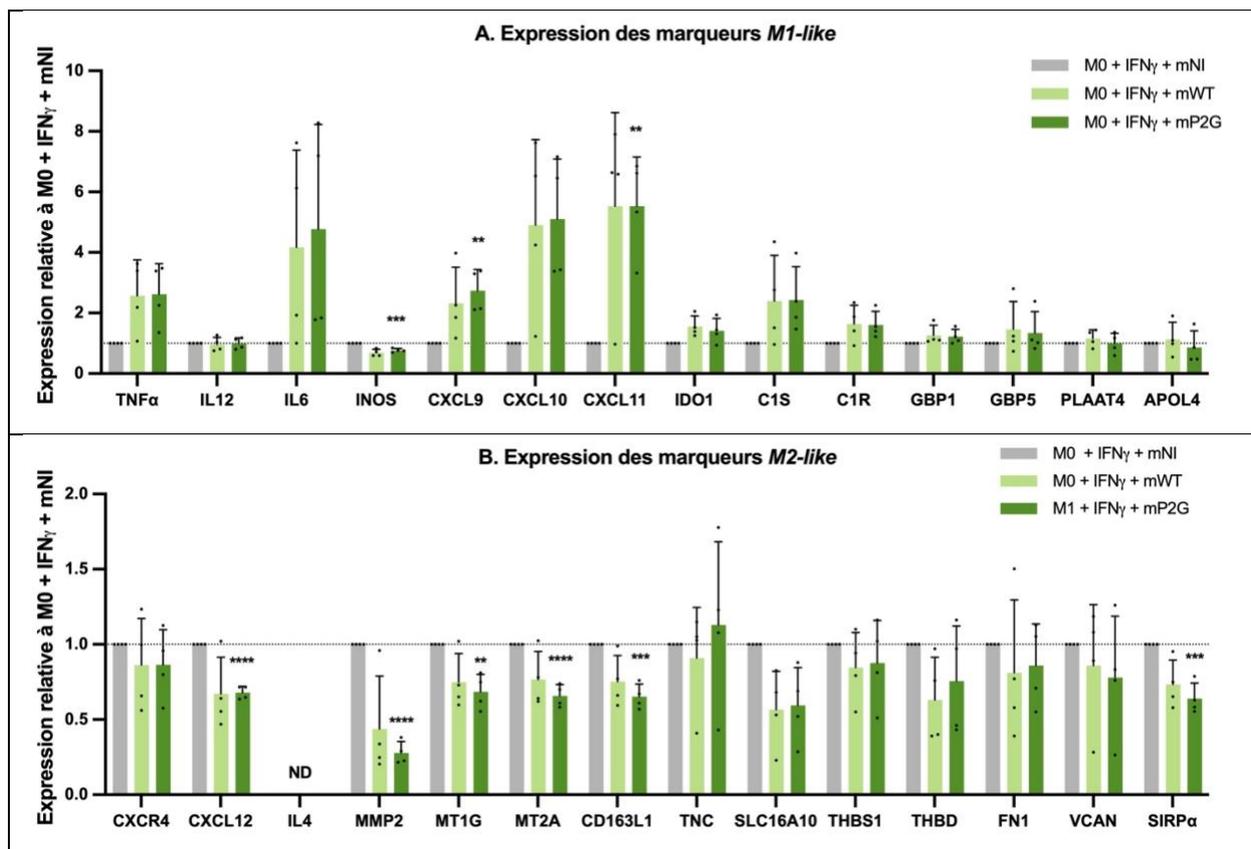


Figure 18. oHSV-P2G induit une polarisation M1-like de la microglie (HMC3) en présence d'IFN γ Expression des marqueurs M1-like (A) et M2-like (B) par les HMC3. Les HMC3 polarisées à l'IFN γ sont cultivées avec du milieu conditionné de cellules de GBM (GB138) non infectées (M0 + IFN γ + mNI), ou infectées avec oHSV-WT (M0 + IFN γ + mWT) ou oHSV-P2G (M0 + IFN γ + mP2G) pendant 48h. L'ARN est extrait, rétro-transcrit en ADNc et amplifié par RT-qPCR. L'expression des gènes est normalisée au gène TBPh (house keeping gene) et relativisée à la condition M0 + IFN γ + mNI. La RT-qPCR est réalisée en plusieurs réplicats biologiques (N=4), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques correspondent au T-test (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur \leq 0,05 ; ** = p-valeur \leq 0,01 ; *** = p-valeur \leq 0,001 ; **** = p-valeur \leq 0,0001). ND : non détectable. Figure réalisée avec GraphPad Prism.

4. Analyse de la capacité de phagocytose des TAMMs

4.1. Capacité de phagocytose des MDMs

La capacité de phagocytose des MDMs est étudiée par l'analyse en cytométrie en flux (FACS) de l'internalisation d'amyloïde fluorescent (fA β Fluor 488). Les conditions expérimentales comportent des cellules polarisées ou non à l'IFN γ ou à l'IL4, et/ou traitées ou non avec les milieux conditionnés mNI, mWT et mP2G. Comme pour l'analyse par RT-qPCR de la polarisation des MDMs, l'impact du virus oHSV-P2G sur la fonction de phagocytose est étudié au travers du milieu mP2G et comparé au milieu mNI. Cet impact est également analysé en présence ou non d'IFN γ .

L'analyse en cytométrie en flux révèle que plus de 80% des MDMs phagocytent du fA β , que les cellules soient polarisées ou non, et/ou traitées avec du milieu conditionné ou non (**Annexe 11, incubation 6 heures**). Le nombre de cellules phagocytant du fA β étant identique dans chacune des conditions, il est

important de mesurer l'intensité de fluorescence médiane (*Median Fluorescence Intensity*, MFI) des cellules positives au fA β (fA β ⁺), qui rend compte de l'efficacité de la phagocytose des MDMs selon les différentes conditions. Les résultats des sections suivantes seront donc présentés sur base de la MFI. La stratégie d'analyse est présentée dans la section Matériel et Méthodes.

En l'absence de milieu conditionné, les MDMs polarisés à l'IFN γ (*M1-like*) phagocytent significativement moins que les MDMs non polarisés (M0) ou polarisés à l'IL4 (*M2-like*) (**Figure 19.A**).

Les cellules M0 traitées au mNI phagocytent plus que les cellules M0 non traitées, mais cette augmentation n'est pas significative (**Figure 19.B**). En revanche, les cellules M0 traitées avec mWT ou mP2G phagocytent significativement moins que les cellules M0 traitées au mNI (**Figure 19.B**).

Les cellules *M1-like* traitées avec les milieux mNI, mWT et mP2G phagocytent moins que les cellules *M1-like* non traitées (**Figure 19.C**). Cette diminution est d'ailleurs significative pour mP2G. Par contre, aucune différence de phagocytose n'est détectée entre les milieux mNI, mWT et mP2G pour les cellules *M1-like* (**Figure 19.C**).

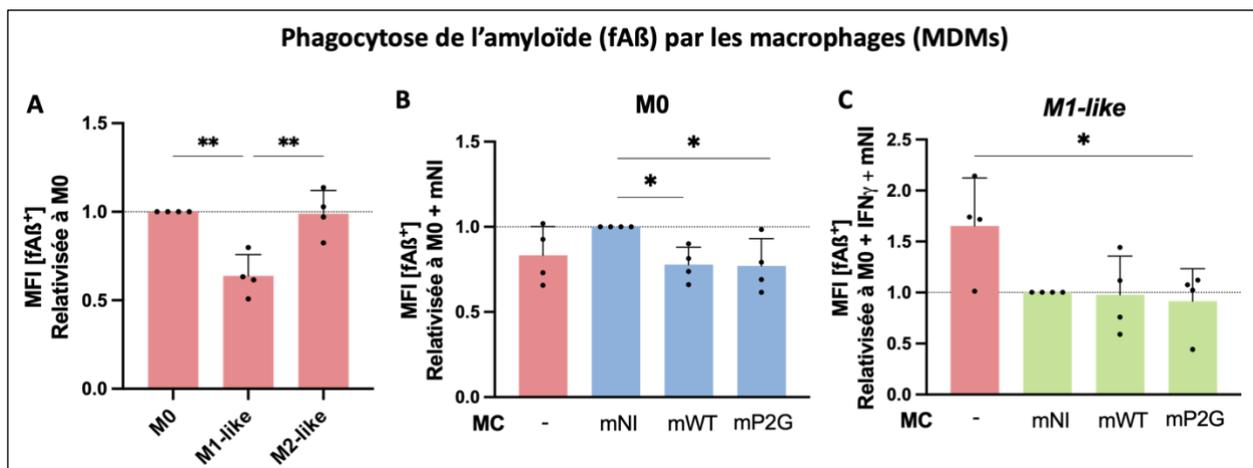


Figure 19. oHSV-P2G diminue la phagocytose de l'amyloïde (fA β) par les macrophages (MDMs). Phagocytose du fA β par les MDMs. A. MDMs polarisés à l'IFN γ ou à l'IL4. B. MDMs non polarisés (M0). C. MDMs polarisés à l'IFN γ (*M1-like*). Les MDMs sont polarisés (IFN γ ou IL4) ou non, et/ou traités aux milieux conditionnés de cellules de GBM (GB138) non infectées (mNI) ou infectées par oHSV-WT (mWT) ou oHSV-P2G (mP2G) ou non traités pendant 48h. Ils sont incubés pendant 6h avec l'amyloïde fluorescent (fA β). Les échantillons sont marqués au ZombieNIR (marqueur de mort cellulaire), fixés à la PAF 4%, puis analysés par cytométrie en flux (FACS Fortessa). L'expérience est réalisée en plusieurs réplicats biologiques (N=4), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. MFI = Median Fluorescence Intensity ; fA β ⁺ = cellules positives au fA β Fluor 48 , MFI [fA β ⁺] = MFI calculée sur l'ensemble des cellules fA β ⁺. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques correspondent au test Anova (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur <= 0,05 ; ** = p-valeur <= 0,01 ; *** = p-valeur <= 0,001 ; **** = p-valeur <= 0,0001). MC = milieu conditionné. Figure réalisée avec GraphPad Prism.

4.2.Capacité de phagocytose des HMC3

4.2.1. Effet du virus oHSV-P2G sur la phagocytose de l'amyloïde par la microglie

La polarisation à l'IFN γ et/ou aux milieux conditionnés mWT et mP2G montrant une diminution de la capacité de phagocytose des MDMs, cette fonction a ensuite été étudiée dans le cadre de la microglie (HMC3) et pour les mêmes conditions expérimentales.

L'analyse en cytométrie en flux révèle que plus de 80% des HMC3 phagocytent du fA β , que les cellules soient polarisées ou non, et/ou traitées avec du milieu conditionné ou non (**Annexe 12, incubation 6 heures**). Le nombre de cellules phagocytant du fA β étant identique dans chacune des conditions, il est important de mesurer l'intensité de fluorescence médiane (*Median Fluorescence Intensity*, MFI) des cellules positives au fA β (fA β ⁺), qui rend compte de l'efficacité de la phagocytose des HMC3 selon les différentes conditions. La stratégie d'analyse est présentée dans la section Matériel et Méthodes. Les résultats des sections suivantes seront donc présentés sur base de la MFI.

En l'absence de milieu conditionné, les HMC3 polarisées à l'IFN γ (*M1-like*) phagocytent significativement plus que les HMC3 non polarisées (M0) ou polarisées à l'IL4 (*M2-like*) (**Figure 20.A**).

Les cellules M0 traitées au mNI phagocytent plus que les cellules M0 non traitées, mais cette augmentation n'est pas significative (**Figure 20.B**). En revanche, les cellules M0 traitées avec mWT ou mP2G phagocytent moins que les cellules M0 traitées au mNI (**Figure 20.B**). Cette diminution n'est pas significative non plus.

Les cellules *M1-like* traitées avec le milieu mNI, phagocytent légèrement plus que les cellules *M1-like* non traitées, mais cette augmentation n'est pas significative (**Figure 20.C**). Par contre, les cellules *M1-like* traitées avec mWT ou mP2G phagocytent moins que les cellules *M1-like* non traitées ou traitées avec mNI (**Figure 20.C**). Cette diminution de phagocytose est significative pour mP2G, vis-à-vis de mNI (**Figure 20.C**).

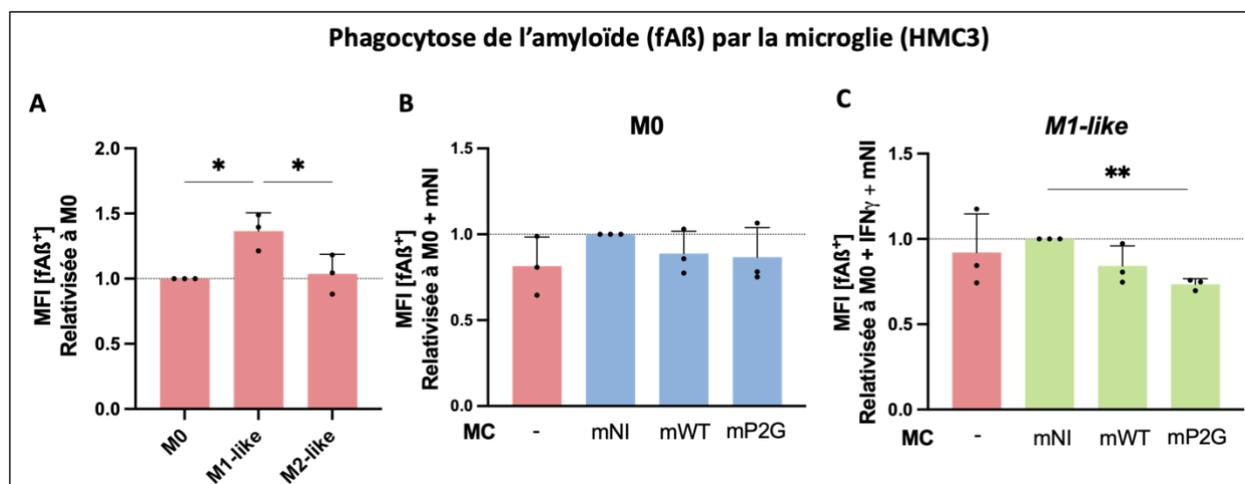


Figure 20. oHSV-P2G diminue la phagocytose de l'amyloïde (fAβ) par la microglie (HMC3). Phagocytose du fAβ par les HMC3. A. HMC3 polarisées à l'IFN γ ou à l'IL4. B. HMC3 non polarisées (M0). C. HMC3 polarisées à l'IFN γ (M1-like). Les HMC3 sont polarisées (IFN γ ou IL4) ou non, et/ou traitées aux milieux conditionnés de cellules de GBM (GB138) non infectées (mNI) ou infectées par oHSV-WT (mWT) ou oHSV-P2G (mP2G) ou non traités pendant 48h. Elles sont incubées pendant 6h avec l'amyloïde fluorescent (fAβ). Les échantillons sont marqués au ZombieNIR (marqueur de mort cellulaire), fixés à la PAF 4%, puis analysés par cytométrie en flux (FACS Fortessa). L'expérience est réalisée en triplicatas biologiques (N=3), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. MFI = Median Fluorescence Intensity ; fAβ⁺ = cellules positives au fAβ Fluor 48 ; MFI [fAβ⁺] = MFI calculée sur l'ensemble des cellules fAβ⁺. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques correspondent au test Anova (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur $\leq 0,05$; ** = p-valeur $\leq 0,01$; *** = p-valeur $\leq 0,001$; **** = p-valeur $\leq 0,0001$). MC = milieu conditionné. Figure réalisée avec GraphPad Prism.

Afin de confirmer l'internalisation du fAβ dans les cellules, la phagocytose du fAβ par les HMC3 a été étudiée par microscopie confocale après immunomarquage d'HSP90 (en rouge), qui présente une localisation cytoplasmique. Les noyaux des cellules ont également été marqués par coloration au Hoechst (en bleu).

Dans les cellules non polarisées, le fAβ fluorescent (fAβ Fluor 488, en vert) est observé dans des vésicules cytoplasmiques (M0, **Figure 21.A**). Cette localisation subcellulaire est aussi observée dans les HMC3 polarisées (IFN γ ou IL4) et/ou traitées aux milieux conditionnés (mNI, mWT, mP2G) (**Annexe 13**). Cette analyse a été réalisée pour plusieurs niveaux d'épaisseur des cellules (positions Z, Z-stack) (**Figure 21.B**, données non représentées pour les autres conditions). Cette localisation dans des vésicules cytoplasmiques constitue une preuve de l'intégration de l'amyloïde.

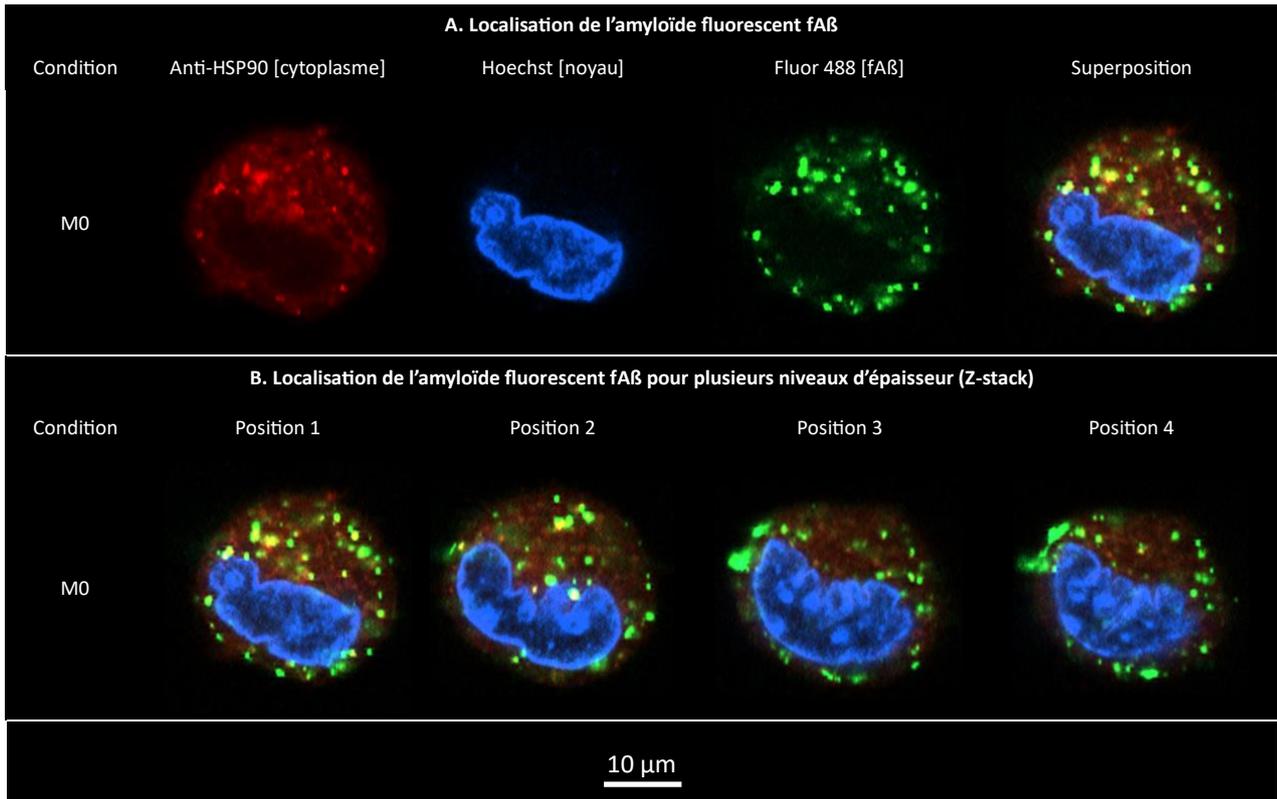


Figure 21. Analyse en immunofluorescence (IF) de la phagocytose de l'amyloïde (fA β) par la microglie (HMC3). A. Localisation de l'amyloïde fluorescent. B. Localisation de l'amyloïde fluorescent pour plusieurs niveaux d'épaisseur de la cellule. Les HMC3 sont mises en culture pendant 48h sans polarisation ni traitement. Leur cytoplasme est marqué avec l'anticorps anti-HSP90 couplé à un anticorps secondaire fluorescent (rouge) et leur noyau avec du Hoechst (bleu). L'amyloïde fA β est fluorescent (Fluor 488, vert). Les cellules marquées sont analysées au microscope confocal (Confocal Zeiss HR LSM 980, Airyscan, 63x). L'amyloïde est bien phagocyté et intégré par les cellules.

4.2.2. Effet du virus oHSV-P2G sur la phagocytose des cellules de glioblastome par la microglie

Afin d'avoir une représentation plus proche de la réalité, la capacité de phagocytose des HMC3 a ensuite été étudiée pour l'intégration de cellules de glioblastome exprimant la RFP (GB138RFP), toujours par cytométrie en flux (FACS). La stratégie d'analyse est présentée dans la section Matériel et Méthodes.

En l'absence de milieu conditionné, aucune différence de phagocytose n'est détectée entre les HMC3 non polarisées (M0), polarisées à l'IFN γ (M1-like) ou polarisées à l'IL4 (M2-like) (**Figure 22.A**).

Les cellules M0 traitées au mNI phagocytent plus que les cellules M0 non traitées, mais cette augmentation n'est pas significative (**Figure 22.B**). En revanche, les cellules M0 traitées avec mWT ou mP2G phagocytent significativement moins que les cellules M0 traitées au mNI (**Figure 22.B**).

Les cellules M1-like traitées avec les milieux mNI, mWT ou mP2G phagocytent plus que les cellules M1-like non traitées (**Figure 22.C**). Cette augmentation est significative dans le cas de mNI. Par contre, les cellules M1-like traitées avec mWT ou mP2G phagocytent moins que les cellules M1-like traitées avec mNI (**Figure 22.C**). Cette diminution n'est cependant pas significative.

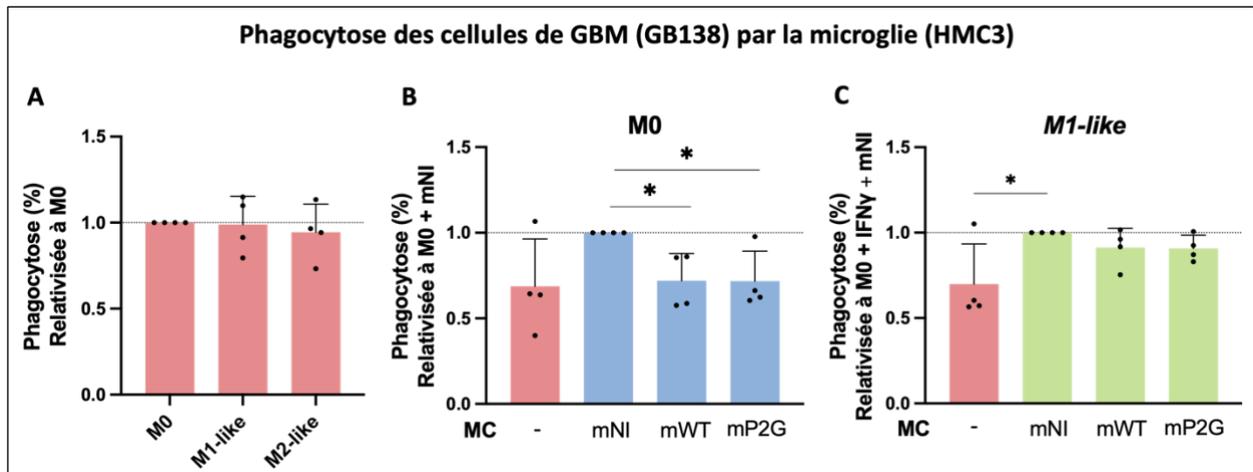


Figure 22. oHSV-P2G diminue la phagocytose des cellules de glioblastome (GB138RFP) par la microglie (HMC3). Phagocytose des GB138RFP par les HMC3. A. HMC3 polarisées à l'IFN γ ou à l'IL4. B. HMC3 non polarisées (M0). C. HMC3 polarisées à l'IFN γ (M1-like). Les HMC3 sont polarisées (IFN γ ou IL4) ou non, et/ou traitées aux milieux conditionnés de cellules de GBM (GB138) non infectées (mNI) ou infectées par oHSV-WT (mWT) ou oHSV-P2G (mP2G) ou non traités pendant 48h. Elles sont incubées pendant 8h avec des cellules de GBM exprimant la RFP (GB138RFP). Les échantillons sont marqués avec du ZombieNIR (marqueur de mort cellulaire) puis avec l'anticorps anti-CD40 fluorescent (marqueur spécifique des HMC3), fixés à la PAF 4%, puis analysés par cytométrie en flux (FACS Fortessa). L'expérience est réalisée en plusieurs réplicats biologiques (N=4), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. Le pourcentage de phagocytose est calculé selon le rapport entre le nombre de HMC3 positives à la RFP et le nombre total de cellules (HMC3 + GB138RFP). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques correspondent au test Anova (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur \leq 0,05 ; ** = p-valeur \leq 0,01 ; *** = p-valeur \leq 0,001 ; **** = p-valeur \leq 0,0001). MC = milieu conditionné. Figure réalisée avec GraphPad Prism.

V. Discussion et perspectives

Cette étude porte sur l'utilisation d'un virus oncolytique (oHSV-1) modifié pour inhiber la voie de signalisation CXCL12/CXCR4. L'objectif est de renverser le contexte immunologiquement « froid » du GBM, caractérisé entre autres par des TAMMs *M2-like*, en un environnement immunologiquement « chaud », enrichi en TAMMs *M1-like*. Dans cette étude, oHSV-1 exprime une version mutée de CXCL12, appelée P2G (oHSV-P2G), qui se lie au récepteur CXCR4 et inhibe la réponse qui y est associée. Précédemment étudié au laboratoire pour ses effets sur la migration des GSCs et sur la réduction de la croissance tumorale, ce travail évalue son impact sur la polarisation et la phagocytose des TAMMs, visant à vérifier l'hypothèse selon laquelle P2G permettrait l'induction d'un phénotype *M1-like* et une augmentation de la phagocytose.

L'impact des virus oHSV-WT et oHSV-P2G sur la polarisation des TAMMs et sur leur capacité à phagocyter a été étudié sur des macrophages humains dérivés de monocytes (MDMs) et sur des cellules de microglie humaine (HMC3). Cet impact a été évalué par deux approches expérimentales. Tout d'abord, la polarisation des MDMs et des HMC3 en un phénotype *M1-like* et *M2-like* a été induite en ajoutant respectivement de l'Interféron gamma (IFN γ) ou de l'Interleukine 4 (IL4), comme décrit dans la littérature^{5,40}. Ensuite, l'effet des virus a été étudié au travers de milieux conditionnés, qui correspondent au milieu de culture de cellules de GBM (GB138) non infectées (milieu non infecté, mNI), ou infectées par oHSV-WT (mWT) ou oHSV-P2G (mP2G). Ils visent à mimer le microenvironnement tumoral (TME) après injection ou non des virus. Après filtration, ces milieux conditionnés ne contiennent plus de particules virales, évitant ainsi l'effet cytolytique du virus, tout en conservant les cytokines et les facteurs libérés en réponse à cette infection, en ce compris P2G. Cependant, cette technique ne prend pas en compte le *crossstalk* qui existe entre la tumeur et le système immunitaire (dans ce cas, les macrophages et la microglie). Une méthode qui pourrait améliorer les milieux conditionnés serait d'employer des dispositifs Transwell[®], qui permettent des échanges bidirectionnels de cytokines, tout en maintenant l'infection uniquement dans les cellules tumorales.

Les macrophages et la microglie sont tous deux décrits en littérature comme acteurs importants de la réponse antitumorale face au GBM. Cependant, une étude récente souligne que la microglie est davantage impliquée dans cette réponse que les macrophages, et en particulier dans la réponse phagocytaire⁶⁷. De plus, la microglie (HMC3) montre des résultats plus tranchés que les macrophages (MDMs), avec des différences significatives entre les conditions expérimentales. Cette partie de discussion s'intéresse donc tout d'abord à l'analyse des résultats de la microglie, et ces résultats sont par la suite comparés aux macrophages.

Le choix des cellules de microglie implique l'utilisation de cellules primaires ou de lignées cellulaires. Les cellules primaires humaines sont difficiles à obtenir en raison de restrictions éthiques, et difficiles à cultiver, ce qui a conduit au développement de lignées cellulaires immortalisées^{35,36,40}. Parmi celles-ci, les HMC3, cellules embryonnaires immortalisées, sont particulièrement étudiées et caractérisées^{35,36}. Contrairement aux cellules primaires, elles offrent une capacité de renouvellement élevée et apportent des résultats plus homogènes et reproductibles, permettant de standardiser les analyses⁴⁰.

L'ajout d'IFN γ induit une surexpression des marqueurs *M1-like* et une sous-expression des marqueurs *M2-like* par les HMC3, confirmant l'effet polarisateur *M1-like* de l'IFN γ décrit en littérature^{5,40}. Outre sa capacité à établir un environnement antitumoral, ce phénotype serait associé à une meilleure capacité de phagocytose en comparaison aux phénotypes *M0-/M2-like*^{6,45,68}. *In vivo*, l'IFN γ permet effectivement une augmentation de l'activité phagocytaire de la microglie, qui élimine ainsi les cellules tumorales³⁸. Cela est en effet confirmé dans les résultats de cytométrie en flux, par l'augmentation significative de la phagocytose de l'amyloïde.

L'IL4, quant à lui, est décrit comme un inducteur de la polarisation *M2-like* des TAMMs^{5,40}. L'analyse transcriptomique des HMC3 traitées à l'IL4 montre en effet une tendance à surexprimer les marqueurs *M2-like*, bien que cette tendance ne soit pas significative. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que les cellules non polarisées (M0) tendent naturellement vers un phénotype *M2-like*⁶. Les analyses en RT-qPCR démontrent en effet que les cellules M0 présentent un profil d'expression similaire à celui des cellules polarisées avec l'IL4. Par conséquent, l'ajout d'IL4 ne saurait accentuer davantage la polarisation *M2-like* de ces cellules. Toutefois, il serait intéressant d'explorer d'autres stratégies pour obtenir un phénotype *M2-like* plus distinct, qui permettrait l'évaluation de l'impact du virus sur des cellules clairement polarisées *M2-like*. Des études suggèrent l'utilisation d'autres cytokines, comme l'Interleukine 13 (IL13) pour induire une polarisation *M2-like*⁶⁹. Par ailleurs, l'analyse en cytométrie en flux montre que le phénotype *M2-like*, décrit comme favorable au développement tumoral, induit une réduction significative de la phagocytose comparé aux cellules *M1-like*, ce qui est en accord avec les données de la littérature^{6,45,68}.

Les cellules HMC3 cultivées en présence de milieu mNI montrent un profil transcriptomique opposé à celui induit par l'IFN γ , montrant une polarisation *M2-like*. Ces observations sont en accord avec la littérature, qui indique que le glioblastome induit une polarisation *M2-like*^{1,18,20}. De plus, il a été montré qu'un milieu conditionné dérivé de cellules de GBM (GL-261) induisait bien un phénotype *M2-like* à la microglie^{6,70}. Cependant, le mNI induit une phagocytose similaire voire supérieure à celle observée pour les cellules M0 ou *M1-like* non traitées, laissant supposer un effet favorable du GBM sur la phagocytose.

Les milieux mWT et mP2G induisent chez les HMC3 une augmentation significative de l'expression des marqueurs *M1-like* par rapport à mNI. Cette surexpression est plus marquée en présence de mP2G et se maintient même lorsque les cellules sont polarisées *M1-like*, montrant que mP2G accentue la polarisation *M1-like* déjà induite par l'IFN γ . Néanmoins, dissocier l'effet de la chimiokine P2G de l'effet des cytokines induites par l'infection n'est pas facile et explique en partie les tendances similaires de mWT et mP2G. En effet, bien que le milieu conditionné s'affranchisse de l'effet lytique des virus, il contient des cytokines libérées par les cellules en réponse à l'infection virale. Ces cytokines influencent très fortement le phénotype *M1-/M2-like* de la microglie^{5,40}. Il est intéressant de noter que l'expression de *SIRP α* , récepteur associé à l'inhibition de la phagocytose et considéré comme marqueur *M2-like*, diminue de manière significative lorsque du milieu mP2G est ajouté aux cellules *M1-like* traitées au mNI. Cela suggère que mP2G pourrait favoriser la phagocytose, en tout cas chez les cellules polarisées à l'IFN γ . Pourtant, les observations montrent que mP2G réduit la phagocytose, tant des cellules M0 que des cellules *M1-like*.

De manière générale, la RT-qPCR montre que mP2G induit une polarisation *M1-like* des HMC3, contrairement au mNI qui induit une polarisation *M2-like*. Ces observations sont en accord avec l'hypothèse de départ qui postulait qu'en bloquant la signalisation CXCL12/CXCR4, P2G pourrait changer la polarisation des TAMMs. Alors que sur base de la littérature, le phénotype *M1-like* est attendu pour favoriser la phagocytose dans le contexte du glioblastome, contrairement au *M2-like*^{6,45,68}, les résultats montrent une augmentation de la phagocytose par les HCM3 cultivées avec mNI et une diminution avec mP2G. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer le rapport inversé entre les résultats de PCR et de FACS. Différents aspects, également à prendre en considération, sont tout d'abord décrits ci-dessous.

Le premier point concerne la liste des gènes analysés en RT-qPCR. Elle a été établie sur base de la littérature et des résultats d'une analyse RNA-Seq réalisée au laboratoire, et il est important de noter que cette analyse a été effectuée sur les MDMs et non sur les HMC3. Certains gènes ont donné des résultats différents de ceux attendus. C'est le cas des marqueurs *MT1G* et *MT2A*, associés à un phénotype *M1-like*, mais qui, dans les conditions expérimentales ont montré une forte surexpression par les HMC3 polarisées à l'IL4. Cette observation peut être expliquée par la littérature, qui montre en effet que ces deux marqueurs sont fortement influencés par les conditions expérimentales et ne sont pas associés précisément à un phénotype^{71,72}. Ceci a amené à classer ces gènes dans les marqueurs *M2-like* dans le cadre de cette étude.

En outre, si l'analyse par RT-qPCR permet d'avoir un aperçu de l'expression des gènes à un moment précis, et de quantifier les ARNm pour une condition donnée, elle ne donne pas d'informations quant au niveau d'expression des protéines. Les ARN peuvent par exemple ne pas être traduits ou avoir une demi-vie qui est affectée. Ainsi, la diminution de l'expression du gène *SIRPα* n'implique pas forcément une diminution du récepteur *SIRPα*. Des analyses protéomiques, via Western Blot ou FACS, seraient nécessaires pour confirmer la présence/l'absence des protéines dont l'expression semble modifiée en RT-qPCR.

Concernant l'analyse FACS, celle-ci indique qu'environ 80% des HMC3 ont internalisé de l'amyloïde, cette proportion restant constante après 2 ou 6 heures d'incubation (**Annexe 12**). De plus, la MFI (intensité médiane de fluorescence), qui reflète la quantité d'amyloïde phagocyté, est augmentée entre 2 et 6 heures d'incubation (**Annexe 14**). Ces données suggèrent une accumulation intracellulaire d'amyloïde au cours du temps. Par ailleurs, la microscopie confocale a permis de vérifier que la fluorescence quantifiée en cytométrie en flux correspondait bien à de l'amyloïde phagocyté (détectable dans des vésicules intracytoplasmiques), et non à une accumulation de complexes fluorescents à la surface des cellules (**Annexe 13**). Afin de mettre en évidence une éventuelle dégradation de l'amyloïde phagocyté, un immunomarquage des lysosomes dans les cellules ayant phagocyté l'amyloïde a été réalisé. Ces résultats trop préliminaires ne sont pas présentés dans ce travail, mais les premières observations indiquent que l'amyloïde n'était pas encore contenu dans les lysosomes après 6 heures d'incubation, suggérant qu'il n'est pas encore dégradé. Dans les conditions expérimentales, la quantification de la phagocytose ne semble donc pas biaisée par la dégradation de l'amyloïde par les enzymes lysosomiaux.

Un dernier point concerne le choix de la lignée HMC3. Les cellules HMC3 sont assez représentatives des cellules de microglie primaires en termes de marqueurs exprimés et de fonctions³⁵. Une fois immortalisées, elles conservent d'ailleurs la majorité des caractéristiques de cellules de microglie primaires³⁶. Cependant, elles montrent une activité phagocytaire plus faible³⁶. Ceci a donc pu impacter les résultats de phagocytose obtenus.

Concernant les résultats, les milieux mP2G et mWT ont montré tous les deux une diminution inattendue de la phagocytose par rapport au milieu mNI. Ceci est en contradiction avec la diminution des transcrits *SIRPα* en réponse à ses mêmes milieux. La littérature montre en effet qu'un milieu conditionné réalisé à base de GSCs pouvait entraîner une polarisation *M2-like* des TAMMs, accompagnée d'une inhibition de leur capacité de phagocytose³⁸. Il a cependant été démontré que cibler la voie *SIRPα/CD47* permettait d'augmenter la phagocytose des TAMMs *M1-like*, mais également, dans une moindre mesure, celle des *M2-like*⁷³. Il serait donc intéressant d'investiguer davantage l'effet de la chimiokine P2G sur la

phagocytose, afin de vérifier si cette inhibition est dépendante de CD47/SIRP α et si P2G pourrait avoir un effet indirect sur la phagocytose, via sa capacité à interférer avec la voie de signalisation CXCL12/CXCR4.

De plus, l'ensemble de ce travail repose sur l'hypothèse que P2G est capable d'induire une polarisation *M1-like* des TAMMs et dès lors stimuler l'activité phagocytaire^{6,45,68}. En effet, dans le contexte des gliomes, ce sont les TAMMs de phénotype *M1-like* qui jouent un rôle clé dans l'élimination des cellules tumorales, notamment par leur fonction de phagocytose^{6,42,74}. Il a par contre été montré que les fonctions immunitaires assurées par les *M1-like* pouvaient être compromises dans un contexte tumoral³⁸. Dans un contexte physiologique, ce sont les TAMMs *M2-like* qui sont responsables de la phagocytose, en particulier des débris cellulaires et des protéines mal repliées⁷⁵. Ainsi, les deux phénotypes peuvent être associés à de la phagocytose. Cela rejoint le spectre phénotypique non binaire des TAMMs, impliquant l'expression simultanée de marqueurs caractéristiques des deux phénotypes extrêmes^{5,13,19,28}. Cette plasticité s'étend également aux fonctions associées aux deux phénotypes, y compris la phagocytose. Ces explications peuvent justifier la phagocytose réalisée par les cellules associées à un phénotype *M2-like*.

La phagocytose des HMC3 a également été étudiée avec des cellules de GBM exprimant la RFP (GB138RFP). Contrairement aux observations faites pour l'amyloïde, le phénotype *M1-like* des HMC3 n'influence pas la phagocytose des GB138RFP. En revanche, le mNI augmente cette phagocytose, et les milieux mWT et mP2G la diminuent, tout comme pour l'amyloïde. Certains points sont à considérer pour l'analyse de ces résultats.

L'amyloïde et les cellules de GBM sont deux entités différentes, qui sont perçues différemment par la microglie, ce qui peut aboutir à des résultats divergents. L'amyloïde est un agrégat de protéines (le β -amyloïde), couramment utilisé en recherche, qui présente l'avantage d'être un paramètre constant et reproductible, permettant de standardiser les analyses. L'amyloïde reste cependant moins représentatif de la réalité biologique. La phagocytose des GB138RFP est donc intéressante à étudier pour son parallèle avec les processus *in vivo*. Par contre, elle pose certains défis techniques concernant la mise en place de la co-culture et l'analyse en cytométrie en flux. De plus, compte tenu de la littérature, les récepteurs impliqués dans l'internalisation de l'amyloïde et des cellules de GBM seraient différents^{27,76,77,78}. Cela complique donc la comparaison des résultats obtenus dans chacun des cas. De plus, les HMC3 phagocytent moins efficacement les cellules de GBM que l'amyloïde, visible par le plus faible pourcentage de cellules positives à l'amyloïde (**Annexes 12 et 15**). Cela peut donc amener à des différences de résultats et d'interprétation. Une approche à explorer serait d'utiliser une molécule fluorescente qui emprunte les mêmes récepteurs que ceux utilisés pour l'internalisation des cellules de GBM. Ceci permettrait d'obtenir

des résultats plus représentatifs de la réalité, tout en maintenant la précision et la standardisation des analyses.

Avec la microglie, les macrophages constituent les deux types cellulaires majoritaires parmi les cellules immunitaires de la tumeur¹³. Ils se rejoignent sur leur spectre phénotypique et sur leur capacité de phagocytose. Néanmoins, les résultats obtenus quant au rôle de P2G sur la polarisation et la capacité de phagocytose des MDMs sont moins marqués que ceux obtenus avec la microglie. Ils soulignent certaines différences comme le fait que mP2G n'influence pas la polarisation des MDMs. A nouveau, différents points sont à considérer.

Les macrophages peuvent provenir de lignées cellulaires de monocytes ou de monocytes primaires différenciés en macrophages⁷⁹. Plusieurs lignées cellulaires existent et offrent une grande homogénéité cellulaire, assurant des réponses biologiques cohérentes^{69,79}. Par contre, ces réponses biologiques ne reflètent pas tout à fait les situations *in vivo*⁷⁹. A l'inverse, les monocytes primaires différenciés en macrophages (MDMs), utilisés dans cette étude, offrent une meilleure représentativité biologique^{69,79}. Par contre, ils montrent une certaine variabilité phénotypique inter- et intra-donneurs, aboutissant à des réponses biologiques différentes^{69,79}. Chaque réplicat de cette étude étant effectué avec des *buffy coats* de donneurs différents, cela engendre une hétérogénéité dans les résultats, entraînant une perte d'informations. Cette hétérogénéité est également accentuée par le fait que les macrophages présentent différents états *M2-like* (M2a, M2b et M2c), chacun associés à des rôles différents, dont la phagocytose⁷³. De plus, ces états sont activés par des cytokines différentes⁷³. Il pourrait donc être intéressant d'investiguer plus en détails ce point au laboratoire.

De plus, le M-CSF utilisé pour différencier les monocytes est maintenu dans le milieu de culture pendant toute la durée des traitements. Or, le M-CSF est connu pour augmenter la phagocytose des macrophages et pour favoriser une polarisation *M2-like*⁷³. Il serait donc intéressant d'optimiser les conditions expérimentales, afin de mieux analyser la polarisation et la phagocytose des MDMs.

Enfin, il serait intéressant d'investiguer les récepteurs des HMC3 et des MDMs impliqués dans l'internalisation de l'amyloïde, pour voir s'ils ne seraient pas différents, ce qui pourrait expliquer aussi en partie les divergences observées entre ces deux types cellulaires.

Toutefois, il est aussi important de noter que l'action des TAMMs (macrophages et microglie) *M1-like* sur les cellules tumorales ne se limite pas à la phagocytose. Ces cellules jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire antitumorale par d'autres moyens, comme par interaction avec d'autres cellules de l'immunité, par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou encore par la sécrétion de diverses molécules et substances nocives^{80,67,81}. Cela souligne l'importance des fonctions immunologiques autres que la phagocytose, assurées par les TAMMs *M1-like* dans la lutte contre le GBM.

En termes de perspectives générales, il serait intéressant de réaliser le même type d'analyse, avec d'autres traitements plus « standards ». Par exemple, l'AMD3100, antagoniste de CXCR4, pourrait être comparé au milieu mP2G et l'utilisation de CXCL12 pourrait faire le parallèle avec le milieu mNI. Ces expérimentations permettraient de vérifier si les effets observés avec mP2G sont spécifiquement liés au virus oHSV-P2G ou s'ils sont plutôt dus à d'autres facteurs.

En outre, les virus oncolytiques armés, bien qu'efficaces dans leur action antitumorale, peuvent parfois entraîner des effets indésirables. Dans de tels cas, une stratégie consiste à armer le virus d'un transgène supplémentaire conçu pour neutraliser ces effets négatifs. Une autre possibilité consiste à administrer un autre type de traitement en parallèle, visant à atténuer les effets indésirables. Dans le cadre d'oHSV-P2G, si l'impact négatif du mP2G sur la phagocytose se confirme, il serait alors pertinent d'envisager de renforcer la capacité de phagocytose, sur base d'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent ce processus.

VI. Conclusion

Le GBM est une tumeur cérébrale particulièrement agressive, notamment en raison de son caractère immunologiquement « froid », caractérisé par une prédominance de macrophages et de microglie associés à la tumeur (TAMMs) de phénotype *M2-like* pro-tumoral. La voie de signalisation CXCL12/CXCR4 est une voie centrale dans cette polarisation du microenvironnement tumoral. Cette étude porte sur la virothérapie oncolytique, dans le but d'inhiber la voie CXCL12/CXCR4 et d'aboutir *in fine* à un microenvironnement immunologiquement « chaud », caractérisé par la présence majoritaire de TAMMs de phénotype *M1-like* pro-inflammatoire. Le virus utilisé dans cette étude, oHSV-P2G, armé de la chimiokine CXCL12 mutée (P2G), permet d'inhiber la voie CXCL12/CXCR4. Il a déjà prouvé sa capacité à limiter la migration des cellules souches cancéreuses (GSCs), à augmenter la survie des souris cancéreuses et à diminuer la taille de leur tumeur. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'impact du virus oHSV-P2G sur la polarisation des TAMMs, avec pour but d'influencer leur phénotype *M2-like* en *M1-like*, et sur leur fonction de phagocytose, avec pour but d'augmenter leur capacité à phagocyter.

En pratique, P2G est étudié en utilisant du milieu conditionné (mP2G) pour visualiser son impact sur la polarisation des TAMMs et sur leur capacité de phagocytose. L'Interféron gamma (IFN γ) a confirmé son effet inducteur d'un phénotype *M1-like*, tandis que l'Interleukine 4 (IL4) a favorisé un phénotype *M2-like*, bien que cet effet soit moins prononcé, probablement en raison du caractère *M2-like* des cellules M0. Par ailleurs, le milieu extracellulaire de la tumeur a conduit à une polarisation *M2-like* des TAMMs. Cet effet est contré par le milieu mP2G, qui arrive à induire un phénotype *M1-like* à la microglie (HMC3). Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle le virus oHSV-P2G pourrait favoriser la transition des TAMMs d'un phénotype *M2-like* en un phénotype *M1-like*. Cependant, malgré sa capacité à induire une polarisation *M1-like*, le milieu mP2G a entraîné une diminution de la phagocytose de l'amyloïde et des cellules de GBM par la microglie (HMC3). En parallèle, l'analyse réalisée sur les macrophages (MDMs) a montré que, contrairement aux observations faites pour la microglie, le milieu mP2G n'influence pas la polarisation des macrophages. Cela nécessiterait plus d'investigations afin d'en trouver la raison, même si plusieurs hypothèses ressortent. Le milieu mP2G a, par contre, également un effet négatif sur la phagocytose de l'amyloïde par les macrophages (MDMs).

Plusieurs perspectives sont envisagées pour la suite de cette étude. D'un point de vue méthodologique, il serait intéressant d'utiliser des Transwell® à la place des milieux conditionnés, permettant les échanges bidirectionnels entre le virus et les cellules de GBM et les TAMMs, et de tester d'autres cytokines afin

d'induire un phénotype *M2-like* plus prononcé. En ce qui concerne les expériences, des analyses protéomiques, par Western Blot ou par FACS, pourraient compléter les données transcriptomiques obtenues par RT-qPCR. Pour approfondir l'étude de la phagocytose, il serait intéressant d'explorer les différentes voies de phagocytose, de comparer les résultats obtenus avec les milieux conditionnés à ceux obtenus avec des molécules plus standards comme le CXCL12 et l'AMD, et de l'étudier avec une molécule fluorescente autre que l'amyloïde, utilisant les mêmes récepteurs que pour l'internalisation des cellules de GBM.

Le virus oHSV-P2G a précédemment démontré sa capacité à inhiber la migration des GSCs et à améliorer le pronostic vital de souris *in vivo*. Malgré les résultats mitigés concernant la phagocytose et les macrophages, sa capacité à influencer la polarisation de la microglie vers un phénotype *M1-like* est encourageante et justifie de poursuivre les recherches sur ce virus dans le cadre de traitements contre le GBM.

VII. Bibliographie

- (1) Saha, D.; Martuza, R. L.; Rabkin, S. D. Macrophage Polarization Contributes to Glioblastoma Eradication by Combination Immunovirotherapy and Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Cell* **2017**, *32* (2), 253-267.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.006>.
- (2) Louis, D. N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D. J.; Cree, I. A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H. K.; Pfister, S. M.; Reifenberger, G.; Soffietti, R.; Von Deimling, A.; Ellison, D. W. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Neuro-Oncol.* **2021**, *23* (8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>.
- (3) Rong, L.; Li, N.; Zhang, Z. Emerging Therapies for Glioblastoma: Current State and Future Directions. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**, *41* (1), 142. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02349-7>.
- (4) Teraiya, M.; Perreault, H.; Chen, V. C. An Overview of Glioblastoma Multiforme and Temozolomide Resistance: Can LC-MS-Based Proteomics Reveal the Fundamental Mechanism of Temozolomide Resistance? *Front. Oncol.* **2023**, *13*, 1166207. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1166207>.
- (5) Khan, F.; Pang, L.; Dunterman, M.; Lesniak, M. S.; Heimberger, A. B.; Chen, P. Macrophages and Microglia in Glioblastoma: Heterogeneity, Plasticity, and Therapy. *J. Clin. Invest.* **2023**, *133* (1), e163446. <https://doi.org/10.1172/JCI163446>.
- (6) Lin, C.; Wang, N.; Xu, C. Glioma-Associated Microglia/Macrophages (GAMs) in Glioblastoma: Immune Function in the Tumor Microenvironment and Implications for Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1123853. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1123853>.
- (7) Goffart, N.; Lombard, A.; Lallemand, F.; Kroonen, J.; Nassen, J.; Di Valentin, E.; Berendsen, S.; Dedobbeleer, M.; Willems, E.; Robe, P.; Bours, V.; Martin, D.; Martinive, P.; Maquet, P.; Rogister, B. CXCL12 Mediates Glioblastoma Resistance to Radiotherapy in the Subventricular Zone. *Neuro-Oncol.* **2017**, *19* (1), 66–77. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now136>.
- (8) Buonfiglioli, A.; Hambardzumyan, D. Macrophages and Microglia: The Cerberus of Glioblastoma. *Acta Neuropathol. Commun.* **2021**, *9* (1), 54. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01156-z>.
- (9) Wirsching, H.-G.; Weller, M. Glioblastoma. In *Malignant Brain Tumors*; Moliterno Gunel, J., Piepmeyer, J. M., Baehring, J. M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 265–288. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49864-5_18.
- (10) Arevalo, O. J.; Valenzuela, R.; Esquenazi, Y.; Rao, M.; Tran, B.; Zhu, J.; Bhattacharjee, M.; Doyle, N.; Riascos, R. F. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Practical Approach for Gliomas, Part 2. Isocitrate Dehydrogenase Status—Imaging Correlation. *Neurographics* **2017**, *7* (5), 344–349. <https://doi.org/10.3174/ng.9170231>.
- (11) Ah-Pine, F.; Khettab, M.; Bedoui, Y.; Slama, Y.; Daniel, M.; Doray, B.; Gasque, P. On the Origin and Development of Glioblastoma: Multifaceted Role of Perivascular Mesenchymal Stromal Cells. *Acta Neuropathol. Commun.* **2023**, *11* (1), 104. <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01605-x>.
- (12) Goffart, N.; Kroonen, J.; Rogister, B. Glioblastoma-Initiating Cells: Relationship with Neural Stem Cells and the Micro-Environment. *Cancers* **2013**, *5* (3), 1049–1071. <https://doi.org/10.3390/cancers5031049>.
- (13) Andersen, R. S.; Anand, A.; Harwood, D. S. L.; Kristensen, B. W. Tumor-Associated Microglia and Macrophages in the Glioblastoma Microenvironment and Their Implications for Therapy. *Cancers* **2021**, *13* (17), 4255. <https://doi.org/10.3390/cancers13174255>.
- (14) *Stem Cell Microenvironments and Beyond*; Birbrair, A., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer International Publishing: Cham, 2017; Vol. 1041. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-69194-7>.

- (15) Verreault, M.; Delattre, J.-Y.; Idbah, A. Les tumeurs gliales diffuses de l'adulte: Hétérogénéité génétique et implications thérapeutiques. *médecine/sciences* **2012**, *28* (10), 813–816. <https://doi.org/10.1051/medsci/20122810005>.
- (16) Shoaf, M. L.; Desjardins, A. Oncolytic Viral Therapy for Malignant Glioma and Their Application in Clinical Practice. *Neurotherapeutics* **2022**, *19* (6), 1818–1831. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01256-1>.
- (17) Cheema, T. A.; Wakimoto, H.; Fecci, P. E.; Ning, J.; Kuroda, T.; Jeyaretna, D. S.; Martuza, R. L.; Rabkin, S. D. Multifaceted Oncolytic Virus Therapy for Glioblastoma in an Immunocompetent Cancer Stem Cell Model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110* (29), 12006–12011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307935110>.
- (18) Otani, Y.; Yoo, J. Y.; Shimizu, T.; Kurozumi, K.; Date, I.; Kaur, B. Implications of Immune Cells in Oncolytic Herpes Simplex Virotherapy for Glioma. *Brain Tumor Pathol.* **2022**, *39* (2), 57–64. <https://doi.org/10.1007/s10014-022-00431-8>.
- (19) Sharma, P.; Aaroe, A.; Liang, J.; Puduvali, V. K. Tumor Microenvironment in Glioblastoma: Current and Emerging Concepts. *Neuro-Oncol. Adv.* **2023**, *5* (1), vdad009. <https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdad009>.
- (20) Wang, G.; Zhong, K.; Wang, Z.; Zhang, Z.; Tang, X.; Tong, A.; Zhou, L. Tumor-Associated Microglia and Macrophages in Glioblastoma: From Basic Insights to Therapeutic Opportunities. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 964898. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.964898>.
- (21) Mortezaee, K. CXCL12/CXCR4 Axis in the Microenvironment of Solid Tumors: A Critical Mediator of Metastasis. *Life Sci.* **2020**, *249*, 117534. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117534>.
- (22) Hira, V. V. V.; Van Noorden, C. J. F.; Molenaar, R. J. CXCR4 Antagonists as Stem Cell Mobilizers and Therapy Sensitizers for Acute Myeloid Leukemia and Glioblastoma? *Biology* **2020**, *9* (2), 31. <https://doi.org/10.3390/biology9020031>.
- (23) Sun, L.; Su, Y.; Jiao, A.; Wang, X.; Zhang, B. T Cells in Health and Disease. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8* (1), 235. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01471-y>.
- (24) Wang, H.; Zhou, H.; Xu, J.; Lu, Y.; Ji, X.; Yao, Y.; Chao, H.; Zhang, J.; Zhang, X.; Yao, S.; Wu, Y.; Wan, J. Different T-Cell Subsets in Glioblastoma Multiforme and Targeted Immunotherapy. *Cancer Lett.* **2021**, *496*, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.09.028>.
- (25) Li, Y.; Yu, Q.; Zhang, Z.; Wang, J.; Li, S.; Zhang, J.; Liu, G. TH9 Cell Differentiation, Transcriptional Control and Function in Inflammation, Autoimmune Diseases and Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7* (43), 71001–71012. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11681>.
- (26) Fu, R.; Shen, Q.; Xu, P.; Luo, J. J.; Tang, Y. Phagocytosis of Microglia in the Central Nervous System Diseases. *Mol. Neurobiol.* **2014**, *49* (3), 1422–1434. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8620-6>.
- (27) Sierra, A.; Abiega, O.; Shahrzad, A.; Neumann, H. Janus-Faced Microglia: Beneficial and Detrimental Consequences of Microglial Phagocytosis. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00006>.
- (28) Van Den Bossche, W. B. L.; Kleijn, A.; Teunissen, C. E.; Voerman, J. S. A.; Teodosio, C.; Noske, D. P.; Van Dongen, J. J. M.; Dirven, C. M. F.; Lamfers, M. L. M. Oncolytic Virotherapy in Glioblastoma Patients Induces a Tumor Macrophage Phenotypic Shift Leading to an Altered Glioblastoma Microenvironment. *Neuro-Oncol.* **2018**, *20* (11), 1494–1504. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy082>.
- (29) Colwell, N.; Larion, M.; Giles, A. J.; Seldomridge, A. N.; Sizardkhani, S.; Gilbert, M. R.; Park, D. M. Hypoxia in the Glioblastoma Microenvironment: Shaping the Phenotype of Cancer Stem-like Cells. *Neuro-Oncol.* **2017**, *19* (7), 887–896. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now258>.
- (30) Das, S.; Marsden, P. A. Angiogenesis in Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369* (16), 1561–1563. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1309402>.
- (31) Ahir, B. K.; Engelhard, H. H.; Lakka, S. S. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Mol. Neurobiol.* **2020**, *57* (5), 2461–2478. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01892-8>.
- (32) Abou Khouzam, R.; Brodaczewski, K.; Filipiak, A.; Zeinelabdin, N. A.; Buart, S.; Szczylik, C.; Kieda, C.; Chouaib, S. Tumor Hypoxia Regulates Immune Escape/Invasion: Influence on Angiogenesis and Potential Impact of Hypoxic Biomarkers on Cancer Therapies. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 613114.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.613114>.

(33) Angara, K.; Borin, T. F.; Arbab, A. S. Vascular Mimicry: A Novel Neovascularization Mechanism Driving Anti-Angiogenic Therapy (AAT) Resistance in Glioblastoma. *Transl. Oncol.* **2017**, *10* (4), 650–660. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2017.04.007>.

(34) Yeo, E. C. F.; Brown, M. P.; Gargett, T.; Ebert, L. M. The Role of Cytokines and Chemokines in Shaping the Immune Microenvironment of Glioblastoma: Implications for Immunotherapy. *Cells* **2021**, *10* (3), 607. <https://doi.org/10.3390/cells10030607>.

(35) Chang, J. C.-Y.; Wang, C.-Y.; Lin, S. Interrogation of Human Microglial Phagocytosis by CRISPR Genome Editing. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1169725. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1169725>.

(36) Dello Russo, C.; Cappoli, N.; Coletta, I.; Mezzogori, D.; Paciello, F.; Pozzoli, G.; Navarra, P.; Battaglia, A. The Human Microglial HMC3 Cell Line: Where Do We Stand? A Systematic Literature Review. *J. Neuroinflammation* **2018**, *15* (1), 259. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1288-0>.

(37) Li, C.; Wang, Y.; Xing, Y.; Han, J.; Zhang, Y.; Zhang, A.; Hu, J.; Hua, Y.; Bai, Y. Regulation of Microglia Phagocytosis and Potential Involvement of Exercise. *Front. Cell. Neurosci.* **2022**, *16*, 953534. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.953534>.

(38) Wu, S.-Y. The Roles of Microglia Macrophages in Tumor Progression of Brain Cancer and Metastatic Disease. *Front. Biosci.* **2017**, *22* (10), 1805–1829. <https://doi.org/10.2741/4573>.

(39) Zheng, Y.; Graeber, M. B. Microglia and Brain Macrophages as Drivers of Glioma Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (24), 15612. <https://doi.org/10.3390/ijms232415612>.

(40) Ahuja, S.; Lazar, I. M. Systems-Level Proteomics Evaluation of Microglia Response to Tumor-Supportive Anti-Inflammatory Cytokines. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 646043. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.646043>.

(41) Saqib, U.; Sarkar, S.; Suk, K.; Mohammad, O.; Baig, M. S.; Savai, R. Phytochemicals as Modulators of M1-M2 Macrophages in Inflammation. *Oncotarget* **2018**, *9* (25), 17937–17950. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24788>.

(42) Geribaldi-Doldán, N.; Fernández-Ponce, C.; Quiroz, R. N.; Sánchez-Gomar, I.; Escorcía, L. G.; Velásquez, E. P.; Quiroz, E. N. The Role of Microglia in Glioblastoma. *Front. Oncol.* **2021**, *10*, 603495. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.603495>.

(43) Ren, J.; Xu, B.; Ren, J.; Liu, Z.; Cai, L.; Zhang, X.; Wang, W.; Li, S.; Jin, L.; Ding, L. The Importance of M1-and M2-Polarized Macrophages in Glioma and as Potential Treatment Targets. *Brain Sci.* **2023**, *13* (9), 1269. <https://doi.org/10.3390/brainsci13091269>.

(44) Grégoire, H.; Roncali, L.; Rousseau, A.; Chérel, M.; Delneste, Y.; Jeannin, P.; Hindré, F.; Garcion, E. Targeting Tumor Associated Macrophages to Overcome Conventional Treatment Resistance in Glioblastoma. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 368. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00368>.

(45) Chen, S.; Lai, S. W. T.; Brown, C. E.; Feng, M. Harnessing and Enhancing Macrophage Phagocytosis for Cancer Therapy. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 635173. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.635173>.

(46) Von Roemeling, C. A.; Wang, Y.; Qie, Y.; Yuan, H.; Zhao, H.; Liu, X.; Yang, Z.; Yang, M.; Deng, W.; Bruno, K. A.; Chan, C. K.; Lee, A. S.; Rosenfeld, S. S.; Yun, K.; Johnson, A. J.; Mitchell, D. A.; Jiang, W.; Kim, B. Y. S. Therapeutic Modulation of Phagocytosis in Glioblastoma Can Activate Both Innate and Adaptive Antitumour Immunity. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1508. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15129-8>.

(47) Janda, E.; Boi, L.; Carta, A. R. Microglial Phagocytosis and Its Regulation: A Therapeutic Target in Parkinson's Disease? *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 144. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00144>.

(48) Podleśny-Drabiniok, A.; Marcora, E.; Goate, A. M. Microglial Phagocytosis: A Disease-Associated Process Emerging from Alzheimer's Disease Genetics. *Trends Neurosci.* **2020**, *43* (12), 965–979. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.10.002>.

(49) Morrissey, M. A.; Kern, N.; Vale, R. D. CD47 Ligation Repositions the Inhibitory Receptor SIRPA to Suppress Integrin Activation and Phagocytosis. *Immunity* **2020**, *53* (2), 290-302.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.008>.

(50) Hu, J.; Xiao, Q.; Dong, M.; Guo, D.; Wu, X.; Wang, B. Glioblastoma Immunotherapy Targeting the Innate Immune Checkpoint CD47-SIRPα Axis. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 593219. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.593219>.

- (51) Veillette, A.; Chen, J. SIRP α –CD47 Immune Checkpoint Blockade in Anticancer Therapy. *Trends Immunol.* **2018**, *39* (3), 173–184. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.12.005>.
- (52) Bruchard, M.; Ghiringhelli, F. Microenvironnement tumoral: Cellules régulatrices et cytokines immunosuppressives. *médecine/sciences* **2014**, *30* (4), 429–435. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143004018>.
- (53) Yang, Y.; Li, J.; Lei, W.; Wang, H.; Ni, Y.; Liu, Y.; Yan, H.; Tian, Y.; Wang, Z.; Yang, Z.; Yang, S.; Yang, Y.; Wang, Q. CXCL12–CXCR4/CXCR7 Axis in Cancer: From Mechanisms to Clinical Applications. *Int. J. Biol. Sci.* **2023**, *19* (11), 3341–3359. <https://doi.org/10.7150/ijbs.82317>.
- (54) Rempel, S. A.; Dudas, S.; Ge, S.; Gutierrez, J. A. Identification and Localization of the Cytokine SDF1 and Its Receptor, CXC Chemokine Receptor 4, to Regions of Necrosis and Angiogenesis in Human Glioblastoma.
- (55) Ping, Y.; Yao, X.; Jiang, J.; Zhao, L.; Yu, S.; Jiang, T.; Lin, M. C.; Chen, J.; Wang, B.; Zhang, R.; Cui, Y.; Qian, C.; Wang, J. M.; Bian, X. The Chemokine CXCL12 and Its Receptor CXCR4 Promote Glioma Stem Cell-mediated VEGF Production and Tumour Angiogenesis via PI3K/AKT Signalling. *J. Pathol.* **2011**, *224* (3), 344–354. <https://doi.org/10.1002/path.2908>.
- (56) Crump, M. P. Solution Structure and Basis for Functional Activity of Stromal Cell-Derived Factor-1; Dissociation of CXCR4 Activation from Binding and Inhibition of HIV-1. *EMBO J.* **1997**, *16* (23), 6996–7007. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.23.6996>.
- (57) Angom, R. S.; Nakka, N. M. R.; Bhattacharya, S. Advances in Glioblastoma Therapy: An Update on Current Approaches. *Brain Sci.* **2023**, *13* (11), 1536. <https://doi.org/10.3390/brainsci13111536>.
- (58) Lin, D.; Shen, Y.; Liang, T. Oncolytic Virotherapy: Basic Principles, Recent Advances and Future Directions. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2023**, *8* (1), 156. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01407-6>.
- (59) Aldrak, N.; Alsaab, S.; Algethami, A.; Bhere, D.; Wakimoto, H.; Shah, K.; Alomary, M. N.; Zaidan, N. Oncolytic Herpes Simplex Virus-Based Therapies for Cancer. *Cells* **2021**, *10* (6), 1541. <https://doi.org/10.3390/cells10061541>.
- (60) Kardani, K.; Sanchez Gil, J.; Rabkin, S. D. Oncolytic Herpes Simplex Viruses for the Treatment of Glioma and Targeting Glioblastoma Stem-like Cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2023**, *13*, 1206111. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1206111>.
- (61) Grigg, C.; Blake, Z.; Gartrell, R.; Sacher, A.; Taback, B.; Saenger, Y. Talimogene Laherparepvec (T-Vec) for the Treatment of Melanoma and Other Cancers. *Semin. Oncol.* **2016**, *43* (6), 638–646. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.10.005>.
- (62) Maruyama, Y.; Sakurai, A.; Noda, S.; Fujiwara, Y.; Okura, N.; Takagi, T.; Asano, J.; Honda, F. Regulatory Issues: PMDA – Review of Sakigake Designation Products: Oncolytic Virus Therapy with Delytact Injection (Tesperaturev) for Malignant Glioma. *The Oncologist* **2023**, *28* (8), 664–670. <https://doi.org/10.1093/oncolo/oyad041>.
- (63) Enow, J. A.; Sheikh, H. I.; Rahman, M. M. Tumor Tropism of DNA Viruses for Oncolytic Virotherapy. *Viruses* **2023**, *15* (11), 2262. <https://doi.org/10.3390/v15112262>.
- (64) Li, L.; Liu, S.; Han, D.; Tang, B.; Ma, J. Delivery and Biosafety of Oncolytic Virotherapy. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 475. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00475>.
- (65) Verzosa, A. L.; McGeever, L. A.; Bhark, S.-J.; Delgado, T.; Salazar, N.; Sanchez, E. L. Herpes Simplex Virus 1 Infection of Neuronal and Non-Neuronal Cells Elicits Specific Innate Immune Responses and Immune Evasion Mechanisms. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 644664. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.644664>.
- (66) Kaufman, H. L.; Shalhout, S. Z.; Iodice, G. Talimogene Laherparepvec: Moving From First-In-Class to Best-In-Class. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *9*, 834841. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.834841>.
- (67) Chen, D.; Varanasi, S. K.; Hara, T.; Traina, K.; Sun, M.; McDonald, B.; Farsakoglu, Y.; Clanton, J.; Xu, S.; Garcia-Rivera, L.; Mann, T. H.; Du, V.; Chung, H. K.; Xu, Z.; Tripple, V.; Casillas, E.; Ma, S.; O'Connor, C.; Yang, Q.; Zheng, Y.; Hunter, T.; Lemke, G.; Kaech, S. M. CTLA-4 Blockade Induces a Microglia-Th1 Cell Partnership That Stimulates Microglia Phagocytosis and Anti-Tumor Function in Glioblastoma. *Immunity* **2023**, *56* (9), 2086–2104.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.07.015>.
- (68) Tarique, A. A.; Logan, J.; Thomas, E.; Holt, P. G.; Sly, P. D.; Fantino, E. Phenotypic, Functional, and Plasticity Features of Classical and Alternatively Activated Human Macrophages. *Am. J. Respir. Cell*

- Mol. Biol.* **2015**, *53* (5), 676–688. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-00120C>.
- (69) Nascimento, C. R.; Rodrigues Fernandes, N. A.; Gonzalez Maldonado, L. A.; Rossa Junior, C. Comparison of Monocytic Cell Lines U937 and THP-1 as Macrophage Models for in Vitro Studies. *Biochem. Biophys. Rep.* **2022**, *32*, 101383. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101383>.
- (70) Zhang, L.; Alizadeh, D.; Van Handel, M.; Kortylewski, M.; Yu, H.; Badie, B. Stat3 Inhibition Activates Tumor Macrophages and Abrogates Glioma Growth in Mice. *Glia* **2009**, *57* (13), 1458–1467. <https://doi.org/10.1002/glia.20863>.
- (71) Subramanian Vignesh, K.; Deepe Jr., G. Metallothioneins: Emerging Modulators in Immunity and Infection. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (10), 2197. <https://doi.org/10.3390/ijms18102197>.
- (72) Si, M.; Lang, J. The Roles of Metallothioneins in Carcinogenesis. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **2018**, *11* (1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0645-x>.
- (73) Kuntzel, T.; Bagnard, D. Manipulating Macrophage/Microglia Polarization to Treat Glioblastoma or Multiple Sclerosis. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (2), 344. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020344>.
- (74) Richard, S. A. The Pivotal Immunoregulatory Functions of Microglia and Macrophages in Glioma Pathogenesis and Therapy. *J. Oncol.* **2022**, *2022*, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2022/8903482>.
- (75) Guo, S.; Wang, H.; Yin, Y. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Front. Aging Neurosci.* **2022**, *14*, 815347. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.815347>.
- (76) Yu, Y.; Ye, R. D. Microglial A β Receptors in Alzheimer’s Disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2015**, *35* (1), 71–83. <https://doi.org/10.1007/s10571-014-0101-6>.
- (77) Richard, K. L.; Filali, M.; Préfontaine, P.; Rivest, S. Toll-Like Receptor 2 Acts as a Natural Innate Immune Receptor to Clear Amyloid β _{1–42} and Delay the Cognitive Decline in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *J. Neurosci.* **2008**, *28* (22), 5784–5793. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1146-08.2008>.
- (78) Feng, M.; Jiang, W.; Kim, B. Y. S.; Zhang, C. C.; Fu, Y.-X.; Weissman, I. L. Phagocytosis Checkpoints as New Targets for Cancer Immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19* (10), 568–586. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0183-z>.
- (79) Hoppenbrouwers, T.; Bastiaan-Net, S.; Garssen, J.; Pellegrini, N.; Willemsen, L. E. M.; Wichers, H. J. Functional Differences between Primary Monocyte-Derived and THP-1 Macrophages and Their Response to LCPUFAs. *PharmaNutrition* **2022**, *22*, 100322. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2022.100322>.
- (80) Guadagno, J.; Xu, X.; Karajgikar, M.; Brown, A.; Cregan, S. P. Microglia-Derived TNF α Induces Apoptosis in Neural Precursor Cells via Transcriptional Activation of the Bcl-2 Family Member Puma. *Cell Death Dis.* **2013**, *4* (3), e538–e538. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.59>.
- (81) Aminin, D.; Wang, Y. Macrophages as a “Weapon” in Anticancer Cellular Immunotherapy. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **2021**, *37* (9), 749–758. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12405>.

VIII. Annexes

1. Matériel et méthodes

Réactif	Nom complet	Fournisseur [Référence]
Acétone	Aceton, C ₃ H ₆ O	CarlRoth®
Anticorps anti-CD40 de souris (primaire, FACS)	CD40-APC	Beckman Coulter [REF: B30636]
Anticorps anti-HSP90 de souris (primaire, FACS)	Heat Shock Protein 90 beta	DSHB [REF: H90-10-s]
Anticorps anti-souris (secondaire, FACS)	Rhodamine Red™-X (RRX) AffiniPure™ Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch [REF: 715-295-150]
Anticorps anti-HA-P2G de lapin (primaire, Western blot)	Anti -HA tag antibody - CHIP Grade	Abcam [AB9110]
Anticorps anti-gD de souris (primaire, Western blot)	Anticorps HSV-1 gD (DL6)	Santa Cruz Biotechnology [REF: SC-21719]
Anticorps anti-lapin (secondaire Western blot)	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Sigma Aldrich [REF: 7074S]
Anticorps anti-souris (secondaire Western blot)	Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Sigma Aldrich [REF: 7076S]
BSA	Bovine Serum Albumin	VWR®
Bradford	Bradford	Biorad
DMEM-F12	DMEM/F-12 (1:1) (1x) + GlutaMax™	Gibco®
DMEM-HG	DMEM High Glucose with L-Glutamine, with Sodium Pyruvate	Biowest®
fAβ	fAβ1-42	Anaspec
fAβ Fluor 488	fAβ1-42 Hilyte™ Fluor 488-labeled	Anaspec
FBS	Foetal Bovine Serum	Gibco®
Hoechst	BisBenzimide H 33342 trihydrochloride	Sigma Aldrich

IFN γ	Human IFN-g1b	Miltenyi Biotec
IL4	Human IL-4	Miltenyi Biotec
Lait	Lait en poudre	CarlRoth [®]
Lymphoprep	Lymphoprep [™]	StemCell [™] Technologies
LysoTracker	LysoTracker [™] Deep Red	Invitrogen (Thermo Fischer Scientific) [REF : L12492]
M-CSF	Human M-CSF	Miltenyi Biotec
PAF 4%	Fixation Buffer (PAF 4%)	BioLegend [®]
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Magnesium, without Calcium	Biowest [®]
Pen/Strep	Pénicilline-Streptomycine	Gibco [®]
RPMI	RPMI 1640 with L-Glutamine	VWR [®] / Biowest [®]
SYBR [®] Green	No ROX SYBR [®] MasterMix blue dTTP	Takyon [™] (Eurogentec)
Triton	Triton [®]	CarlRoth [®]
Trypsine	Trypsin-EDTA	Biowest [®]
VP-SFM	Virus Production-Serum Free Medium	Gibco [®]
ZombieNIR	ZombieNIR [™] Fixable Viability Kit	BioLegend [®]
Tris	Tris Base	Fisher Bioreagents
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid	VWR
HCl	Hydrochloric acid 35%	VWR
NaCl	Sodium Chloride	VWR
Sodium deoxycholate	Sodium deoxycholate	Sigma
NP40	Nonidet P40 Substitute (detergent solution)	Roche
Inhibiteur de protéases 50x complete	cOmplete [™] , EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Glycine	Glycin	Carl Roth [®]
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate Pellets	Carl Roth [®]
Méthanol	Methanol, >= 99.5%	Fisher Scientific [™]
Tween	Tween [®] 20 (Polysorbate)	VWR Chemicals

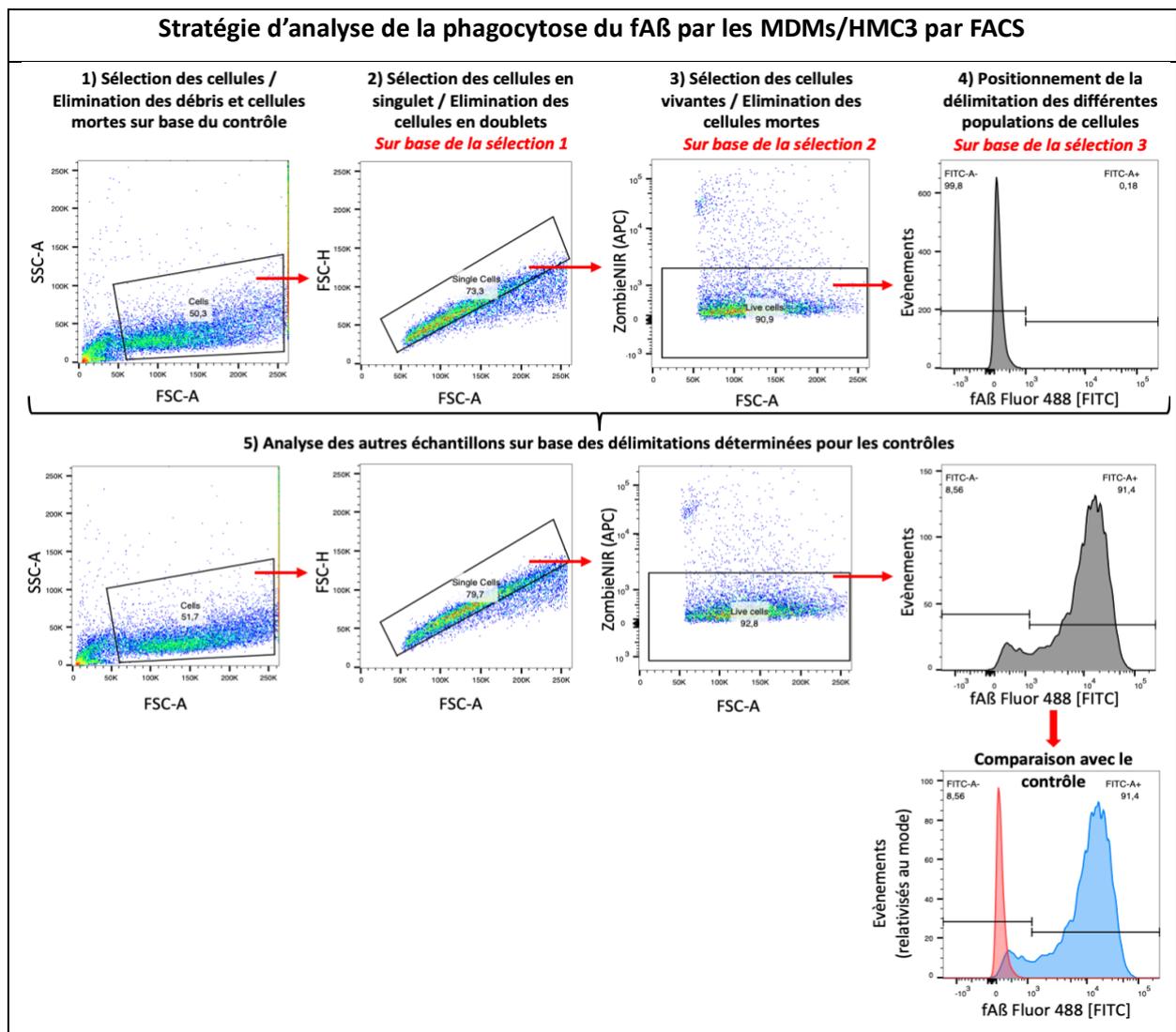
Glycérol	Glycerol, >= 99%	Fisher Chemicals
β-mercaptoéthanol	2-Mercaptoéthanol, >= 99%	CarlRoth®
Bleu de bromophénol	Bromophenol blue sodium salt	Alfa Aesar
Acrylamide:bisacrylamide	Acrylamide:bisacrylamide (37,5: 1)	CarlRoth®
APS	Amonium Persulfate	CarlRoth®
Temed	Tetramethylethylenediamine	Fisher Scientific™
Luminol	Pierce® ECL2, Solution A (Luminol)	Thermo Scientific
Acide Coumarique	Pierce® ECL2, Solution B (Acide Coumarique)	Thermo Scientific
H ₂ O ₂	Pierce® ECL2, Solution C (H ₂ O ₂)	Thermo Scientific

Annexe 1. Liste des réactifs utilisés, avec leur nom complet et leur fournisseur (et référence si nécessaire).

Gène	Séquence de l'amorce sens	Séquence de l'amorce antisens	Fournisseur
<i>APOL4</i>	5'-CATCACAAGCGTCGGGGTG-3'	5'-TCTCTCCAGGCTTCATCGC-3'	IDT
<i>C1R</i>	5'-ACTACTGCCATGAGCCATATTAC-3'	5'-GGAATCTTCTCTCCCTTCTGTTC-3'	IDT
<i>C15</i>	5'-GGAAGAGTTCCAAGTCCCATA C-3'	5'-GGCTACAAGGGACATCTACAAA-3'	IDT
<i>CD163L1</i>	5'-GGTCTGTGAAGTCTGAGGTT TA-3'	5'-CTGATCCTTCTTGCCATTCT-3'	IDT
<i>CXCL9</i>	5'-TGATTGGAGTGCAAGGAACCC-3'	5'-AATTTTCTCGCAGGAAGGGCT-3'	IDT
<i>CXCL10</i>	5'-CTGAAAGCAGTTAGCAAGGAAAG-3'	5'-TGTAGGGAAGTGATGGGAGA-3'	IDT
<i>CXCL11</i>	5'-AGCAGTGAAAGTGGCAGATATT-3'	5'-GCTTGCTTCGATTTGGGATTTAG-3'	IDT
<i>CXCL12</i>	5'-TAGTCAAGTGCCTCCACGAG-3'	5'-ACACACAGCCAGTCAACGAG-3'	IDT
<i>CXCR4</i>	5'-ACAGTCAACCTCTACAGCAGTGTC-3'	5'-GCCAACATAGACCACCTTTTCAGCC-3'	Eurogentec
<i>FN1</i>	5'-GGCACTGATGAAGAACCCTTAC-3'	5'-CTTATGCCTCTGCTGGTCTTTC-3'	IDT
<i>GBP1</i>	5'-GGA CCC TCG CTC TTA AAC TTC-3'	5'-TGC CTT TCG TCG TCT CAT TT-3'	IDT
<i>GBP5</i>	5'-CTAAGGCCAAAGCAAGGTAGT-3'	5'-TGGTGAGCAGGTAAGTCAAAG-3'	IDT
<i>IDO1</i>	5'-CCCTCAAGTGTTTCACCAAATC-3'	5'-GTCTTCCCAGAACCCCTTCATAC-3'	IDT
<i>IL4</i>	5'-ACTGCACAGCAGTCCACAG-3'	5'-CTCTGGTTGGCTTCCTTAC-3'	Eurogentec
<i>IL6</i>	5'-AGGAGACTTGCTGGTGAAAA-3'	5'-GGTTGGGTCAGGGGTGGTTA-3'	IDT
<i>IL12</i>	5'-CACAGTGGAGGCCTGTTT AC-3'	5'-GGCACAGGGCCATCATAAA-3'	IDT
<i>INOS</i>	5'-AATGAGGAGCAGGTCGAGGACT-3'	5'-TCCTTCTCGCCTCGTAAGGA-3'	IDT
<i>MMP2</i>	5'-CGTCTGTCCCAGGATGACATC-3'	5'-ATGTCAGGAGAGGCCCCATA-3'	IDT
<i>MT1G</i>	5'-GGTCTGTGAAGTCTGAGGTTTA-3'	5'-CTGATCCTTCTTGCCATTCT-3'	IDT
<i>MT2A</i>	5'-CCTCTTGACAGTGCAGTCTTATC-3'	5'-CCCTCTGTGTGTTCTAAAGTG-3'	IDT
<i>PLAAT4</i>	5'-CAAACCTGGAGACCTGATTGA-3'	5'-ACTGAGAAGACACTGGAGGA-3'	IDT

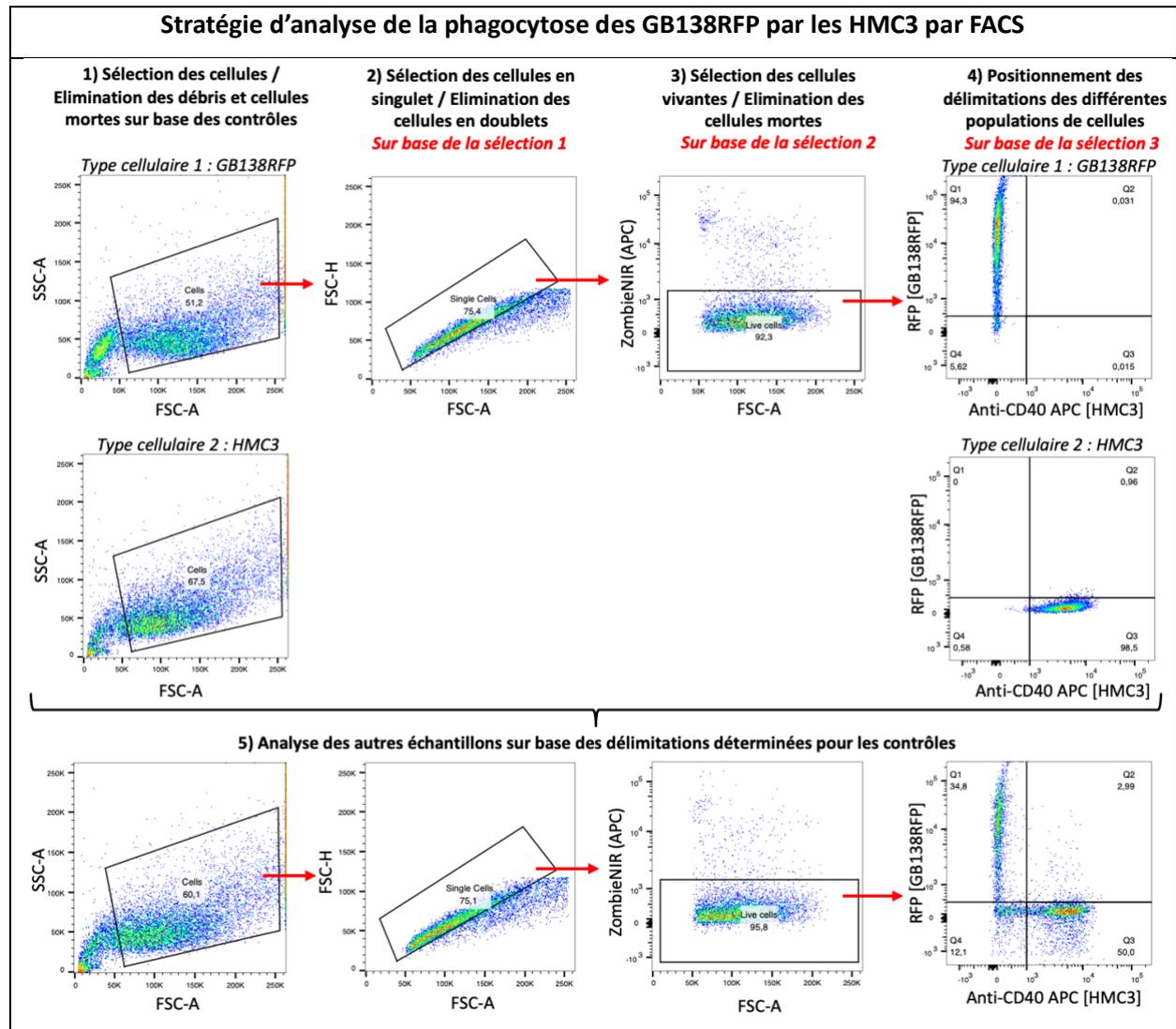
<i>SIRPα</i>	5'-CCTCTTGACAGTGCAGTCTTATC-3'	5'-CCCTCTGTGTTCCTAAAGTG-3'	IDT
<i>SLC16A10</i>	5'-GTGCCTTATGTTCACTTGATGAAAC-3'	5'-CCTTCTTACACCAGGCACA-3'	IDT
<i>TBPh</i>	5'-ACAGCCTGCCACCTTACG-3'	5'-TGCCATAAGGCATCATTGGACTA-3'	IDT
<i>THBD</i>	5'-AATGTGCTCTCGGGTGTGT-3'	5'-ACACAAGTGCTGGGGTACAG-3'	IDT
<i>THBS1</i>	5'-TCCAGGAGCAACCTCTACTC-3'	5'-CAGCAGGGATCCTGTGTGT-3'	IDT
<i>TNC</i>	5'-GCCACTCATTATACCATCACCA-3'	5'-CAACCTCAGACACGGCTAAA-3'	IDT
<i>TNFα</i>	5'-CGCCACCAGCTCTTCT-3'	5'-TGGGCTACAGGCTTGCTACTC-3'	IDT
<i>VCAN</i>	5'-GGCACCTGTTATCCTACTGAAA-3'	5'-GCTCCATTACGACAGGGATTAG-3'	IDT
<i>ZNF704</i>	5'-AGACAACCTTACTCCAGCGA-3'	5'-ATGCTCCCCACCCACAGT-3'	IDT

Annexe 2. Séquences des amorces sens et antisens correspondant aux gènes étudiés par RT-qPCR.



Annexe 3. Stratégie d'analyse de la phagocytose de l'amyloïde (fA β) par les macrophages (MDMs) ou la microglie (HMC3) par cytométrie en flux (FACS). Les MDMs ou les HMC3 sont incubés pendant 2h ou 6h avec du fA β fluorescent. L'analyse est réalisée par FACS Fortessa. Les différentes sélections se font sur base du contrôle négatif (cellules non incubées avec le fA β). L'étape 1 consiste à sélectionner les cellules parmi les débris cellulaires et les cellules mortes, l'étape 2 à isoler les singulets de cellules parmi les doublets et l'étape 3 à retenir les cellules vivantes parmi les mortes. L'étape 4 permet de délimiter les deux populations de cellules (cellules FITC⁺ / cellules FITC⁻). Enfin,

l'étape 5 consiste à appliquer les sélections des quatre premières étapes sur l'ensemble des échantillons. Figure réalisée avec PowerPoint.

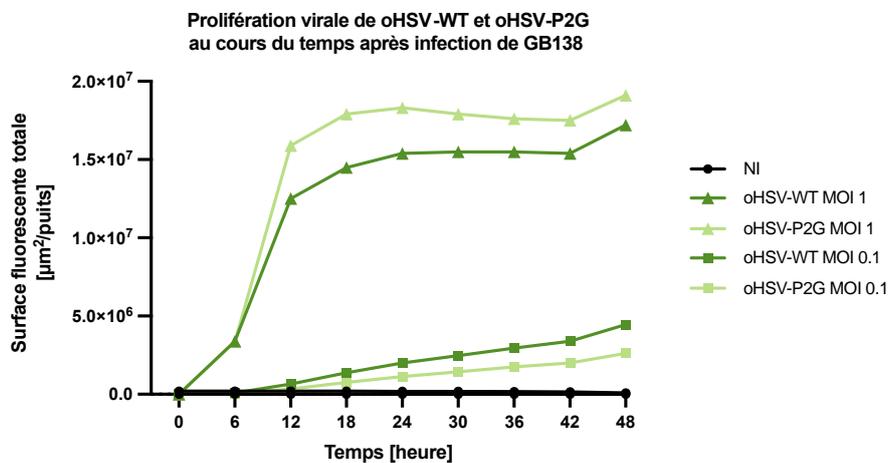


Annexe 4. Stratégie d'analyse de la phagocytose des cellules de GBM (GB138RFP) par la microglie (HMC3) par cytométrie en flux (FACS). Les HMC3 sont incubées pendant 8h avec les GB138RFP. Les HMC3 sont marquées avec un anticorps anti-CD40 couplé à un anticorps secondaire fluorescent (APC) et les GB138RFP expriment la RFP. L'analyse est réalisée par FACS Fortessa. Les différentes sélections se font sur base des contrôles négatifs (GB138RFP ou HMC3 seules). L'étape 1 consiste à sélectionner les cellules parmi les débris cellulaires et les cellules mortes, l'étape 2 à isoler les singulets de cellules parmi les doublets et l'étape 3 à retenir les cellules vivantes parmi les mortes. L'étape 4 permet de délimiter les différentes populations de cellules (RFP⁺/CD40⁻ (GB138RFP, cadrant 1), RFP⁺/CD40⁺ (HMC3 ayant phagocyté des GB138RFP, cadrant 2), RFP⁻/CD40⁺ (HMC3, cadrant 3) et RFP⁻/CD40⁻ (GB138RFP n'exprimant pas la RFP, cadrant 4)). Enfin, l'étape 5 consiste à appliquer les sélections des quatre premières étapes sur l'ensemble des échantillons. Figure réalisée avec PowerPoint.

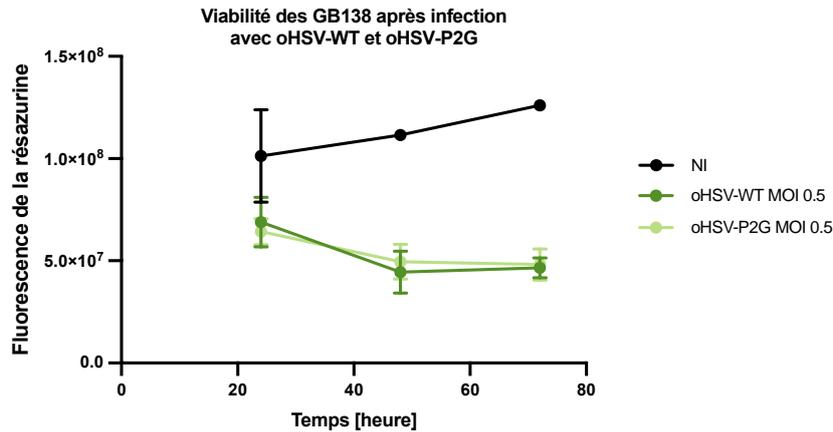
Solutions	Composition
Gel de concentration (volumes pour 1 gel)	1,95 mL H ₂ O - 0,3 mL Acrylamide:bisacrylamide (37,5: 1) 40% - 0,75 mL Tris 0,5 M pH 6,8 - 30 µL SDS 10% - 30 µL APS 10% - 3 µL Temed
Gel de séparation (13%, volumes pour 1 gel)	3,3 mL H ₂ O - 2,6 mL Acrylamide:bisacrylamide (37,5: 1) 40% - 2 mL Tris 1,5 M pH 8,8 - 80 µL SDS 10% - 60 µL APS 10% - 3 µL Temed
Solution de révélation (électrochimiluminescence, ECL)	1 mL Luminol - 100 µL Acide Coumarique - 0,3 µL H ₂ O ₂
Tampon de migration	50 mM Tris - 192 mM glycine - 3,5 mM SDS
Tampon de transfert	25 mM Tris - 192 mM glycine - 20% méthanol
TBS-T (Tris-Buffered Saline Tween)	20 mM Tris-HCl pH 7,6 - 150 mM NaCl - 5% Tween
TR1X	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 - 10% Glycérol - 2% SDS - 3% β-mercaptoéthanol - H ₂ O - bleu de bromophénol

Annexe 5. Composition des solutions utilisées dans le cadre du Western blot.

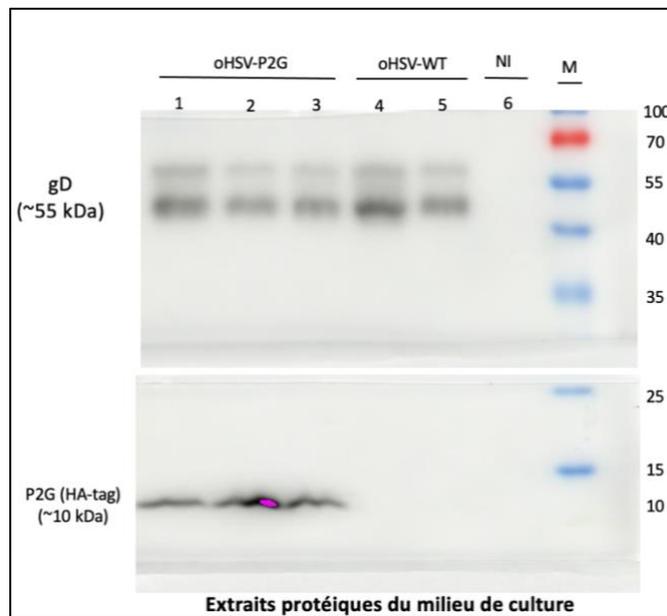
2. Expériences préliminaires



Annexe 6. Prolifération similaire des virus oHSV-WT et oHSV-P2G après infection de GB138. Les GB138 sont infectées par les virus oHSV-WT et oHSV-P2G exprimant la GFP, à une MOI de 1 de 0,1, pendant 0 à 48h. Le contrôle consiste en des GB138 non infectées (= NI). La prolifération virale est déterminée par IncuCyte, selon la surface fluorescente (correspondant à la GFP exprimée par les virus) mesurée par puits en µm²/puits.

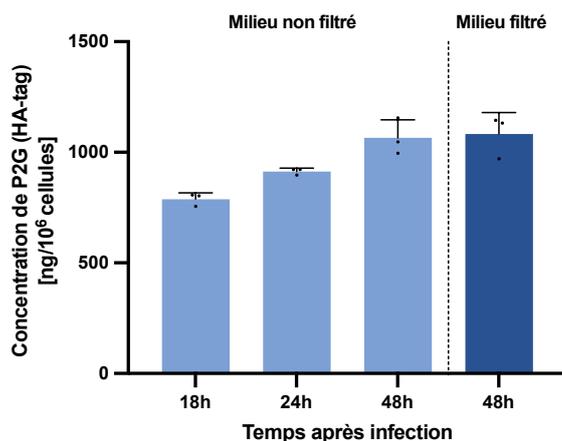


Annexe 7. Diminution identique de la viabilité des GB138 après infection avec les virus oHSV-WT et oHSV-P2G. Les GB138 sont infectées par les virus oHSV-WT et oHSV-P2G, à une MOI de 0,5, pendant 0 à 72h. Le contrôle consiste en des GB138 non infectées (= NI). La viabilité est mesurée via la fluorescence de la résazurine, qui reflète l'activité métabolique des cellules.

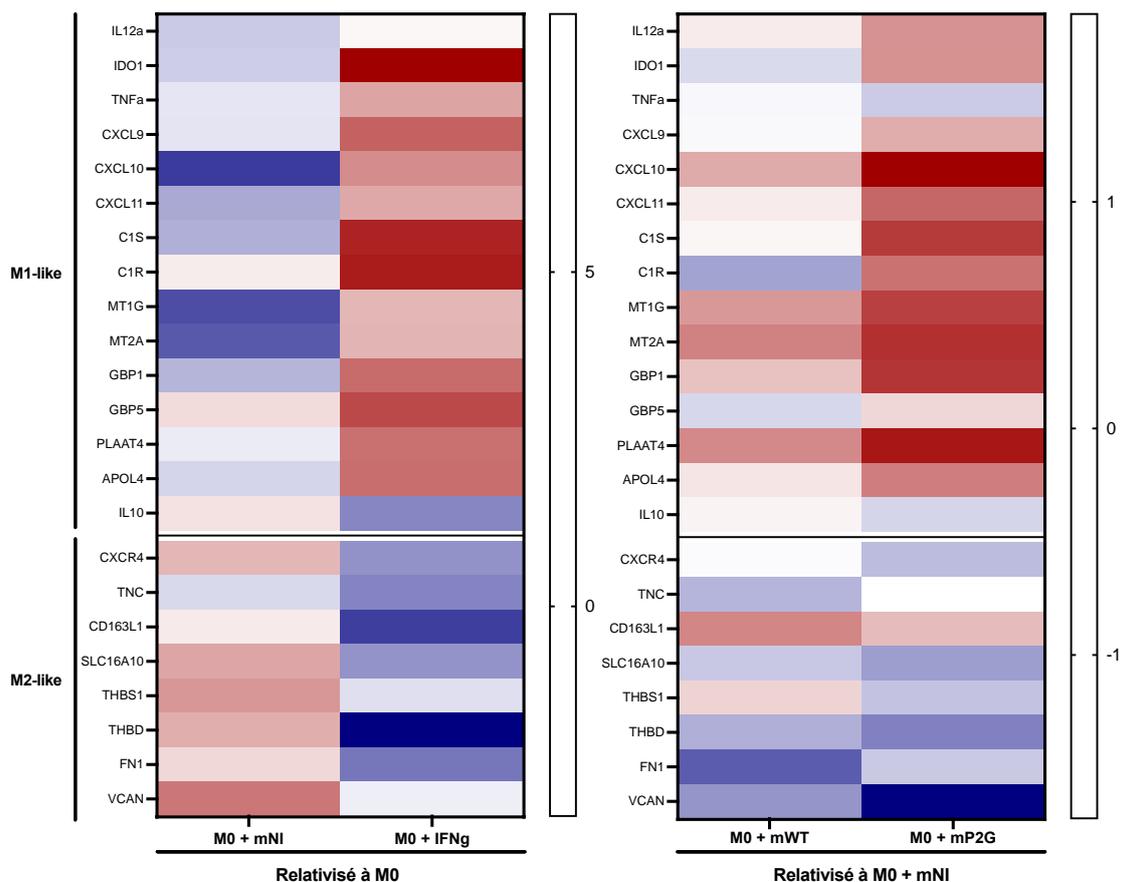


Annexe 8. Production de P2G par les GB138 infectées par oHSV-P2G. Analyse par Western Blot de la production de particules virales et/ou de P2G par les cellules GB138 après 18h d'infection par la nouvelle et l'ancienne production d'oHSV-WT et/ou d'oHSV-P2G, à une MOI de 1. Le contrôle consiste en des cellules GB138 non infectées (NI). L'analyse est effectuée sur les extraits protéiques des milieux de culture. La glycoprotéine gD (détectée à environ 55 kDa) est présente dans les extraits protéiques de milieu de culture de GB138 infectées par oHSV-WT ou par oHSV-P2G. La chimiokine P2G (HA-tag détectée à environ 10 kDa) est présente dans les extraits protéiques de milieu de culture de GB138 infectées par oHSV-P2G. Légende : M (marqueur de poids moléculaire, kDa); 1. oHSV-P2G (nouvelle production); 2. oHSV-P2G (nouvelle production) 3. oHSV-P2G (ancienne production); 4. oHSV-WT (nouvelle production); 5. oHSV-WT (nouvelle production); 6. NI (non infecté).

**Production de P2G dans le milieu conditionné mP2G
après infection de GB138 avec oHSV-P2G**

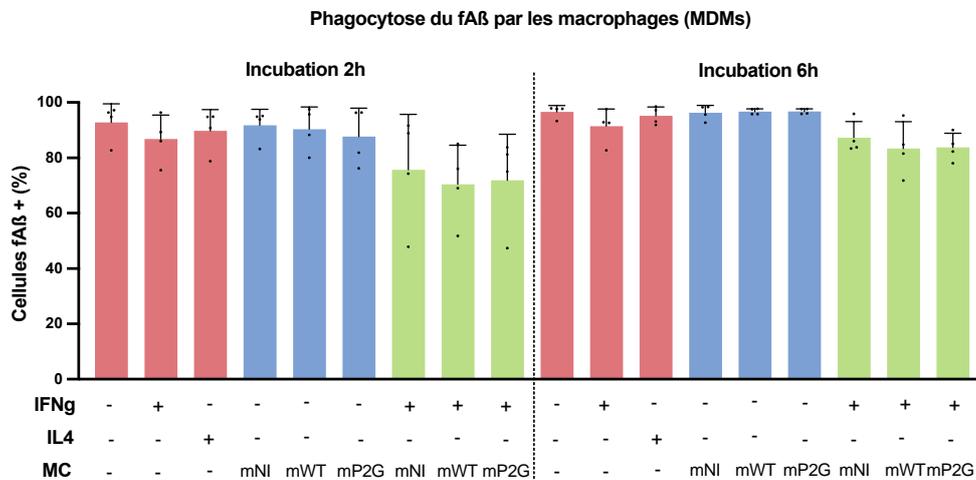


Annexe 9. Production de P2G dans le milieu conditionné mP2G. Les cellules GB138 sont infectées avec le virus oHSV-P2G (MOI = 1) pendant 18h, 24h ou 48h et le milieu est ensuite récupéré et filtré (0,1 μ m) ou non. La concentration en P2G est déterminée par kit ELISA. Expérience réalisée en triplicat technique, les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. P2G est présent dans le milieu récupéré, sa concentration augmente avec le temps d'infection mais n'est pas impactée par la filtration (aucune différence significative avec le test Anova).

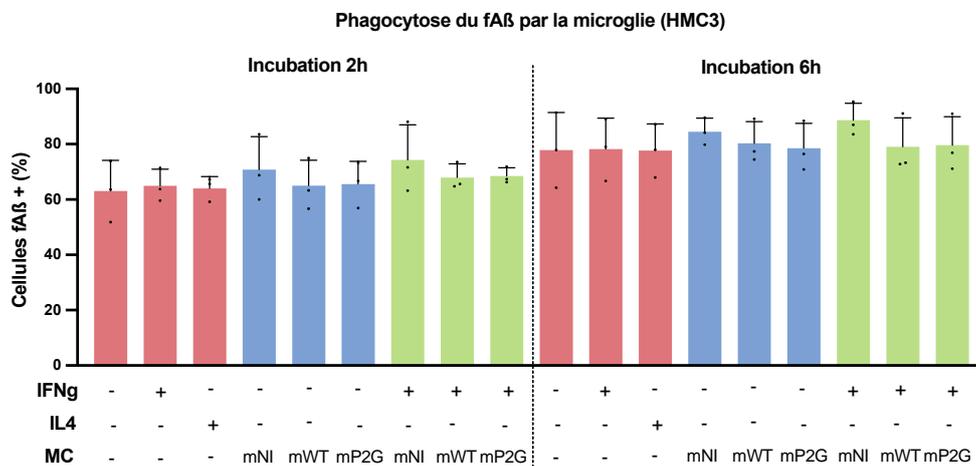


Annexe 10. Mise en évidence par RNA-Seq des gènes M1-like et M2-like les plus modulés dans différentes conditions expérimentales sur macrophages (MDMs). Les MDMs sont polarisés (IFN γ) ou non, et/ou traités aux milieux conditionnés de cellules de GBM (GB138) non infectées (mNI) ou infectées par oHSV-WT (mWT) ou oHSV-P2G (mP2G) ou non traités pendant 48h. Les données sont représentées en Log₂ foldchange de l'expression des gènes par rapport à M0 (panel gauche) et par rapport à M0 + mNI (panel droit).

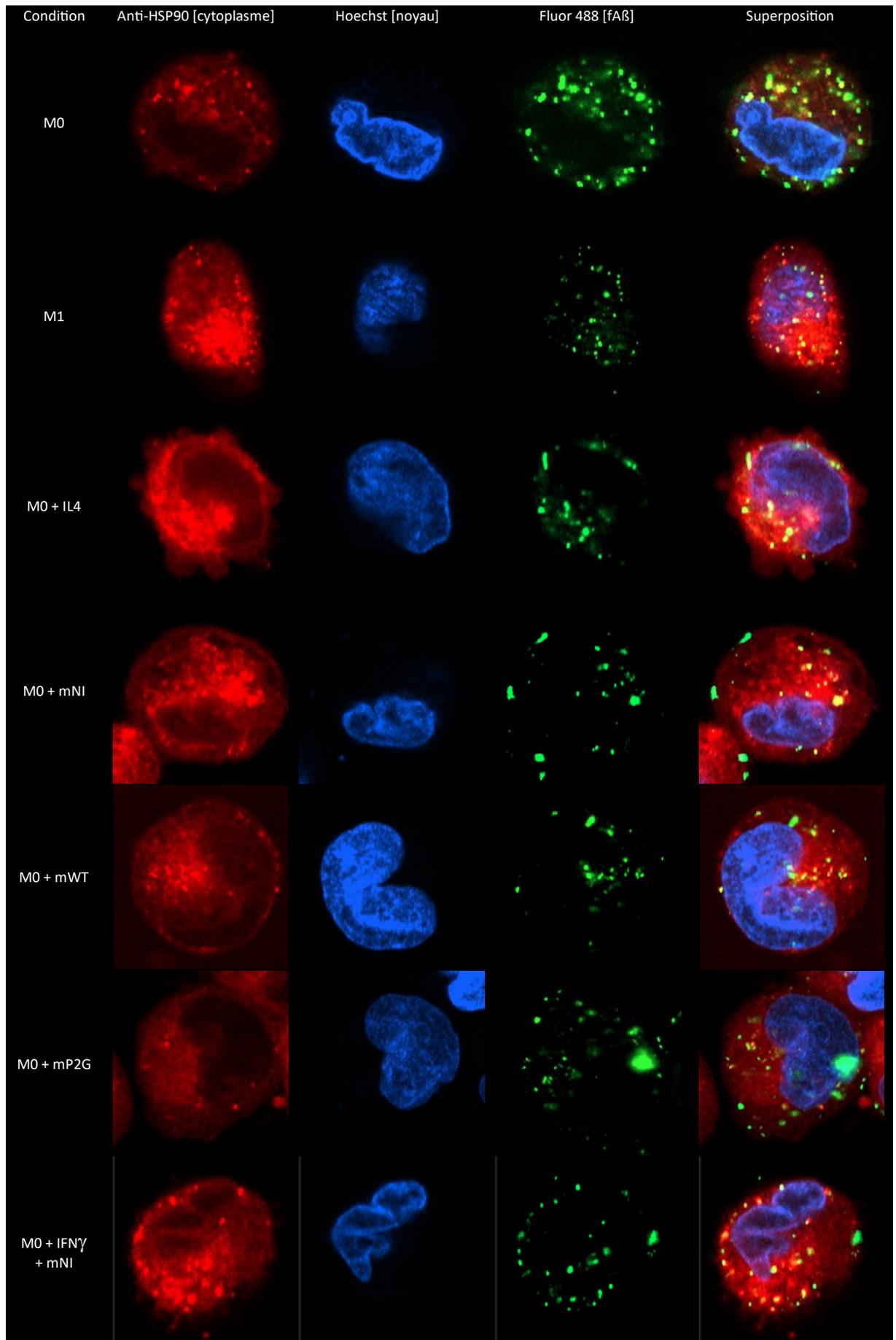
3. Phagocytose

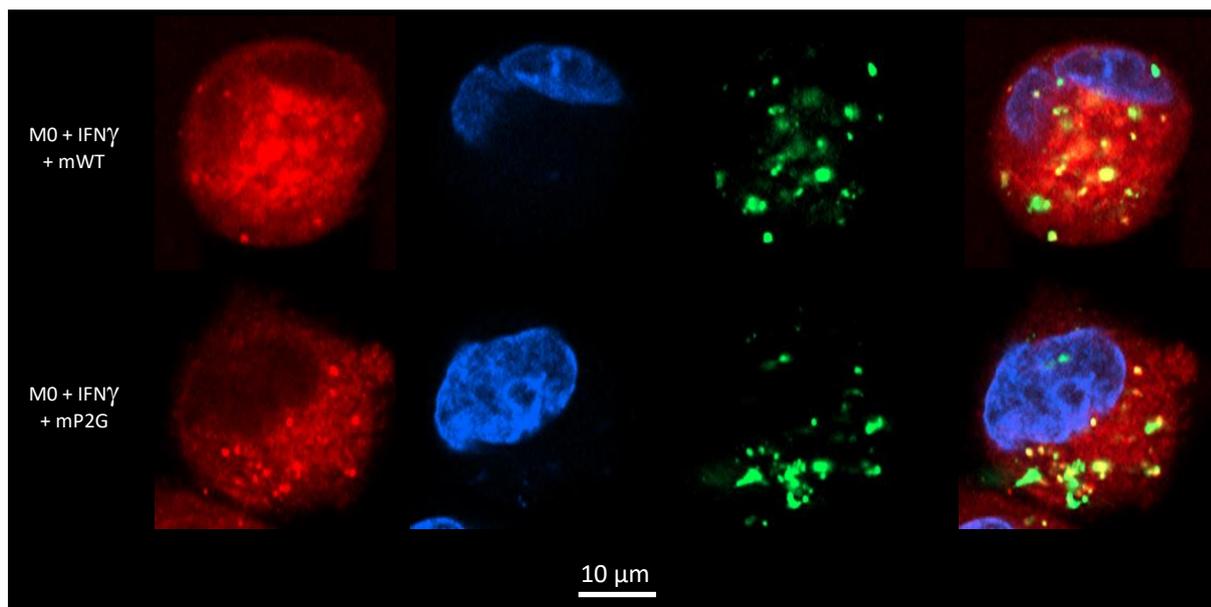


Annexe 11. Pourcentage de macrophages (MDMs) ayant phagocyté de l'amyloïde (fA β). Les MDMs sont polarisés (IFN γ ou IL4) ou non, et/ou traités aux milieux conditionnés de cellules de GBM (GB138) non infectées (mNI) ou infectées par oHSV-WT (mWT) ou oHSV-P2G (mP2G) ou non traités pendant 48h. Ils sont incubés pendant 2h ou 6h avec l'amyloïde fluorescent (fA β). Les échantillons sont marqués au ZombieNIR (marqueur de mort cellulaire), fixés à la PAF 4%, puis analysés par cytométrie en flux (FACS Fortessa). L'expérience est réalisée en plusieurs réplicats biologiques (N=4), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. Cellules fA β ⁺ = cellules positives au fA β Fluor 48. Les statistiques correspondent au test Anova (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur \leq 0,05 ; ** = p-valeur \leq 0,01 ; *** = p-valeur \leq 0,001 ; **** = p-valeur \leq 0,0001). Figure réalisée avec GraphPad Prism.

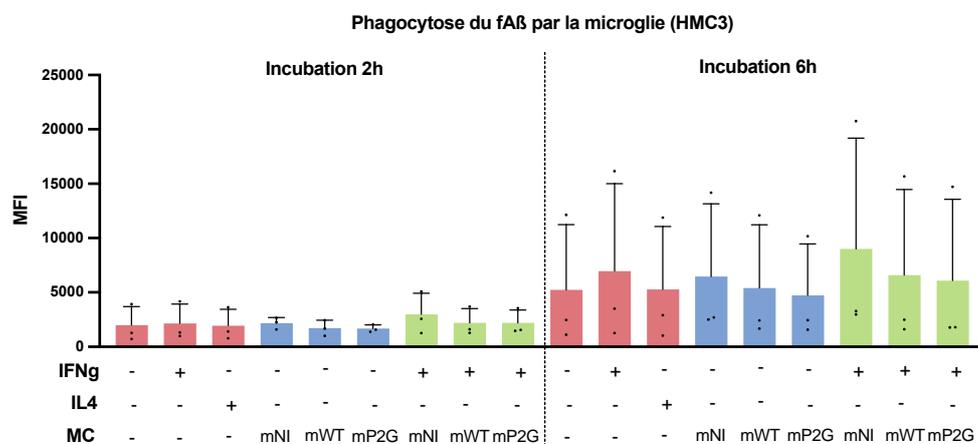


Annexe 12. Pourcentage de cellules de microglie (HMC3) ayant phagocyté de l'amyloïde (fA β). Les HMC3 sont polarisées (IFN γ ou IL4) ou non, et/ou traitées aux milieux conditionnés de cellules de GBM (GB138) non infectées (mNI) ou infectées par oHSV-WT (mWT) ou oHSV-P2G (mP2G) ou non traités pendant 48h. Elles sont incubées pendant 2h ou 6h avec l'amyloïde fluorescent (fA β). Les échantillons sont marqués au ZombieNIR (marqueur de mort cellulaire), fixés à la PAF 4%, puis analysés par cytométrie en flux (FACS Fortessa). L'expérience est réalisée en triplicat biologique (N=3), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. Cellules fA β ⁺ = cellules positives au fA β Fluor 48. Les statistiques correspondent au test Anova (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur \leq 0,05 ; ** = p-valeur \leq 0,01 ; *** = p-valeur \leq 0,001 ; **** = p-valeur \leq 0,0001). Figure réalisée avec GraphPad Prism.

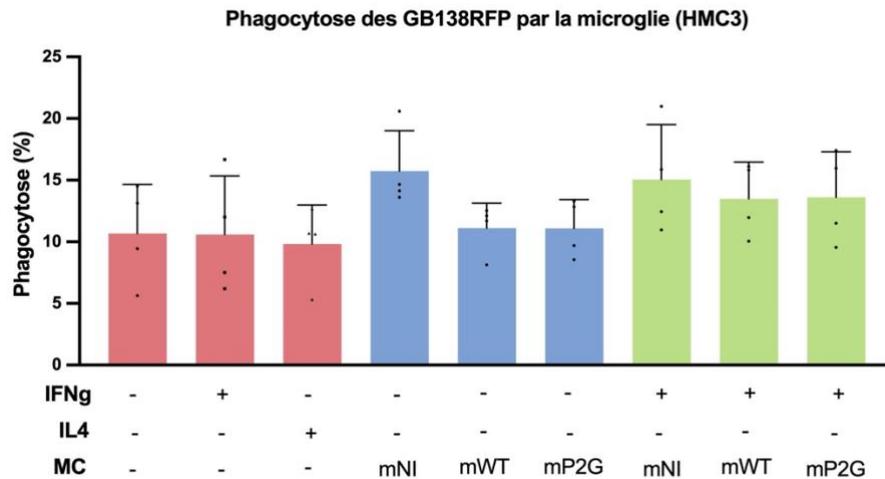




Annexe 13. Analyse en immunofluorescence (IF) de la phagocytose de l'amyloïde (fAβ) par la microglie (HMC3). Les HMC3 sont polarisées (IFN γ ou IL4) ou non, et/ou traitées aux milieux conditionnés de cellules de GBM (GB138) non infectées (mNI) ou infectées par oHSV-WT (mWT) ou oHSV-P2G (mP2G) ou non traités pendant 48h. Elles sont incubées pendant 6h avec l'amyloïde fluorescent (fAβ). Leur cytoplasme est marqué avec l'anticorps anti-HSP90 couplé à un anticorps secondaire fluorescent (rouge) et leur noyau avec du Hoechst (bleu). L'amyloïde fAβ est fluorescent (Fluor 488, vert). Les cellules marquées sont analysées au microscope confocal (Confocal Zeiss HR LSM 980, Airyscan, 63x).



Annexe 14. Phagocytose de l'amyloïde (fAβ) par la microglie (HMC3). Les HMC3 sont polarisées (IFN γ ou IL4) ou non, et/ou traitées aux milieux conditionnés de cellules de GBM (GB138) non infectées (mNI) ou infectées par oHSV-WT (mWT) ou oHSV-P2G (mP2G) ou non traités pendant 48h. Elles sont incubées pendant 2h ou 6h avec l'amyloïde fluorescent (fAβ). Les échantillons sont marqués au ZombieNIR (marqueur de mort cellulaire), fixés à la PAF 4%, puis analysés par cytométrie en flux (FACS Fortessa). L'expérience est réalisée en triplicat biologique (N=3), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. MFI = Median Fluorescence Intensity, calculée sur l'ensemble des cellules. Les statistiques correspondent au test Anova (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur $\leq 0,05$; ** = p-valeur $\leq 0,01$; *** = p-valeur $\leq 0,001$; **** = p-valeur $\leq 0,0001$). Figure réalisée avec GraphPad Prism.



Annexe 15. Phagocytose des cellules de glioblastome (GB138RFP) par la microglie (HMC3). Les HMC3 sont polarisées (IFN γ ou IL4) ou non, et/ou traitées aux milieux conditionnés de cellules de GBM (GB138) non infectées (mNI) ou infectées par oHSV-WT (mWT) ou oHSV-P2G (mP2G) ou non traités pendant 48h. Elles sont incubées pendant 8h avec des cellules de glioblastome exprimant la RFP (GB138RFP). Les échantillons sont marqués avec du ZombieNIR (marqueur de mort cellulaire) puis l'anticorps anti-CD40 fluorescent (marqueur spécifique des HMC3), fixés à la PAF 4%, puis analysés par cytométrie en flux (FACS Fortessa). L'expérience est réalisée en plusieurs réplicats biologiques (N=4), les données représentées en sont la moyenne et chacun des points correspond à un réplicat. Le pourcentage de phagocytose est calculé selon le rapport entre le nombre de HMC3 positives à la RFP et le nombre total de cellules (HMC3 et GB138RFP). Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques correspondent au test Anova (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur $\leq 0,05$; ** = p-valeur $\leq 0,01$; *** = p-valeur $\leq 0,001$; **** = p-valeur $\leq 0,0001$). Figure réalisée avec GraphPad Prism.

Impact d'oHSV-P2G, un Herpès Virus oncolytique exprimant un antagoniste de CXCR4, sur la polarisation et la phagocytose des macrophages et de la microglie dans le contexte du Glioblastome

Mémoire réalisé par Lola Adam, durant l'année académique 2023-2024, au sein du Laboratoire de Virologie et d'Immunologie (Giga, CHU), sous la supervision du Pr. Catherine Sadzot et de Maxime Dubois.

Le glioblastome (GBM) est une tumeur cérébrale particulièrement agressive, classée comme grade 4 par l'OMS. L'agressivité est notamment médiée par le microenvironnement tumoral (TME) immunosuppresseur, comportant des TAMMs de phénotype *M2-like* pro-tumoral/anti-inflammatoire. L'immunosuppression est également médiée par la voie de signalisation CXCL12/CXCR4, qui est responsable du recrutement des TAMMs vers le site tumoral et de leur polarisation en phénotype *M2-like*. Les TAMMs sont également connus pour leur capacité de phagocytose, fonction importante dans le cadre de la réponse immunitaire face aux tumeurs. Cette fonction est cependant altérée par la tumeur, notamment par l'axe de signalisation CD47/SIRP α . Le traitement standard n'étant pas efficace, d'autres solutions thérapeutiques sont étudiées, telles que la virothérapie oncolytique. Le virus oncolytique oHSV-1 utilisé dans cette étude est armé de la chimiokine CXCL12 mutée (oHSV-P2G), permettant d'inhiber la voie CXCL12/CXCR4. Les objectifs principaux sont d'évaluer l'impact du virus oHSV-P2G sur la polarisation des TAMMs et sur leur capacité de phagocytose. L'hypothèse de travail suggère que le virus oHSV-P2G induit un phénotype *M1-like* pro-inflammatoire/antitumoral et augmente la phagocytose.

L'étude est réalisée sur la microglie, représentée par la lignée cellulaire HMC3, et sur les macrophages, différenciés à partir de monocytes primaires (MDMs). Le virus est étudié au travers de milieu conditionné (mP2G), permettant de visualiser l'impact de la molécule P2G en tant que telle. La polarisation des cellules est analysée par transcriptomique (RT-qPCR) et la phagocytose par cytométrie en flux (FACS).

L'IFN γ a induit une polarisation *M1-like* des macrophages et de la microglie, tandis que l'IL4 a induit une polarisation *M2-like* moins soutenue. Le milieu mP2G a inversé le phénotype *M2-like* des HMC3, induit par le milieu conditionné non infecté (mNI) mimant le TME de la tumeur. Il a cependant diminué leur capacité de phagocytose de l'amyloïde et de cellules de GBM (GB138). En revanche, mP2G n'a pas influencé le phénotype des MDMs, mais a également diminué leur capacité de phagocytose.

Le virus oHSV-P2G a déjà montré sa capacité à inhiber la migration des GSCs et à améliorer le pronostic vital de souris *in vivo*, et il a montré dans ce travail sa capacité influencer la microglie vers un phénotype *M1-like*. Ces résultats encouragent son utilisation dans le cadre de traitements contre le GBM, même si des recherches supplémentaires sont nécessaires concernant les macrophages et la phagocytose.