

þý Impact d'un herpèsvirus oncolytique exprimant un inhibiteur microenvionnement du glioblastome, en particulier sur

Auteur : Huc, Noa

Promoteur(s) : Sadzot, Catherine

Faculté : Faculté des Sciences

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

Année académique : 2024-2025

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/22940>

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.

Université de Liège | Faculté des Sciences | Département des Sciences de la Vie

IMPACT D'UN HERPÈSVIRUS ONCOLYTIQUE EXPRIMANT UN INHIBITEUR DE CXCR4 SUR LE MICROENVIRONNEMENT DU GLIOBLASTOME, EN PARTICULIER SUR L'ANGIOGENÈSE

NOA HUC

Mémoire réalisé en vue de l'obtention du grade de Master en Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire (BBMC) à finalité approfondie

JUIN 2025

Promotrice : **Pr Catherine Sadzot**
Encadrant : **Maxime Dubois**

Laboratoire de Virologie et d'Immunologie (GIGA)

Résumé du travail

Mémoire réalisé par Noa Huc, au cours de l'année académique 2024-2025, au sein du Laboratoire de Virologie et d'Immunologie (GIGA), sous la supervision du Pr Catherine Sadzot et de Maxime Dubois.

IMPACT D'UN HERPÈSVIRUS ONCOLYTIQUE EXPRIMANT UN INHIBITEUR DE CXCR4 SUR LE MICROENVIRONNEMENT DU GLIOBLASTOME, EN PARTICULIER SUR L'ANGIOGENÈSE

Le glioblastome (GBM) est une tumeur cérébrale particulièrement agressive et fortement résistante aux traitements actuels. Il est notamment caractérisé par un microenvironnement immunosuppressif et une hypervasculisation. Parmi les voies de signalisation contrôlant ces processus, la voie de signalisation CXCL12/CXCR4 est impliquée et intervient également dans de nombreux autres mécanismes tumorigènes. Compte tenu de son rôle multifonctionnel, le ciblage de cette voie via une virothérapie oncolytique armée représente une approche innovante et prometteuse. Des données préliminaires du laboratoire ont montré que l'armement d'un herpèsvirus oncolytique avec un antagoniste de CXCL12, nommé P2G, inhibait la migration des GSCs et leurs caractéristiques de cellules souches, améliorait le pronostic vital de souris *in vivo* et polarisait la microglie vers un phénotype *M1-like*.

L'objectif de ce mémoire est donc de comprendre les effets de cet herpèsvirus oncolytique armé avec P2G (oHSV-P2G) sur le microenvironnement immunosuppressif du GBM et en particulier sur l'angiogenèse.

D'une part, les expériences d'immunofluorescence (IF) sur des coupes de cerveau de souris atteintes de GBM ont montré que le traitement par oHSV-P2G est capable de remodeler l'immunité dans le glioblastome en faveur d'un profil pro-inflammatoire, grâce à une augmentation de l'infiltration des lymphocytes T CD4+ et T CD8+ et une réduction des lymphocytes T régulateurs dans le GBM.

D'autre part, même si des analyses complémentaires sont nécessaires, nos résultats sont encourageants quant à la capacité de oHSV-P2G à réduire la vascularisation tumorale. Les IF ont montré qu'un traitement par oHSV-P2G entraîne une diminution de la surface occupée par les vaisseaux sanguins *in vivo*. Des expériences de tubulogenèse ont permis de valider cet impact sur la formation de structures vasculaires *in vitro*. De plus, des expériences de RT-qPCR ont mis en avant une diminution de l'expression de *VEGFA* dans les cellules de glioblastome en présence de oHSV-P2G.

Summary of the master's thesis

Master's thesis conducted by Noa Huc, during the academic year 2024-2025, within the Laboratory of Virology and Immunology (GIGA), under the supervision of Prof. Catherine Sadzot and Maxime Dubois.

IMPACT OF AN ONCOLYTIC HERPESVIRUS EXPRESSING A CXCR4 INHIBITOR ON THE MICRO-ENVIRONMENT OF GLIOBLASTOMA, IN PARTICULAR ON THE ANGIOGENESIS

Glioblastoma (GBM) is an aggressive cerebral tumor extremely resistant to standard therapies. Among other characteristics, this cancer has an immunosuppressive microenvironment and is hypervasculatized. One of the signaling pathways controlling those processus is the CXCL12/CXCR4 axis which also participates in many other tumorigenic mechanisms. Considering its multiple activities in GBM, targeting this pathway with an oncolytic virotherapy represents an innovative and promising approach. Preliminary results of the lab showed that an oncolytic herpesvirus armed with an antagonist of CXCL12, named P2G, could inhibit GSCs migration and their characteristics of stem-like cells, improve mouse survival *in vivo* and polarize microglia into a M1-like phenotype.

Therefore, the aim of this master's thesis is to understand the effect of this oncolytic herpesvirus armed with P2G (oHSV-P2G) on the immunosuppressive microenvironment of the GBM, and, in particular, on the angiogenesis.

First, immunofluorescence experiments (IF) on brain section of mice with GBM suggested that oHSV-P2G treatment could remodel the immunity into a pro-inflammatory profile, through an increase in lymphocytes T CD4+ and T CD8+ infiltration accompanied by a decrease in regulatory T cells.

Secondly, even though complementary analyses are necessary, our results showed the ability of oHSV-P2G to reduce the tumoral vascularization. IF analyses have shown that oHSV-P2G treatment leads to a decrease in the area occupied by blood vessels *in vivo*. Tubulogenesis experiments have validated this impact on the formation of vascular structures *in vitro*. Moreover, RT-qPCR experiments emphasized a decrease in the expression of VEGFA in glioblastoma cells in the presence of oHSV-P2G.

Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été rendue possible grâce à l'aide précieuse de plusieurs personnes que je souhaite remercier sincèrement.

Je tiens tout d'abord à remercier ma promotrice, la Pr Catherine Sadzot, pour m'avoir permis de travailler sur ce beau projet et pour m'avoir fait confiance. Merci pour votre bienveillance, votre accompagnement attentif et vos recommandations avisées tout au long de mon mémoire.

Je souhaite également remercier chaleureusement mon encadrant, Maxime Dubois, pour sa supervision, son soutien, ses conseils et surtout pour sa patience. Merci d'avoir répondu à mes nombreuses questions. L'aboutissement de ce mémoire doit beaucoup à ton encadrement et ton engagement précieux.

Ensuite, merci à Cédric Lassence pour tous ses conseils, ses astuces et sa disponibilité. Merci aussi à toutes les autres personnes du laboratoire de virologie – Marielle, Victoire, Clément, Manon, Florine, Sacha et Sophie – ainsi qu'à l'équipe du laboratoire d'IMET et celle de Dequiedt, pour la bonne ambiance, les discussions, les rires et les coups de main.

Je remercie aussi le laboratoire *Mitochondria in Cell Communication* pour m'avoir transmis les bases indispensables lors de mon premier stage, ainsi que pour leurs aides précieuses apportées tout au long de mon mémoire. Merci également aux plateformes du GIGA pour les formations techniques et les conseils apportés.

Merci à mes amis, qu'ils aient partagé ces études avec moi, ou qu'ils m'accompagnent depuis les secondaires. Leur présence et leur complicité ont été précieuses tout au long de ce parcours. Merci pour ces moments de joie partagés.

Merci tout particulièrement à Sacha Dumez. Nous nous sommes rencontrés au début du bachelier, et même si nos débuts étaient un peu hésitants, il est vite devenu un véritable ami. Nous avons partagé chaque étape du parcours, du bachelier au master, jusqu'à faire notre mémoire dans le même laboratoire. Je peux dire avec certitude que je n'y serais pas arrivée sans lui. Son aide précieuse pendant les cours et les examens, son écoute, sa capacité à me remonter le moral dans les moments difficiles, et même son humour un peu douteux ont compté bien plus qu'il ne l'imagine. Merci pour tout, Sacha.

Enfin, je souhaite exprimer toute ma gratitude à mes parents et mon compagnon, Maxence, pour leur patience et leurs encouragements qui m'ont aidé à garder confiance et motivation jusqu'au bout. Merci d'avoir essuyé mes larmes dans les moments de stress, notamment durant les examens, et d'avoir toujours cru en moi, même quand je doutais.

Liste des abréviations

ACKR : Atypical chemokine receptor

ADN : Acide désoxyribonucléique

APC : Antigen Presenting Cells

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

BBB : Blood brain barrier

cDNA : complementary DNA

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CXCL12 : C-X-C chemokine ligand 12

CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4

DAMPs : Damage-associated molecular patterns

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM/F-12 : Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

dNMPs : Désoxyribonucléotides monophosphates

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EGM-2 : Endothelial cell growth medium

eIF2 α : eukaryotic initiation factor-alpha

EPCs : Endothelial progenitor cells

EtOH : Ethyl alcohol

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting

FBS : Fetal bovine serum

GB138 : Cellules primaires de glioblastome humain

GFP : Green Fluorescence Protein

GICs : Glioblastoma initiating cells

GMB : Glioblastome (multiforme)

GSC : Glioblastoma stem cells

HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1 α

HMC3 : Human microglial clone 3

HSV-1 : Herpes simplex virus -1

HUVEC : Human umbilical vein endothelial cells

IC : Immune checkpoints

ICI : Immune checkpoints inhibiteurs

ICP : Infected cell protein

IF : Immunofluorescence
IFN- γ : interféron-gamma
IL : Interleukine
MDSCs : Myeloid-Derived Suppressor Cells
MET : Microenvironnement tumoral
MMPs : Matrix metalloproteinases
MOI : Multiplicity of Infection
NK : Natural killer
NSCs : Neural stem cells
oHSV : Oncolytic Herpes Simplex Virus
oHSV-P2G : Oncolytic HSV armed with P2G
OPCs : Oligodendrocyte precursor cells
PAF : paraformaldéhyde
PAMPs : Pathogen-associated molecular patterns
PBS : Phosphate buffered saline
PKR : Protein kinase RNA-activated / protein kinase R
PLGF : Placenta growth factor
PP1 α : Protein phosphatase 1 alpha
RR : Ribonucléotide réductase
RT : Room temperature
RT-qPCR : Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
SDF1- α : Stromal cell-derived factor-1
SNC : Système nerveux central
SVZ : Subventricular zone
TAMMs : Tumor-Associated Macrophages and Microglia
TAP : Transporters associated with Antigen Processing
TCR : T cell receptor
TGF- β : Transforming Growth Factor β
Th : Lymphocytes T helpers ou auxiliaires
TMZ : Témozolomide
Treg : Lymphocytes T régulateurs
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptors
VZV : Varicella zoster virus

Table des matières

Chapitre 1	<i>Introduction</i>	1
1.1	Le glioblastome	1
1.1.1	La résistance aux traitements et les GSCs	2
1.2	Le microenvironnement tumoral du glioblastome.....	3
1.2.1	Les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral froid.....	4
1.2.2	Les immune checkpoints inhibiteurs	8
1.2.3	L'hétérogénéité du glioblastome	10
1.3	L'angiogenèse tumorale	11
1.3.1	Les différents types d'angiogenèse.....	11
1.3.2	L'hypoxie et les anomalies vasculaires	13
1.3.3	Les facteurs pro-angiogéniques	14
1.3.4	Les TAMMs dans l'angiogenèse	15
1.4	La voie CXCL12 / CXCR4	16
1.4.1	Généralités	16
1.4.2	CXCL12 / CXCR4 dans le microenvironnement tumoral.....	17
1.4.3	CXCL12 / CXCR4 et les GSCs	17
1.4.4	CXCL12 / CXCR4 dans l'angiogenèse.....	18
1.5	Les virus oncolytiques.....	19
1.5.1	Généralités	19
1.5.2	Virus Herpès Simplex de type 1 (HSV-1)	19
1.5.3	oHSV : Virus Herpès Simplex oncolytique	20
1.5.4	Armement de oHSV par CXCL12-P2G	24
Chapitre 2	<i>Données préliminaires et objectifs du mémoire</i>	26
2.1	Données préliminaires	26
2.2	Objectifs du mémoire	29
Chapitre 3	<i>Matériels et Méthodes</i>	30
3.1	Culture cellulaire	30

3.1.1	Passage et amplification des cellules	30
3.1.2	Milieux conditionnés	31
3.1.3	Milieux conditionnés pour les cocultures GB138 – HMC3	31
3.1.4	Tubulogenèse	31
3.2	Expériences <i>in vivo</i>	32
3.3	Immunofluorescence (IF)	32
3.3.1	Prise de vue au microscope Axioscan.....	33
3.3.2	Analyse d'images sur QuPATH.....	33
3.4	Extraction d'ARN et RT-qPCR	34
Chapitre 4	Résultats.....	35
4.1	Analyse par immunofluorescence de l'infiltration immunitaire et de la vascularisation dans le glioblastome	35
4.1.1	Effet de oHSV-P2G sur l'infiltration des cellules CD4+, CD8+ et Foxp3+ dans la tumeur	35
4.1.2	Impact de oHSV-P2G sur la vascularisation tumorale.....	37
4.1.3	Analyse par immunofluorescence de la morphologie des vaisseaux sanguins	38
4.2	Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes angiogéniques dans des modèles cellulaires de glioblastome et de microglie humaine	40
4.2.1	Effets de l'infection par oHSV-P2G sur l'expression des gènes angiogéniques par les cellules GB138.....	40
4.2.2	Effets des milieux conditionnés des cellules GB138 infectées par oHSV-P2G sur l'expression des gènes angiogéniques dans les cellules HMC3	42
4.3	Étude <i>in vitro</i> de la tubulogenèse endothéliale.....	43
4.3.1	Effet de CXCL12 et AMD3100 sur le nombre d'embranchements tubulaires	43
4.3.2	Influence des milieux conditionnés de GB138 sur les structures tubulaires.....	44
4.3.3	Impact des milieux conditionnés issus de cocultures GB138–HMC3 sur la formation de tubules	46
Chapitre 5	Discussion	48
5.1	oHSV-P2G remodèle l'immunité dans le microenvironnement du glioblastome en faveur d'un profil pro-inflammatoire.....	50
5.2	oHSV-P2G diminue la vascularisation tumorale <i>in vivo</i>	51

5.3	oHSV-P2G diminue la taille moyenne d'un vaisseau sanguin au sein de la tumeur.....	53
5.4	oHSV-P2G induit <i>in vitro</i> une diminution de l'expression de VEGFA dans les GB138.....	54
5.5	oHSV-P2G diminue la vascularisation tumorale <i>in vitro</i>	57
Chapitre 6	Conclusion et perspectives	61

Chapitre 1

Introduction

Ce mémoire porte sur l'impact d'un herpèsvirus oncolytique armé sur l'angiogenèse dans le contexte du glioblastome. Le glioblastome est une tumeur cérébrale particulièrement agressive, caractérisée par une prolifération rapide et une forte résistance aux traitements actuels. Ce cancer est fortement vascularisé et présente une angiogenèse rapide mais désorganisée. L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus est essentiel pour assurer l'approvisionnement des cellules cancéreuses en nutriments et en oxygène, et ainsi soutenir la croissance de la masse tumorale. Parmi les voies de signalisation contrôlant ce processus, la voie de signalisation CXCL12/CXCR4 est impliquée et intervient également dans de nombreux autres mécanismes favorisant la progression du glioblastome. Elle participe notamment à la migration et à la prolifération cellulaire, à l'immunosuppression, ainsi qu'à la reprogrammation cellulaire. Compte tenu de son rôle multifonctionnel, le ciblage de cette voie via une virothérapie oncolytique armée représente une approche innovante et prometteuse.

Au cours de cette introduction, les principales notions relatives au glioblastome, telles que son microenvironnement, l'angiogenèse et la voie CXCL12/CXCR4, seront abordées en détail. La notion de virus oncolytiques armé sera également introduite. L'ensemble de ces éléments permettront la compréhension du sujet, avant de présenter nos données préliminaires sur le sujet puis les objectifs de ce mémoire.

1.1 Le glioblastome

Le glioblastome (multiforme, GBM) est un gliome de grade 4, selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (**Figure 1.1**)¹⁻⁴. Les gliomes sont des tumeurs primaires qui se développent dans le cerveau et le système nerveux central (SNC)^{2,4}. Ils prennent généralement naissance à partir des cellules gliales ou des précurseurs neuronaux^{2,4,5}. Les gliomes peuvent être classés selon le type de cellules gliales à l'origine de la tumeur, mais aussi selon un grade représentant sa malignité^{1,2,4}. Ils correspondent à environ 60% de l'ensemble des tumeurs cérébrales, et le glioblastome représente environ la moitié des

tumeurs malignes du SNC, ce qui fait de lui le gliome le plus fréquent^{2-4,6}. Il s'agit d'un des cancers les plus agressifs et les plus invasifs. La maladie est plus fréquemment observée chez les hommes que chez les femmes et son incidence augmente avec l'âge (âge médian : 64 ans)^{3,5,7}. L'espérance de vie médiane d'une personne atteinte du GBM est de 15 mois post-diagnostic^{8,9}.

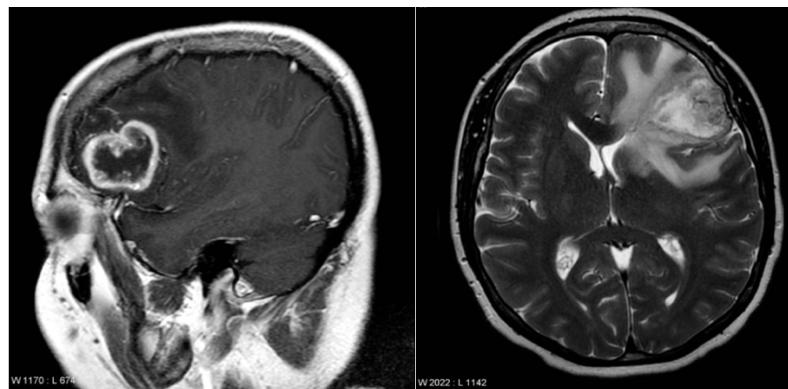


Figure 1.1 – Glioblastome de grade 4 (OMS). Images IRM sagittale (gauche) et axiale (droite) d'un glioblastome chez un patient adulte. (F. Gaillard, 2016)

L'origine cellulaire du GBM est encore fort débattue de nos jours. Deux hypothèses principales sont avancées : une dédifférenciation des astrocytes ou une origine impliquant les cellules souches neurales (NSCs, *Neural Stem Cells*) et/ou les précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs, *Oligodendrocyte Precursor Cells*)^{5,10-12}. La première théorie suggère que les astrocytes pourraient retrouver un caractère multipotent, favorisant ainsi la formation tumorale. La seconde met en avant la capacité des NSCs et des OPCs à proliférer et à se différencier, ce qui peut les rendre susceptibles d'évoluer en cellules cancéreuses^{10,13}. Des études ont en effet montré que les cellules du GBM présentent des caractéristiques morphologiques, des marqueurs de surface et un profil génétique similaires à ceux des cellules saines du SNC^{11,12}.

Le glioblastome se distingue par plusieurs caractéristiques, notamment une hypervascularisation, une hypoxie marquée (manque d'oxygène dans les tissus), une immunosuppression, une hétérogénéité intra- et extra- tumorale, ainsi qu'une invasion des tissus voisins et une prolifération cellulaire rapide. Ces processus contribuent à sa croissance agressive et à sa résistance aux traitements^{5,9,14}.

1.1.1 La résistance aux traitements et les GSCs

La résection chirurgicale ainsi que la radiothérapie et la chimiothérapie avec du temozolomide (TMZ), font partie des traitements standards pour les patients atteints de GBM^{5,9,15}. Cependant, le GBM est une maladie hautement infiltrante, caractérisée par la migration étendue des cellules cancéreuses dans le tissu neuronal environnant⁹. Il existe un groupe de cellules cancéreuses présentant des caractéristiques semblables aux cellules souches : les GSCs (*Glioblastoma Stem Cells*, cellules souches indifférenciées de glioblastome), également nommées GICs (*Glioblastoma Initiating Cells*)^{5,9,15}. Ces cellules ont la capacité de

migrer vers des niches hypoxiques qui peuvent être distantes de la tumeur primaire, telles que la zone sous-ventriculaire (SVZ, *subventricular zone*) des ventricules latéraux. En effet, des GSCs, en état de quiescence ou ayant une activité mitotique faible, y ont été retrouvées¹⁵⁻¹⁷. En migrant vers ces zones du cerveau, les GSCs ne peuvent être réséquées. Par ailleurs, elles présentent une résistance à la radiothérapie^{15,16}. En effet, les radiations permettent l'endommagement de l'ADN en formant des radicaux libres en présence d'oxygène. Or, dans les zones hypoxiques où résident les GSCs, cette production de radicaux est fortement limitée, les protégeant ainsi des effets des radiations^{9,16,18}. En conséquence, les GSCs résiduelles peuvent alors se différencier et régénérer une tumeur secondaire, souvent plus agressive qu'à l'origine^{5,9}.

Les thérapies standards sont également limitées par l'hétérogénéité de la tumeur (voir **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), la perméabilité sélective de la barrière hémato-encéphalique (BBB, *Blood Brain Barrier*) et l'immunosuppression du microenvironnement tumoral (MET). La perméabilité sélective de la barrière hémato-encéphalique, qui sert de barrière entre l'espace extracellulaire du SNC et la circulation sanguine, constitue un challenge supplémentaire aux traitements contre le GBM^{5,9}. Constituée de cellules endothéliales, d'astrocytes et de neurones, la BBB contrôle de manière sélective le passage des substances⁹. Par ailleurs, dans le contexte du GBM, la BBB est perturbée à certains endroits, suite à une malformation des vaisseaux sanguins, et la perméabilité y est accrue. Cependant, même si certains traitements arrivaient à passer la BBB, les pompes à efflux sont fortement augmentées au niveau des cellules cancéreuses, limitant dès lors, la concentration au sein de la tumeur des composés utilisés^{5,19}.

1.2 Le microenvironnement tumoral du glioblastome

Une tumeur se développe dans un milieu particulier, appelé le microenvironnement tumoral (MET), qui lui permet de progresser et de résister à divers traitements, comme abordé précédemment²⁰. Ce microenvironnement est constitué de divers types cellulaires tels que les cellules immunitaires, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, et les cellules stromales du cerveau (astrocytes, neurones)^{20,21}. Ces différents types cellulaires interagissent avec la matrice extracellulaire ou entre elles, par contact direct ou via des molécules de signalisation sécrétées, ce qui crée un environnement dynamique et favorable à la progression tumorale (**Figure 1.2**). Parmi ces molécules, les cytokines et les chimiokines ont un rôle particulièrement important et permettent la communication entre la tumeur et les cellules environnantes²⁰.

Les différentes interactions au sein du MET favorisent les caractéristiques globales du GBM : croissance et prolifération cellulaire importante, invasion, immunsuppression, hypoxie, angiogenèse, et résistance aux traitements^{14,20}.

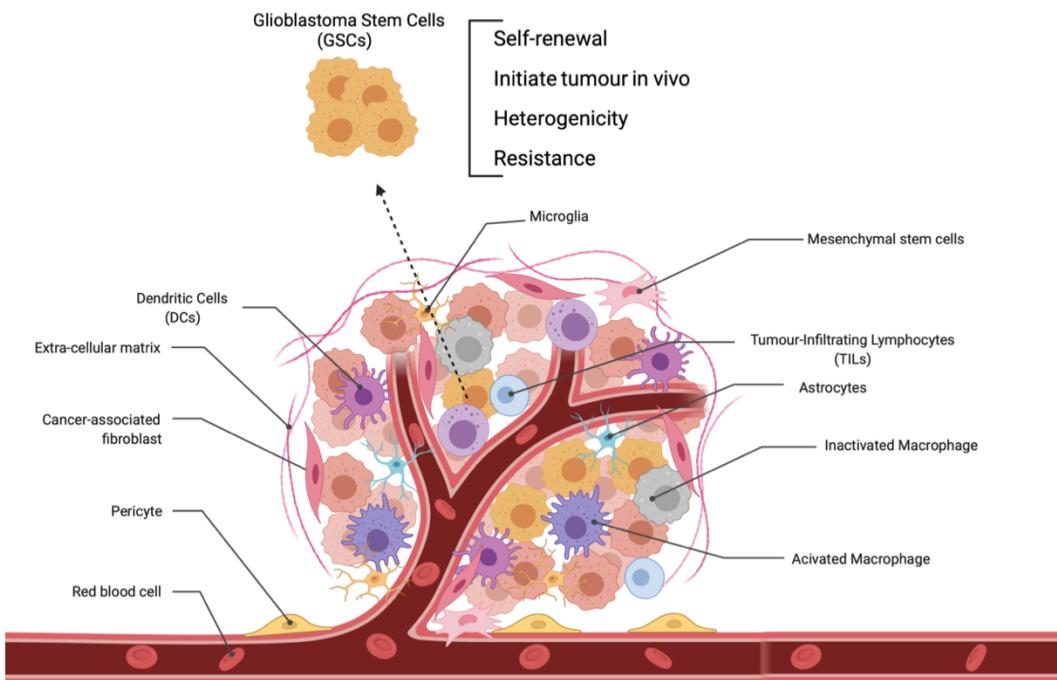


Figure 1.2 – Microenvironnement tumoral et les différentes cellules qui le compose. Le microenvironnement tumoral est composé de cellules de la lignée myéloïde et de la lignée lymphoïde. Il est également composé d'autres types cellulaires, par exemple des cellules souches de glioblastome (GSCs). Ces cellules ont la capacité de se renouveler, de réinitier une tumeur et donc d'induire une résistance aux thérapies standards. Figure réalisée avec BioRender par Judith Sanchez Gil dans le cadre de sa thèse.

1.2.1 Les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral froid

Le microenvironnement tumoral du glioblastome présente aussi bien des cellules immunitaires de la lignée myéloïde (cellules dendritiques, macrophages, microglie, cellules myéloïdes suppressives (MDSCs, *Myeloid-Derived Suppressor Cells*)) que de la lignée lymphoïde (lymphocytes, cellules NK)^{20,21}.

Cependant, le glioblastome est défini comme étant une tumeur froide, c'est-à-dire immunosuppressive^{5,14,22}. Les tumeurs froides sont caractérisées par un faible infiltrat de cellules immunitaires ayant une activité antitumorale. En effet, ce MET est hautement constitué de cellules immunosuppressives, en particulier de TAMMs *M2-like*, de Treg CD4+ et de MDSCs^{5,14,21-24}.

Les macrophages et la microglie associés à la tumeur (TAMMs)

Les glioblastomes sont fortement infiltrés par les macrophages et la microglie, qui représentent jusqu'à 30 % de la tumeur et constituent ainsi les cellules immunitaires les plus abondantes. On parle de macrophages et microglie associés à la tumeur ou TAMMs (*Tumor-Associated Macrophages and Microglia*)^{10,20,21,24,25}.

Les macrophages sont des cellules myéloïdes intervenant dans la réponse immunitaire innée²⁶. Ils ont trois fonctions principales qui sont la phagocytose, la présentation d'antigènes exogènes via le CMH-2

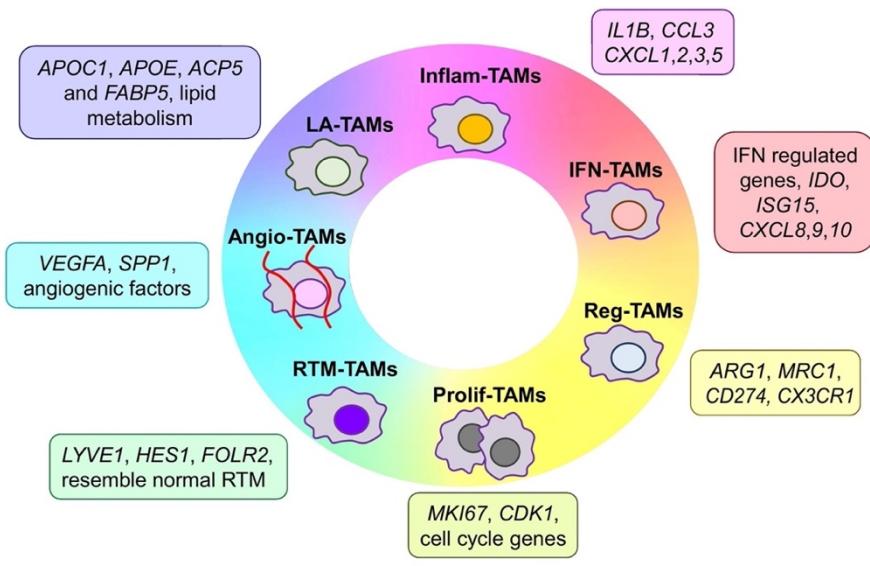
et le recrutement d'autres cellules immunitaires par la sécrétion de cytokines. Ces trois fonctions sont importantes pour la bonne activation de la réponse immunitaire adaptative²⁶. Par ailleurs, les macrophages jouent également un rôle important dans l'angiogenèse (voir 1.3)^{21,25,26}.

Les cellules microgliales, qui constituent la microglie, sont des macrophages résidents du système nerveux central^{27,28}. Elles résident dans le parenchyme cérébral et régulent le microenvironnement du SNC. En effet, la microglie est nécessaire au développement du cerveau et au maintien de son homéostasie²⁷. En outre, elle est également présente au niveau de la SVZ où elle joue un rôle crucial dans la neurogenèse en régulant notamment la différenciation et la migration des cellules souches neurales²⁸.

Les TAMMs constituent une population cellulaire hautement dynamique et peuvent sécréter divers facteurs et cytokines favorisant différentes fonctions biologiques du MET telles que la prolifération, l'angiogenèse, ou encore l'immunosuppression^{20,21}. Par ailleurs, ces cellules myéloïdes sont significativement modulées par le microenvironnement qui les entoure, constituant un groupe hétérogène de cellules^{20,21}. Historiquement, les macrophages étaient répartis en trois phénotypes : un phénotype naïf et deux phénotypes activés entre lesquels ils peuvent varier selon les signaux du microenvironnement. Les TAMMs naïfs ou indifférenciés, nommé *M0-like*, sont capables de polariser soit vers un phénotype pro-inflammatoire, dit *M1-like*, soit vers un phénotype anti-inflammatoire, dit *M2-like*, en fonction des signaux reçus²⁶. Ces deux profils, *M1-* et *M2-like*, se distinguent par leurs fonctions, mais aussi par leurs sécrétions et les marqueurs exprimés à leur surface^{24,26}. Les TAMMs *M1-like* sont activés grâce à des cytokines Th1, en particulier l'IFN- γ ^{24-26,29}. Ces cellules M1 sécrètent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires qui médient la réponse des cellules Th1^{21,24,25}. Les TAMMs *M2-like*, quant à eux, sont notamment activés par de hautes concentrations en IL-4, IL-10 et IL-13, sécrètent des cytokines telles que le TGF- β et IL-10 et participent donc à un environnement pro-tumorale^{21,24-26}. Ces modulateurs permettent d'une part l'inhibition des cellules présentatrices d'antigène (APCs, *Antigen presenting cells*) et des cellules T, et d'autre part l'activation des cellules Treg et le maintien de la polarisation des TAMMs dans un profil M2^{20,21,24,30,31}. Ces TAMMs *M2-like* produisent également d'autres protéines pro-tumorales comme le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), un activateur important de l'angiogenèse (voir 1.3), ou encore la chémokine CXCL12 (voir 1.4)^{25,26}. De plus, les TAMMs *M2-like* soutiennent la croissance et l'expansion du glioblastome, en établissant un mécanisme de feedback positif qui renforce la progression tumorale¹⁴. Par exemple, les TAMMs *M2-like* sont induits entre autres par la production d'IL-10, et vont ensuite produire des cytokines anti-inflammatoires, dont IL-10^{24,25,31}.

Bien que les profils *M1-* et *M2-like* des macrophages soient considérés comme opposés, ils représentent en réalité les extrémités d'un spectre d'activation^{21,26}. Ces cellules possèdent en effet une grande plasticité et peuvent adopter des états intermédiaires en réponse aux signaux de leur

microenvironnement, leur permettant de moduler leurs fonctions pro- et anti-inflammatoires²¹. De nos jours, ce modèle M1/M2 est remis en question au profit d'une classification plus nuancée identifiant au moins sept sous-phénotypes de TAMMs, présents dans la majorité des cancers : les TAMMs stimulés par l'interféron (IFN-TAMMs), les TAMMs immuno-régulateurs (Reg-TAMMs), les TAMMs riches en cytokines inflammatoires (Inflam-TAMMs), les TAMMs associés aux lipides (LA-TAMMs), les TAMMs pro-angiogéniques (Angio-TAMMs), les TAMMs de type résident tissulaire (RTM-TAMMs) et les TAMMs en prolifération (Prolif-TAMMs) (**Figure 1.3**). Contrairement aux modèles précédents, un même sous-type peut remplir plusieurs fonctions, et une même fonction peut être assurée par différents sous-types. Bien que cette classification soit plus précise, elle conserve certaines caractéristiques fonctionnelles des profils M1 et M2, les IFN-TAMMs se rapprochant des macrophages de type M1, tandis que les Reg-TAMMs présentent des similitudes avec le profil M2³².



Trends in Immunology

Figure 1.3 – Les 7 sous-phénotypes des TAMMs définis en fonction de leurs caractéristiques moléculaires observées dans divers types de cancers humains. Ces sous-phénotypes reprennent les TAMMs primés par l'interféron (IFN-TAMMs), les TAMMs à fonction immuno-régulatrice (Reg-TAMMs), les TAMMs riches en cytokines inflammatoires (Inflam-TAMMs), les TAMMs associés aux lipides (LA-TAMMs), les TAMMs pro-angiogéniques (Angio-TAMMs), les TAMMs de type résident tissulaire (RTM-TAMMs) et les TAMMs en prolifération (Prolif-TAMMs). Le spectre de couleurs reflète une diversité continue, avec des gènes marqueurs partagés et des sous-types intermédiaires. Figure adaptée de Ma et al. (2022)³².

Les lymphocytes T : les CD4+ et les CD8+

Les lymphocytes T permettent l'établissement, le maintien et la mémoire du système immunitaire au niveau de la réponse adaptative^{33,34}. L'immunité adaptative est lente (quelques jours voire semaines après l'infection), mais spécifique et offre ainsi une protection à long terme contre les agents pathogènes rencontrés. Grâce à leur TCR (*T Cell Receptor*), celles-ci sont capables de reconnaître divers antigènes provenant de pathogènes ou de tumeur^{33,34}. Ces antigènes sont présentés via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ou MHC, *Major Histocompatibility Complex*) aux lymphocytes T qui sont alors activés³⁴. Une fois actives, les cellules T prolifèrent et se différencient en sous-types fonctionnels distincts.

Par ailleurs, elles sécrètent des cytokines, en particulier des interleukines (IL), qui amplifient la réponse immunitaire et orientent la différenciation des cellules immunitaires^{33,35}. Par conséquent, les lymphocytes T sont essentiels à la réponse immunitaire antitumorale²³. Certaines cellules T différencieront deviennent des cellules T mémoires qui permettront une réaction rapide et efficace lors d'une réinfection par le même antigène^{23,33,34}.

Les lymphocytes sont divisés en plusieurs sous-catégories en fonction de leur fonction³⁴. Les **cellules T CD8+ cytotoxiques** sont les plus présentes au sein du microenvironnement tumoral²¹. Elles sécrètent diverses cytokines jouant un rôle dans la réponse immunitaire et permettent la mort des cellules cancéreuses ou des cellules infectées par un virus^{23,34}. La présence de ces cellules a donc un impact négatif considérable sur le développement tumoral. C'est pourquoi, en immunothérapie, les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques constituent les principales cellules immunitaires utilisées pour cibler et éliminer les cellules cancéreuses. Cependant, la plupart des cellules CD8+ infiltrées dans le GBM sont épuisées et non-fonctionnelles^{21,23,34,36}.

Les lymphocytes T CD4+ sont également présents dans le MET. Ils se répartissent en deux catégories : les cellules T auxiliaires, également appelées *T helper* (Th), et les cellules T régulatrices (Treg). Les **T helper CD4+** forment un groupe diversifié de cellules et sont activées par la reconnaissance de peptides étrangers présentés par les molécules du CMH de type II exprimées par les APCs^{23,34}. En fonction des cytokines qu'ils produisent, les Th sont polarisés en sous-populations dont les principales sont Th1 et Th2. Les Th1, qui produisent la cytokine pro-inflammatoire IFN- γ (interféron-gamma), sont principalement impliquées dans la protection de l'hôte contre les bactéries et les virus intracellulaires³⁴. L'IFN- γ est connu pour polariser les macrophages sous leur phénotype pro-inflammatoire²⁹. Par ailleurs, les cellules Th1 favorisent un environnement antitumoral en soutenant les fonctions effectrices des autres cellules immunitaires, notamment les CD8+³⁴. En effet, la sécrétion des cytokines IFN- γ et IL-2 participe à la prolifération, la survie et les fonctions cytolytiques des cellules CD8+, mais aussi des cellules NK³⁴.

Les cellules Th2 prennent part à l'immunité humorale et sont responsables de la défense contre les infections parasitaires (notamment les helminthes). Ils aident également à la régénération des tissus, et contribuent à l'inflammation chronique comme l'asthme et l'allergie³⁴. Les cytokines sécrétées par ce type cellulaire sont les IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13, qui présentent des effets aussi bien anti- que pro-tumoraux^{23,34}. Dans le MET du glioblastome, le dysfonctionnement des Th et le déséquilibre du ratio Th1/Th2 promeuvent le développement du cancer²³.

En plus de ces 2 sous-types de Th, il existe également les lymphocytes Th17. Ceux-ci contribuent à la protection contre les pathogènes extracellulaires, notamment au niveau des tissus muqueux, et contre les maladies auto-immunes et les inflammations chroniques^{34,37}. Ils sont principalement caractérisés par l'expression de l'interleukine IL-17, dont le rôle complexe est ambigu, présentant à la fois des effets pro- et

anti-tumoraux, selon le contexte tumoral^{34,35,37}. Par exemple, dans certains cancers, l'IL-17 peut renforcer la réponse immunitaire antitumorale en stimulant le recrutement de cellules cytotoxiques. Même si les Th-17 produisent la plus grande quantité de IL-17, cette interleukine peut également être produite par les macrophages, les CD8+, les cellules NK, et les neutrophiles^{34,35,37}. Au niveau du GBM, l'IL-17 est un régulateur important de la prolifération et la migration des cellules du GBM³⁵. En effet, la tumorigenèse, l'angiogenèse et la récidive du GBM sont en partie soutenues par l'IL-17, qui active des voies de signalisation pro-oncogéniques et favorise la prolifération et l'auto-renouvellement des GSC³⁵.

Comme leur nom l'indique, **les lymphocytes T régulateurs CD4+** sont des régulateurs de l'immunité. Ils permettent le maintien de la tolérance immunitaire en supprimant les réponses antigéniques spécifiques des cellules T^{23,36}. Ces lymphocytes sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3+^{33,36}. Ces cellules sont les lymphocytes majoritaires dans le GBM et aident au maintien du microenvironnement froid en étant des cellules immuno-suppressives. En effet, il a été démontré que les cellules cancéreuses et des facteurs indirects comme HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor 1 α*) permettent l'expression et l'infiltration des Treg dans le glioblastome. Là-bas, les Treg sécrètent des modulateurs de l'immunité pro-tumoraux contribuant au caractère immuno-suppressif du MET^{23,36}. Ces facteurs immuno-supresseurs sont notamment IL-10 et TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) qui limitent la production d'IFN- γ ^{23,36}. Comme dit précédemment, ces deux cytokines sont connues pour diriger les cellules résidentes et les cellules immunitaires infiltrantes, telles que les TAMMs, vers un phénotype immuno-suppressif. Ensemble, ils collaborent donc à l'inhibition de l'activité des autres lymphocytes, des cellules dendritiques et des APCs. Par exemple, les cellules T CD8+ deviennent épuisées ou dysfonctionnelles suite à la libération de ces facteurs par les Treg, et la faible présentation des antigènes tumoraux entraînent une mauvaise réponse immunitaire^{5,23,30}.

Par conséquent, l'établissement de ce microenvironnement tumoral immuno-supresseur, notamment par les Treg et les TAMMs *M2-like*, est la raison pour laquelle le bon fonctionnement des immunothérapies est généralement compromis^{14,30,38}.

1.2.2 Les immune checkpoints inhibiteurs

Lorsque les cellules présentatrices d'antigènes (APC) exposent un antigène via le CMH aux lymphocytes T pour les activer, cette activation est amplifiée par des molécules de costimulation, principalement grâce à l'interaction du récepteur CD28, exprimé constitutivement à la surface des lymphocytes T, avec les ligands CD80/CD86 exprimés par les APC^{39,40}. Cependant, ces molécules, qui renforcent le signal d'activation et sont également appelées *immune checkpoints* (IC, points de contrôle immunitaire), ne sont pas toujours co-stimulatrices. Elles peuvent en effet exercer une fonction co-

inhibitrice. Les *immune checkpoints* sont des régulateurs essentiels à l'activité des lymphocytes T assurant un équilibre entre activation immunitaire et tolérance immunitaire^{39,41}. Dans les cancers, la plupart des *immune checkpoints* exprimés par les cellules tumorales ou immunitaires sont co-inhibiteurs et favorisent le caractère froid du MET en perturbant la réponse antitumorale des cellules T^{39,41}. Parmi les *immune checkpoints* inhibiteurs (ICI), PD-1 et CTLA-4 sont les plus connus.

CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*) est un ICI exprimé à la surface des lymphocytes T activés. Lorsqu'il est exprimé, cet *immune checkpoint* inhibiteur entre en compétition avec CD28 en se liant aux ligands CD80/CD86, l'affinité de ceux-ci pour CTLA-4 étant supérieure à celle de CD28. De la sorte, le signal co-stimulateur est bloqué et l'activation des lymphocytes T est empêchée. De plus, des signaux inhibiteurs sont envoyés à la cellule T^{39,41,42}. Dans le MET du glioblastome, CTLA-4 est surexprimé à la surface des cellules T CD4+ et T CD8+, compromettant ainsi leur activation ce qui contribue à l'immunosuppression du GBM. (**Figure 1.4**)

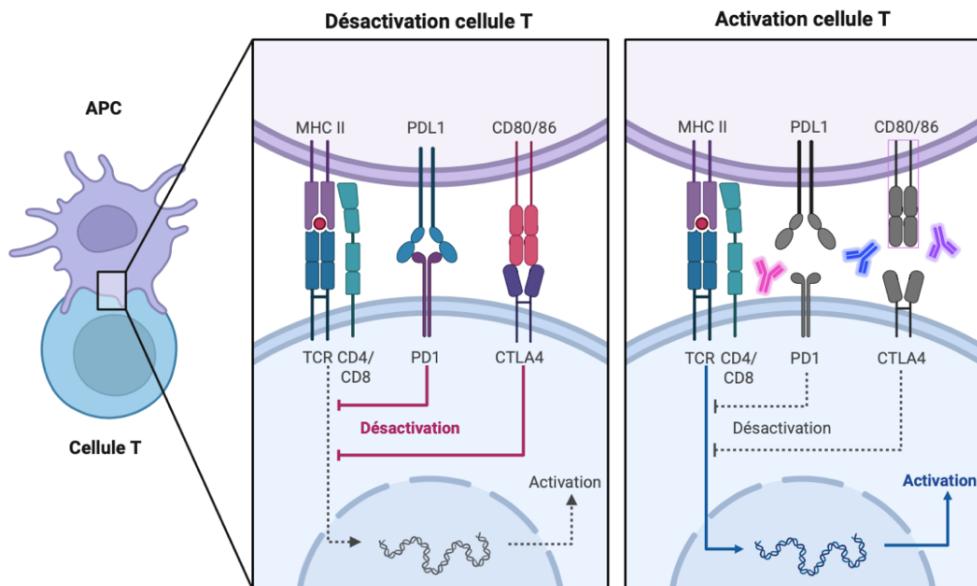


Figure 1.4 – Effet des immune checkpoints inhibiteurs sur l'activation des lymphocytes T et restauration de leur activité par inhibition ciblée. La figure illustre les deux états fonctionnels des lymphocytes T en interaction avec une cellule présentatrice d'antigènes (APC). À gauche, l'activation des cellules T est inhibée par l'engagement des récepteurs PD-1 et CTLA-4 avec leurs ligands respectifs (PDL1 et CD80/CD86). À droite, le blocage de ces interactions par des anticorps inhibiteurs permet de restaurer l'activation des cellules T. Image prise de BioRender.

PD-1 (*Programmed cell Death protein-1*) est un récepteur inhibiteur exprimé à la surface des lymphocytes T (immatures ou activés), des monocytes, des cellules dendritiques, ainsi que des cellules cancéreuses. PD-1 empêche l'activation des lymphocytes T en interagissant avec son ligand PDL-1 (*Programmed Death-Ligand 1*) (**Figure 1.4**)³⁹⁻⁴¹. Dans le contexte du glioblastome, PDL-1 est exprimé non seulement par les APC, mais aussi par les cellules cancéreuses, les péricytes, les cellules endothéliales ou encore les fibroblastes^{40,42}. L'activation de la voie PD-1/PDL-1 entraîne un blocage de la voie de signalisation liée au récepteur TCR, mais peut également amener à l'épuisement, l'anergie voie l'apoptose de la cellule T^{39,42}. Cette voie permet également l'inactivation de PTEN, un gène suppresseur de tumeur

connu pour inhiber la voie PI3K/AKT. La voie PI3K-AKT est hyperactivée dans le glioblastome et induit l'hypoxie, la prolifération, la migration et la survie des cellules cancéreuses^{39,42}. Par ailleurs, l'*immune checkpoints* inhibiteur PD-1 est également exprimé par les Treg. Cependant, son action diffère et permet la prolifération de ces cellules régulatrices^{39,41}. Dans le GBM, les Treg sont très abondantes et suppriment la réponse immunitaire ce qui favorise le caractère immunosuppressif du glioblastome. Ainsi, l'interaction PD-1/PDL-1 participe activement à l'évasion immunitaire du glioblastome en inhibant la réponse des lymphocytes T, en favorisant l'expansion des Treg et en contribuant à l'activation de voies pro-tumorales comme PI3K/AKT. De plus, l'expression élevée de PDL-1 est positivement corrélée avec l'agressivité du glioblastome⁴².

Par conséquent, les immune checkpoints tels que CTLA-4 et PD-1/PDL-1 constituent des cibles thérapeutiques clés dans le glioblastome (**Figure 1.4**). Cependant, leurs inhibiteurs ont montré une efficacité limitée dans ce cancer, en raison d'une forte immunosuppression locale et d'une hétérogénéité tumorale marquée^{39,42}.

1.2.3 L'hétérogénéité du glioblastome

Le GBM possède une hétérogénéité aussi bien intra-tumorale (diversité au sein d'une même tumeur) que inter-tumorale (diversité entre les patients)^{5,24,43}. Cette caractéristique pose un réel problème au niveau du diagnostic et des traitements.

D'une part, le GBM présente une hétérogénéité intra-tumorale. En effet, le GBM présente une grande variabilité cellulaire comme présenté ci-dessus. Par exemple, le GBM contient des cellules tumorales différenciées, mais aussi les GSCs qui sont plus résistantes aux traitements⁴³. En outre, cette hétérogénéité est aussi due à la grande plasticité des TAMMs²⁴. Effectivement, ces cellules peuvent changer de phénotypes sous la pression du microenvironnement tumoral. De plus, l'angiogenèse, l'hypoxie et l'inflammation jouent des rôles dans l'hétérogénéité intra-tumorale du GBM. Les zones vascularisées et hypoxiques au sein de la tumeur ne sont pas homogènes, ce qui peut influencer la réponse aux thérapies. Par exemple, les zones moins vascularisées peuvent être plus hypoxiques, créant un environnement anaérobique qui favorise notamment la résistance à la radiothérapie¹⁸.

D'autre part, le GBM présente une grande variabilité d'un patient à l'autre. Cette hétérogénéité s'explique par les différences individuelles entre les patients (âge, antécédents, mutations héréditaires, réponse immunitaire, etc.), mais aussi par l'existence de plusieurs sous-types moléculaires. *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) a classé les glioblastomes en quatre clusters selon leurs marqueurs génétiques et épigénétiques : classique, mésenchymateux, pro-neural et neural^{5,44}. Ces sous-types influencent la réponse

aux traitements, ainsi que la progression et l'agressivité de la maladie. Par ailleurs, des études récentes ont montré que ces sous-groupes de GBM ne sont pas fixes et peuvent varier dans le temps et l'espace au sein d'une même tumeur, soulignant ainsi son hétérogénéité intra-tumorale⁵.

1.3 L'angiogenèse tumorale

Le GBM est une tumeur hypervascularisée, caractérisée par une angiogenèse intense et désorganisée, souvent responsable d'une nécrose centrale^{5,45}. Cette caractéristique est essentielle à sa croissance rapide et à son agressivité.

L'angiogenèse est un processus lors duquel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir de vaisseaux préexistants⁴⁶⁻⁴⁸. Généralement, elle est active lors de l'embryogenèse puis joue un rôle dans la cicatrisation chez l'adulte. Ce phénomène est donc important pour les fonctions physiologiques, mais il contribue également à la progression de certaines maladies, comme le cancer⁴⁷. En effet, il a été démontré que les tumeurs et les métastases nécessitent constamment la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin de recevoir les ressources nécessaires, en particulier les nutriments et l'oxygène, mais aussi afin d'éliminer les déchets métaboliques produits^{46,47}. Sans ça, les cellules tumorales ayant un métabolisme fortement actif seraient limitées et la tumeur ne pourrait pas dépasser un volume de 1-2mm³^{47,49}. Avant d'entamer sa croissance et de dépasser un tel volume, la tumeur est dans un état dit de dormance, et son angiogenèse est équilibrée par des facteurs pro- et anti-angiogéniques. Cependant, lorsque la balance entre les deux types de facteurs bascule vers une surexpression d'effecteurs pro-angiogéniques, un 'switch angiogénique' a lieu. Ceci correspond à la fin de l'état de dormance de la tumeur qui crée alors un réseau vasculaire lui permettant de croître⁴⁶.

1.3.1 Les différents types d'angiogenèse

L'angiogenèse la plus étudiée est **l'angiogenèse par bourgeonnement** qui est induite par la liaison de facteurs de croissance pro-angiogéniques spécifiques à leur récepteur. Ces derniers se trouvent à la surface des cellules endothéliales qui deviennent alors actives. De plus, la liaison des facteurs pro-angiogéniques entraîne la dégradation locale de la membrane basale et de la matrice extracellulaire par des protéases actives. Ces cellules endothéliales peuvent alors migrer et proliférer à travers le stroma environnant, et ensuite adhérer les unes aux autres en formant un lumen en leur centre. Elles créent ainsi un vaisseau sanguin immature qui est finalement stabilisé par l'association de cellules murales (péryctes et cellules musculaires lisses vasculaires) et la régénération de la matrice extracellulaire^{47,48}.

En plus de l'angiogenèse par bourgeonnement, d'autres mécanismes de néovascularisation existent au sein des tumeurs^{45,47}. Premièrement, **l'angiogenèse par intussusception** se distingue de l'angiogenèse classique par une non-prolifération des cellules endothéliales. Deux cellules endothéliales opposées

provenant d'un même vaisseau sanguin vont être réorganisées, rentrer en contact et former un pont transluminal. Par ce processus, le vaisseau préexistant se divise en deux nouveaux vaisseaux⁴⁷. Deuxièmement, des **cellules endothéliales progénitrices** (EPCs, *Endothelial Progenitor Cells*) circulant dans le sang peuvent être recrutées et initiées la formation de nouveau vaisseaux sanguins. Lors du développement tumoral, des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance sont sécrétés pour permettre le recrutement des EPCs. Par exemple, la chimiokine CXCL12 entraîne la mobilisation des EPCs en se liant au récepteur CXCR4 exprimé à la surface de ces cellules. Les EPCs sont capables de se différencier en un phénotype endothérial et donc acquérir des fonctions structurales liées à la vascularisation, mais aussi de sécréter des facteurs pro-angiogéniques dans un contexte tumoral⁴⁷. Troisièmement, certaines cellules tumorales peuvent créer des structures en tubes grâce à une dédifférenciation vers un phénotype endothérial. Ce phénomène est appelé **mimétisme vasculaire**^{47,49}. Ces tubes jouent un rôle semblable aux vaisseaux sanguins traditionnels, puisque des globules rouges et d'autres substances y sont retrouvés. De plus en plus d'études démontrent que ce mimétisme vasculaire est en lien direct avec l'hypoxie (diminution de la quantité d'oxygène). Celle-ci et en particulier le facteur de transcription HIF-1 α , activé en réponse à des conditions hypoxiques, induisent la dédifférenciation des cellules de GBM qui acquièrent ensuite un profil endothérial suite à la transition épithélio-endothéliale (une sous-catégorie de la transition épithélio-mésenchymateuse). Les cellules tumorales réorganisent la matrice extracellulaire de manière à permettre la migration puis le remaniement des cellules en tubes. Ces derniers sont étendus vers le réseau vasculaire pour y extorquer les globules rouges et autres nutriments⁴⁹. Dernièrement, la **cooptation vasculaire (vessel co-option)** est un processus non-angiogénique alternatif permettant à une masse tumorale avasculaire de croître dans un environnement riche en vaisseaux sanguins⁴⁷. Ce mécanisme correspond au déplacement des cellules cancéreuses le long des vaisseaux sanguins préexistants, leur offrant ainsi un approvisionnement en nutriments^{50,51}. La cooptation vasculaire est notamment retrouvée dans le glioblastome^{45,50,51}. Effectivement, ce cancer se trouve dans une région hautement vascularisée et n'a donc pas forcément besoin d'induire l'angiogenèse pour s'alimenter⁵⁰. Il suffit de 3 à 6 cellules de GBM pour combler l'espace entre deux microvaisseaux, ce qui leur permet de bénéficier d'une vascularisation bien perfusée. De plus, ces cellules peuvent exploiter ce contact pour envahir les tissus du SNC. C'est pourquoi la cooptation vasculaire est également appelée migration périvasculaire⁵⁰. Par ailleurs, ce processus explique la résistance au thérapie anti-angiogéniques^{50,51}. Étant donné que la cooptation vasculaire n'est pas influencée par les facteurs angiogéniques, l'inhibition de l'angiogenèse favorise ce mécanisme^{45,50}. Ce phénomène a également été observé dans des tumeurs initialement angiogéniques⁵⁰. Inversement, une inhibition de la cooptation vasculaire provoque l'angiogenèse en produisant des facteurs pro-angiogéniques. Par conséquent, grâce à sa plasticité, le GBM est capable de switcher entre les deux mécanismes pour répondre à ses besoins métaboliques⁵⁰. Outre cela, les autres mécanismes de néovascularisation décrits ci-dessus peuvent également soutenir la perte

éventuelle de l'angiogenèse^{50,51}. Notamment le mimétisme vasculaire est de plus en plus décrit comme une cause supplémentaire de la résistance aux thérapies anti-angiogéniques^{48,49}. (Figure 1.5)

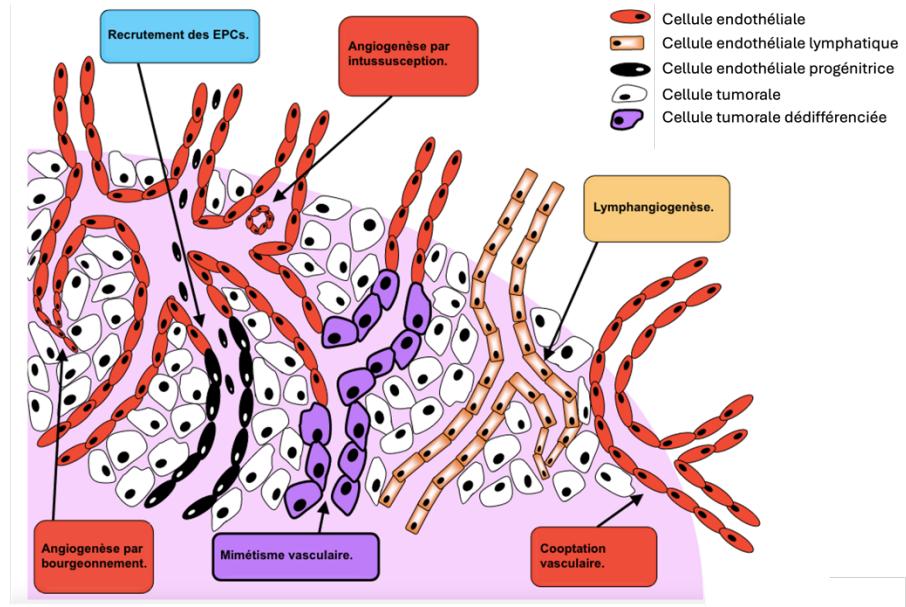


Figure 1.5 – Les différents types d'angiogenèse tumorale. Ce schéma illustre les six types de vascularisation dans les tumeurs solides : l'angiogenèse par bourgeonnement, l'angiogenèse par intussusception, le recrutement de cellules progénitrices endothéliales (EPCs), la cooptation vasculaire, la lymphangiogenèse (non abordé) et le mimétisme vasculaire. Figure adaptée de Hillen et Griffioen. (2007)⁴⁷.

1.3.2 L'hypoxie et les anomalies vasculaires

L'hypoxie est une condition caractérisée par une diminution de la quantité d'oxygène nécessaire au bon fonctionnement d'un organisme ou d'un tissu⁵². Étant donné que les cancers sont en croissance continue, ce phénomène est fortement présent dans ceux-ci^{5,52,53}.

De tous les organes, le cerveau est celui qui est le plus oxygéné, consommant jusqu'à 20% de l'oxygène du corps. Cependant, il a été montré que les tumeurs cérébrales sont hypoxiques en comparaison aux autres tissus normaux du cerveau. En effet, le cœur du GBM contient environ 1,5% d'O₂ et les zones péri-tumorales 2,5% d'O₂, faisant du GBM une tumeur hypoxique⁵³. Comme abordé précédemment, la radiation qui est une thérapie couramment utilisée, ne peut pas être efficace dans ce type de tumeur puisque la formation de radicaux libres endommageant l'ADN est impossible^{16,18,53}. De plus, les GSCs sont localisées dans des zones hypoxiques ou périnécrotiques. Ces tissus pauvres en oxygène permettent leur préservation, leur tumorigénèse et leur capacité d'auto-renouvellement^{5,15}.

En condition d'hypoxie, les cellules tumorales sont amenées à être reprogrammées⁵³. Le facteur de transcription HIF-1 α (*Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha*), essentiel lors d'une réduction de l'oxygène, active plusieurs voies de signalisation^{53,54}. Il régule des processus importants dans la progression du GBM tels que la migration et la prolifération cellulaires, la transition épithélio-mésenchymateuse et le recrutement

de cellules inflammatoires⁵². Ce facteur est notamment un puissant inducteur de la néoangiogenèse par l'activation du VEGF⁵⁴. Cependant, cette angiogenèse tumorale est généralement dysfonctionnelle ce qui amène souvent à une malformation des vaisseaux sanguins qui sont hautement perméables, désorganisés et sinueux. Leur diamètre s'avère plus grand, et leur membrane basale plus fine. Leur lumen et leurs embranchements sont irréguliers. Le recouvrement des vaisseaux par des péricytes est réduit et la pression interstitielle y est élevée^{26,46,48,52,53}. Ces anomalies créent des zones nécrotiques (morts tissulaire et cellulaire prématuées) ou ischémiques (manque d'irrigation sanguine) à l'intérieur de la tumeur. Effectivement, l'acheminement des nutriments, de l'oxygène, etc. est stoppé et de nombreuses étendues de tissus ne sont pas irriguées. L'ischémie induit ainsi l'hypoxie et active indirectement HIF-1 α ce qui amène à la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques et donc à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins^{46,48}.

1.3.3 Les facteurs pro-angiogéniques

De nombreux facteurs sont communément connus pour être impliqués dans l'angiogenèse du GBM : VEGF, bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), métalloprotéases matricielles (MMPs, *Matrix Metalloproteinases*), Ang (*Angiopoïétines*), HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), TGF- β , EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*)⁴⁸. Parmi les facteurs de croissance enclenchant l'angiogenèse, le VEGF est le plus connu. Il s'agit d'une glycoprotéine homodimérique dont la famille contient cinq membres : VEGF-A, -B, -C, -D et PLGF (*Placenta Growth Factor*)^{46,48,55,56}. Ces molécules peuvent se lier à trois récepteurs tyrosine-kinase différents : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptors*)^{48,55,56}. VEGFR-1 est essentiel pour le développement des cellules hématopoïétiques, VEGFR-2 l'est pour le développement des cellules endothéliales vasculaires, tandis que VEGFR-3 concerne le développement des cellules endothéliales lymphatiques⁵⁵. Au niveau des cellules endothéliales, le VEGF-A joue un rôle important tant dans l'angiogenèse physiologique que dans l'angiogenèse pathologique^{56,57}. Pour ce faire, VEGF-A lie et active VEGFR-2, ce qui génère un signal pro-angiogénique. En effet, le récepteur dimérisé suite à la liaison du ligand, déclenchant une transphosphorylation de ses domaines tyrosines kinases, et donc la transduction du signal^{46,55-57}. Il est internalisé par endocytose dans des vésicules qui fusionnent ensuite avec les endosomes précoce. Les tyrosines phosphorylées recrutent des messagers secondaires qui activent des voies de signalisation via lesquelles l'angiogenèse est *in fine* enclenchée⁵⁶.

Même si le VEGF est le facteur angiogénique le plus étudié, il n'agit pas seul. En effet, pour initier la formation des nouveaux vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales doivent être capables d'envahir et de migrer au sein du tissu. Parmi les acteurs essentiels au remodelage vasculaire, les métalloprotéinases matricielles (MMPs) jouent un rôle important en dégradant localement la matrice extracellulaire entourant les cellules endothéliales^{48,58}. La famille des MMPs correspond à des endopeptidases dépendantes du zinc.

Par ailleurs, en dégradant la matrice extracellulaire, les MMPs permettent le relargage de facteurs de croissance qui activent et stimulent la prolifération des péricytes⁴⁸. Par exemple, la forme soluble du VEGF-A est associée à la matrice extracellulaire et peut ainsi être délivrée de cette manière⁵⁹.

L'angiogenèse est fortement régulée par des facteurs pro- et anti-angiogéniques qui sont eux-mêmes régulés. La cytokine multifonctionnelle TGF-β est connue pour réguler diverses fonctions tumorales telles que l'angiogenèse, la prolifération, la différenciation, etc. Pour y parvenir, elle se lie à ses récepteurs, des complexes sérine/thréonine kinases, qui phosphorylent l'effecteur intracellulaire Smad. Une fois actif, ce dernier va interagir avec divers facteurs de transcription dont ceux qui médient l'angiogenèse tumorale, notamment VEGF⁴⁸. En outre, le TGF-β contrôle également la transition épithélio-mésenchymateuse causant notamment la formation de métastases^{26,48}. Cette cytokine est également connue pour induire un phénotype immunosuppressif chez les cellules résidentes et les cellules immunitaires infiltrantes, telles que les TAMMs³⁰.

1.3.4 Les TAMMs dans l'angiogenèse

Au sein du microenvironnement tumoral, les TAMMs adoptent un phénotype *M2-like* et participent à l'angiogenèse tumorale^{25,26,59}. En effet, l'hypoxie ne reprogramme pas seulement les cellules cancéreuses, mais aussi les macrophages et la microglie associés à la tumeur. Ces derniers sont capables de ressentir ce manque d'oxygène et les effets de HIF-1α^{26,59}. En conséquence, ils sécrètent de nombreuses cytokines pro-angiogéniques dont le TGF-β, le VEGFA ou encore les MMPs^{25,26,59}. Ces sécrétions conduisent à la formation de vaisseaux sanguins anormaux et provoquent ainsi un feedback positif pour l'hypoxie et donc, ensuite, pour l'angiogenèse^{26,46}.

Parmi les cytokines secrétées, l'interleukine 17 (IL-17) illustre un autre aspect de l'implication des TAMMs dans l'angiogenèse. Principalement produite par les lymphocytes Th17, IL-17 est également secrétée par les macrophages et la microglie^{34,35}. Sa production est induite par l'IL-23, une cytokine également issue, entre autres, des TAMMs. Au sein du GBM, l'expression de ces deux interleukines est fortement élevée et est souvent associée à un mauvais pronostic³⁴.

L'IL-23 agit en se liant à son récepteur IL-23R exprimé à la surface des cellules Th17, ce qui induit la production d'IL-17. Cette dernière se lie à son récepteur IL-17R, notamment présent à la surface des TAMMs, participant à leur activation et à la différenciation des TAMMs vers un phénotype *M2-like*^{34,35,37}. En réponse, celles-ci produisent non seulement de l'IL-17, mais également de l'IL-23, amplifiant ainsi un feedback positif dans la production d'IL-17³⁵. IL-17 active divers processus tumorigènes du GBM dont l'angiogenèse, notamment grâce à l'activation de la voie PI3K/AKT. Cette voie de signalisation est connue pour induire l'angiogenèse grâce à la sécrétion de métalloprotéases et de VEGF^{35,37,60}. Par ailleurs, les

cellules cancéreuses peuvent également produire du VEGFA après une stimulation de l'IL-17^{34,37}. L'angiogenèse induite par IL-17 favorise le recrutement de cellules immunitaires telles que les TAMMs, qui sécrètent à leur tour IL-17, VEGFA et des MMPs, contribuant ainsi à entretenir un microenvironnement pro-angiogénique³⁵.

Ainsi, les cellules tumorales et les TAMMs recrutés amplifient ensemble la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques dans le microenvironnement tumoral ce qui stimule l'angiogenèse.

1.4 La voie CXCL12 / CXCR4

Parmi les nombreuses voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse du glioblastome, l'axe CXCL12/CXCR4 occupe une place centrale. Il intervient dans la migration cellulaire, l'immunosuppression, et contribue également à différents mécanismes d'angiogenèse.

1.4.1 Généralités

La chimiokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12), également nommée SDF-1 (*Stromal Cell-Derived Factor-1*) est retrouvée dans de nombreux tissus⁶¹⁻⁶³. Elle est composée de 68 acides aminés et a un poids moléculaire de 8 kDa. CXCL12 possède une double fonction, à la fois homéostatique (produite constitutivement) et inflammatoire (recrutée par les cellules immunitaires lors d'une inflammation). Elle joue des rôles importants dans l'embryogenèse, l'organogenèse, l'angiogenèse, la lymphopoïèse, ou encore la régulation du trafic des cellules souches hématopoïétiques^{61,62}. Par ailleurs, CXCL12 participe à la régulation du développement du SNC, mais intervient aussi dans la neuromodulation, la neuroprotection, et le contrôle des interactions entre la microglie, les neurones et les astrocytes présents dans le cerveau adulte⁶³. Cette protéine est connue pour être le seul ligand du récepteur CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) et induire ainsi une série de processus biologiques, notamment dans un contexte tumoral. CXCR4 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G. Il est exprimé à la surface de nombreuses cellules tout au long du développement, de l'embryogenèse à l'âge adulte^{61,62}. CXCL12 peut également interagir avec CXCR7, connu aussi sous le nom de ACKR3 (*Atypical Chemokine Receptor 3*, récepteur de chimiokine atypique 3), dont l'une des fonctions est de moduler l'activité de CXCL12/CXCR4^{62,63}.

CXCL12 possède deux domaines de liaison successifs : le premier correspond aux 8 premiers acides aminés NH2-terminaux KPVSLSYR et le deuxième correspond aux acides aminés suivants correspondant au motif RFFESH. Le premier contact entre CXCR4 et CXCL12 se réalise grâce au motif RFFESH qui donne lieu à un changement de conformation de CXCL12. Ce changement de conformation permet aux 8 acides aminés NH2-terminaux d'activer CXCR4⁶⁴. L'activation de CXCR4 permet la transduction du signal via la

dissociation des sous-unités de la protéine G couplée au récepteur. Ces sous-unités activent à leur tour différentes voies de signalisation parmi lesquelles les plus connues sont PI3K/AKT, MAPK/ERK et PLC/IP3⁶²⁻⁶⁴.

1.4.2 CXCL12 / CXCR4 dans le microenvironnement tumoral

La voie CXCL12/CXCR4 intervient dans de nombreux processus pro-tumoraux tels que l'angiogenèse, l'inflammation, l'immunosuppression, la reprogrammation cellulaire, la formation de métastases, ou encore la prolifération et la migration cellulaire (Figure 1.6)⁶¹⁻⁶³. De nombreux types cellulaires présents dans le MET sécrètent CXCL12 : les fibroblastes associés aux cancers (CAFs), les cellules cancéreuses, les TAMMs *M2-like*, les neutrophiles, etc. En ce qui concerne CXCR4, il est principalement retrouvé à la surface des cellules cancéreuses, notamment les GSCs, mais aussi des TAMMs *M2-like*, des MDSCs et des Treg^{61,62}. Agissant de manière paracrine et autocrine, l'axe CXCL12/CXCR4 est reconnu comme un marqueur de l'agressivité de nombreux cancers, et est associé à un mauvais pronostic. Dans le glioblastome, cette voie est particulièrement active et contribue à la progression tumorale^{61,63}.

L'axe CXCL12/CXCR4 médie l'inflammation cellulaire en recrutant des cellules immunitaires et en régulant la sécrétion de facteurs inflammatoires. Plus précisément, dans le contexte du glioblastome, cette voie contribue à l'immunosuppression. En effet, CXCR4 étant exprimé à la surface de cellules immuno-suppressives, celles-ci peuvent être attirées par le CXCL12 se trouvant dans le MET et induire une réponse anti-inflammatoire. De plus, l'axe CXCL12/CXCR4 permet la différenciation des TAMMs vers un phénotype *M2-like*, ce qui contribue également à une réaction pro-tumorale/anti-inflammatoire^{61,62}. En outre, il diminue l'efficacité des APCs entraînant une mauvaise réponse immunitaire⁶².

L'hypoxie active positivement la voie de signalisation CXCL12/CXCR4. En effet, en condition hypoxique, HIF-1 α stimule l'expression de CXCL12 par les cellules endothéliales. La cytokine se lie alors au CXCR4 des cellules cancéreuses ce qui induit leur migration vers des zones riches en CXCL12, tels que les vaisseaux sanguins^{52,61}. De plus, CXCL12/CXCR4, en activant la voie de signalisation PI3K/AKT, uprégule HIF-1 α ce qui exacerbe l'hypoxie dans le GBM⁵². Par conséquent, l'hypoxie favorise, via la voie CXCL12/CXCR4, la migration des cellules cancéreuses, contribuant à la formation de métastases⁶¹.

1.4.3 CXCL12 / CXCR4 et les GSCs

Le glioblastome est un cancer hautement infiltrant, en grande partie dû à l'activation de la voie CXCL12/CXCR4. Comme expliqué précédemment (1.1.1 La résistance aux traitements), les GSCs sont des cellules cancéreuses aux caractéristiques de cellules souches qui sont capables de migrer vers la zone sous-ventriculaire (SVZ, *subventricular zone*), et échapper ainsi aux thérapies standards. De cette manière, elles

favorisent l'apparition de récidives^{9,15,17}. La SVZ est une niche neurogénique, impliquée dans la formation et le maintien des NSCs. Cependant, cette zone joue un rôle identique pour les GSCs^{17,63}. Les cellules endothéliales, épendymaires et neurales présentes dans la SVZ produisent du CXCL12 et induisent alors la migration des GSCs vers ce gradient. Celles-ci se déplacent à travers le *corpus callosum*, depuis la masse tumorale jusqu'à la SVZ (**Figure 1.6**)^{16,17,61,63,65}. Une fois installées dans cette niche, les GSCs échappent à la résection chirurgicale et entrent dans un état de quiescence tout en conservant un caractère indifférencié. Cet état leur permet ainsi de résister aux thérapies^{9,15,17,61}.

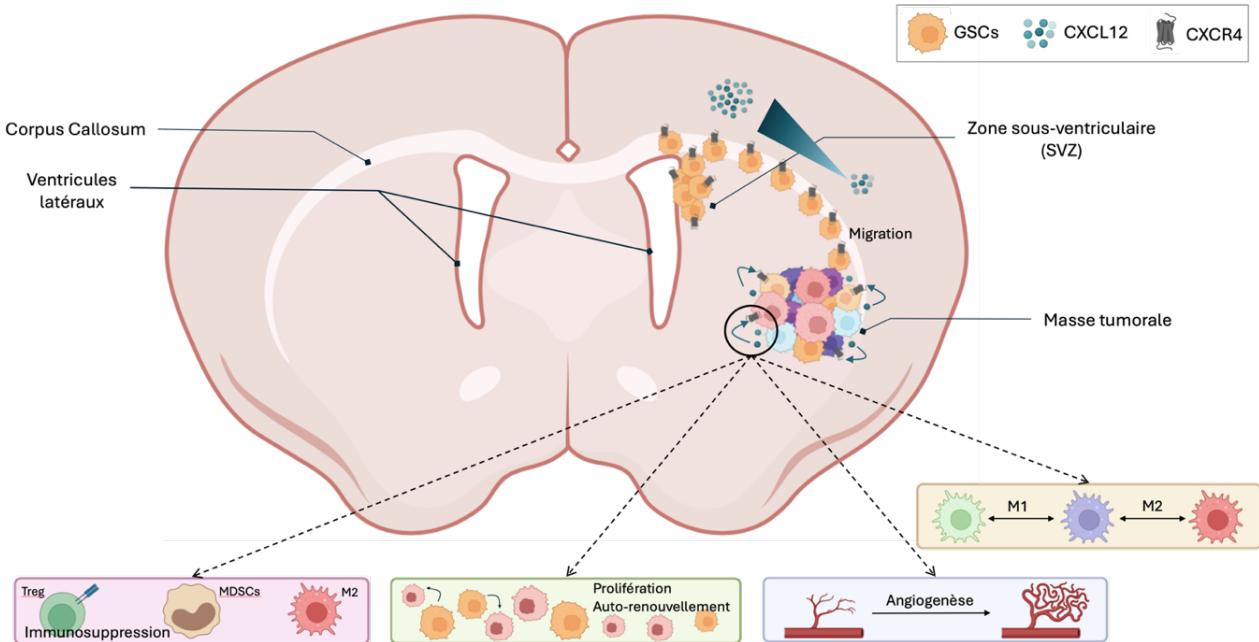


Figure 1.6 – Les rôles de la voie CXCL12/CXCR4 dans le glioblastome. CXCL12 est une chimiokine se liant au récepteur CXCR4 qui est exprimé à la surface des cellules du GBM, notamment les GSCs, les Treg, les MDSCs et les TAMMs de phénotype M2-like. La voie CXCL12/CXCR4 est responsable de divers processus pro-tumoraux : l'immunosuppression, la prolifération, l'auto-renouvellement des GSCs, l'angiogenèse et la différenciation des TAMMs en phénotype M2-like. De plus, cette voie joue un rôle important dans la migration des GSCs le long du corpus callosum vers la zone sous-ventriculaire (SVZ). Pour ce faire, cette zone hypoxique secrète CXCL12 ce qui crée un gradient attirant les GSCs. Ces cellules souches nichées dans cette zone sont alors dans des conditions favorables à la résistance aux thérapies standards, contribuant ainsi à la résistance aux thérapies standards. Figure réalisée avec BioRender et PowerPoint.

1.4.4 CXCL12 / CXCR4 dans l'angiogenèse

Certaines chimiokines au motif C-X-C possèdent un motif E-L-R (Glu-Leu-Arg) qui précède directement le motif C-X-C. Sur base de la présence ou l'absence de ce motif ELR, ces cytokines possèdent respectivement une fonction pro- ou anti-angiogénique. En ce qui concerne CXCL12, il s'agit d'une chimiokine ELR-négative possédant cependant une activité pro-angiogénique⁶². En effet, l'axe CXCL12/CXCR4 favorise fortement l'angiogenèse, surtout au niveau du glioblastome.

CXCL12, en se liant au CXCR4 des GSCs, induit l'expression de VEGF via la voie de signalisation PI3K/AKT^{60,63}. En effet, cette voie de signalisation induit l'expression du facteur de transcription HIF-1 α qui peut alors se lier au promoteur de VEGF et induire sa transcription⁶⁰. La sécrétion du VEGFA et de CXCL12 par les cellules du MET permet la mobilisation des EPCs, qui expriment CXCR4, vers la tumeur.

Celles-ci vont pouvoir se différencier en cellules endothéliales et entamer la néoangiogenèse^{47,61,63}. Par ailleurs, les GSCs n'engendrent pas seulement la prolifération et la différenciation des EPCs, elles peuvent également se dédifférencier et former des vaisseaux sanguins par mimétisme vasculaire, grâce à la libération de CXCL12 et de TGF- β ^{61,63}. Enfin, la voie CXCR4/CXCL12 permet aux GSCs de migrer vers les vaisseaux sanguins produisant du CXCL12 créant ainsi de la cooptation vasculaire⁵⁰.

1.5 Les virus oncolytiques

1.5.1 Généralités

Compte tenu du rôle multifonctionnel de la voie CXCL12/CXCR4 dans la progression du glioblastome, son inhibition apparaît comme une stratégie thérapeutique prometteuse. Dans cette optique, l'utilisation de virus oncolytiques armés représente une approche innovante capable de cibler simultanément plusieurs composantes du microenvironnement tumoral.

La virothérapie oncolytique consiste en l'utilisation de la réplication sélective de virus dits « oncolytiques » comme stratégie thérapeutique contre les cancers⁶⁶. Les virus oncolytiques sont des virus modifiés qui ciblent les cellules cancéreuses pour s'y répliquer et les lyser, sans endommager les cellules saines⁶⁶⁻⁶⁸. Pour ce faire, la mutation ou la modification génétique du virus les empêche de se répliquer dans des cellules normales, quiescentes et en non-division. Ainsi, ces virus oncolytiques se répliquent presque exclusivement dans des cellules en division continue, comme les cellules cancéreuses⁶⁸. En plus de provoquer la lyse des cellules tumorales, les virus oncolytiques permettent d'induire une réponse immunitaire en provoquant une inflammation et en augmentant la présentation d'antigènes viraux et tumoraux^{66,67}. Dès lors, même des cellules cancéreuses distantes et non infectées peuvent être éliminées. En effet, des cytokines, des DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*, motifs moléculaires associés aux dégâts) et des PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, motifs moléculaires associés aux pathogènes) sont relâchés suite à la lyse de cellules tumorales et stimulent l'immunité^{67,69}. Il s'agit donc en réalité d'une immuno-virothérapie favorisant un MET inflammatoire et une réponse immunitaire antitumorale⁶⁶. Ainsi, l'utilisation d'un virus oncolytique contre le GBM permettrait de transformer la tumeur froide en tumeur chaude^{66,67}. Enfin, les virus oncolytiques peuvent être armés d'un transgène et permettent l'expression de ce dernier localement dans la tumeur, renforçant de cette manière la thérapie⁶⁶.

1.5.2 Virus Herpès Simplex de type 1 (HSV-1)

Le virus herpès simplex 1 (HSV-1) est un virus de la famille des *Herpesviridae*. Plus particulièrement, HSV-1 appartient à la sous-famille *alphaherpesvirinae* qui comprend également HSV-2 et VZV (*Varicella Zoster Virus*)^{70,71}. Il est enveloppé et encapsulé dans une capsid icosaédrique. Celle-ci protège une molécule d'ADNdb (ADN double brin) d'environ 150kb (**Figure 1.7**)^{67,70,72,73}. Ce génome viral de grande

taille permet l'intégration d'un transgène sans altérer l'efficacité du virus^{67,72,74}. HSV-1 est connu pour infecter les tissus neuraux, ce qui en fait un excellent candidat comme virus oncolytique contre le GBM^{69,71}.

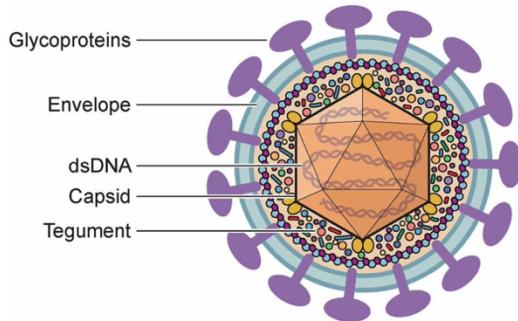


Figure 1.7 – Structure d'un virion du virus herpès simplex (HSV)⁷³. La capsid d'HSV-1 est icosaédrique et protège l'ADN double brin linéaire du virus. Son génome est de grande taille, d'environ 150kb et code pour approximativement 90 protéines. Autour de la capsid, le tégument la relie à l'enveloppe virale. Ce tégument est composé de nombreuses protéines virales et cellulaires. L'enveloppe possède de nombreuses glycoprotéines (gD, gB, gH/gL) permettant d'initier le cycle infectieux d'HSV.

Lors du cycle infectieux, HSV-1 rentre dans la cellule et son génome est libéré dans le cytoplasme puis transporté jusqu'au noyau où il s'y circularise^{72,73}. Le génome régit entièrement la transcription et la synthèse de protéines virales⁷². Le cycle infectieux d'HSV-1 est soit lytique, soit latent⁷³. En latence, HSV-1 ne produit pas de particules virales et l'expression de ses gènes est fortement diminuée. Cependant, son génome peut être réactivé et reprendre un cycle lytique qui permet la production de virions.⁷³

Le génome d'HSV-1 contient des gènes précoces, des gènes intermédiaires et des gènes tardifs, classés en fonction du moment de leur transcription au cours du cycle infectieux^{70,72,73}. Autrement dit, l'expression des gènes viraux suit une régulation temporelle, où les gènes précoces immédiats (*immediate-early*, *IE* ou α) régulent l'expression de gènes qui contrôlent l'activation des gènes précoces (*early*, *E* ou β)^{70,73}. Ces derniers sont impliqués dans la réplication de l'ADN selon le principe du *rolling circle* et influencent les gènes tardifs (*late*, *L* ou γ) qui, quant à eux, jouent un rôle dans l'expression des protéines structurales et l'assemblage des virions^{70,73}.

1.5.3 oHSV : Virus Herpès Simplex oncolytique

Utiliser le virus herpès simplex 1 comme virus oncolytique est particulièrement intéressant pour quatre raisons. La première est que ce virus infecte et prolifère efficacement dans une large gamme de cellules^{70,72}. Ensuite, environ 30kb de gènes non-essentiels à la réplication se trouvent dans le génome d'HSV-1. Ceux-ci peuvent être déletés et/ou remplacés par un transgène^{70,72,75}. Troisièmement, des mutations insertionnelles ne risquent pas d'arriver chez le patient puisque le génome est épisomal⁷⁰. Et dernièrement, des drogues antivirales efficaces telles que l'Acyclovir existent et peuvent contrecarrer une éventuelle virulence^{70,72,75}.

Par ailleurs, environ 67% de la population mondiale est séropositive à HSV-1⁷³. Cette séropositivité améliorerait l'efficacité du virus⁷². En effet, une étude de Ling *et al.* (2023) a montré que les personnes

séropositives à HSV-1 développent une réponse immunitaire plus rapide et plus importante que les personnes qui ne le sont pas⁷⁶. En revanche, le virus utilisé ne se réplique dans la tumeur que pendant 1 semaine. En théorie, ce délai ne poserait pas de problème si la réponse immunitaire déclenchée pendant ce laps de temps persistait et ciblait efficacement les cellules tumorales. Or, dans la majorité des cas, cette réponse est principalement dirigée contre le virus lui-même, et non contre les cellules tumorales. Par conséquent, une fois le virus éliminé, la réponse immunitaire s'estompe, ce qui peut favoriser la récidive des tumeurs.

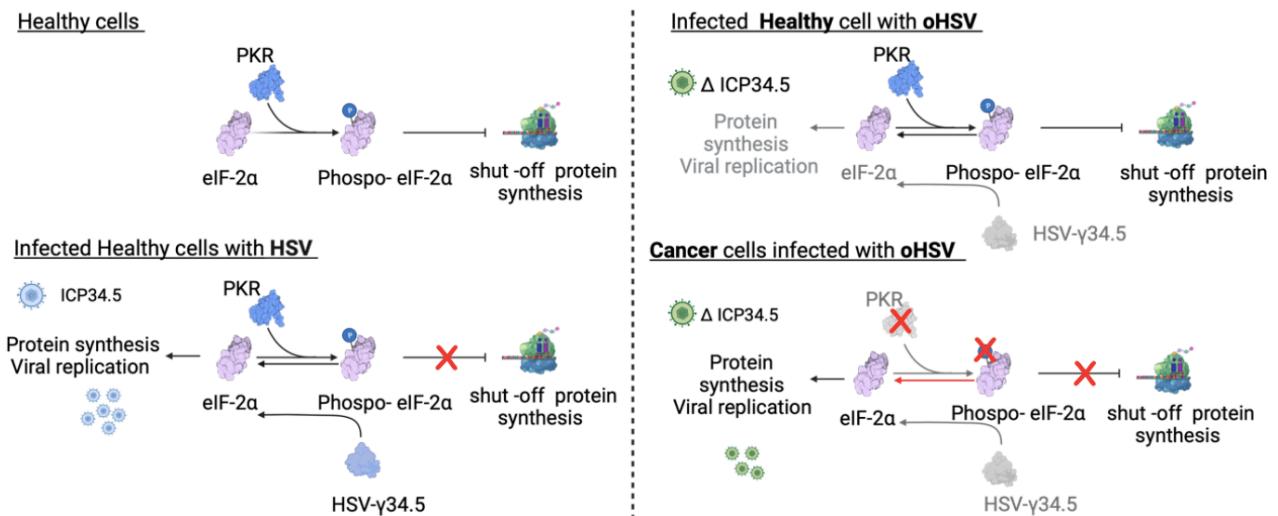
Le génome d'HSV-1 contient plusieurs gènes essentiels et non-essentiels qui peuvent être modifiés ou délétés de manière à orienter la réplication virale vers les cellules cancéreuses⁷⁵. Ainsi, le virus oncolytique herpès simplex (oHSV) représente une forme atténuée du HSV-1, obtenue par des modifications génétiques spécifiques. Les mutations introduites dans HSV-1 pour ce projet sont détaillées ci-dessous.

Délétion des gènes γ 34.5 codant pour ICP34.5

La délétion du gène tardif γ 34.5, présent en deux copies dans le génome, est la mutation la plus courante, puisque ce gène est directement associé à la neurovirulence du virus^{67,70,74,75}. Dès lors, en délétant ces gènes, la pathogénicité du virus est diminuée. L'oHSV-1 utilisé pour cette étude possède une délétion des deux copies du gène γ 34.5.

La protéine PKR (*Protein Kinase RNA-activated / Protein Kinase R*) agit en réponse à l'infection pour arrêter la synthèse de protéines et ainsi empêcher la réplication du virus. En effet, dans des cellules saines, PKR participe à la phosphorylation et donc à l'inactivation de eIF2 α , un facteur d'initiation de la traduction eucaryote, bloquant dès lors la traduction^{74,75}. De plus, PKR peut induire l'apoptose des cellules infectées. La protéine virale ICP34.5 (*Infected Cell Protein 34.5*), provenant du gène γ 34.5, interagit et active la phosphatase PP1 α (*Protein Phosphatase 1 alpha*) qui permet la déphosphorylation et donc l'activation de eIF2 α , qui peut alors initier la traduction. Ainsi, dans des cellules saines infectées par HSV1, l'action de PKR est contrecarrée par la protéine ICP34.5^{74,75}. En l'absence du gène γ 34.5, eIF2 α reste sous forme phosphorylée et est donc inactive. La synthèse protéique est dès lors affectée et le virus est beaucoup moins infectieux^{74,75}.

Dans les cellules tumorales, PKR est désactivée et ne phosphoryle donc pas eIF2 qui est alors continuellement active^{74,75}. Par conséquent, oHSV-1 délété des gènes γ 34.5 est tout de même capable de se répliquer dans les cellules tumorales, mais pas dans les cellules saines^{70,74,75}. (**Figure 1.8**)



Inactivation du gène UL39 codant pour ICP6

La déplétion diploïde de $\gamma 34.5$ est accompagnée d'une inactivation de la protéine ICP6, par insertion du gène GFP à la suite du promoteur ICP6. UL39 est le gène précoce codant pour ICP6 qui est la plus grande sous-unité de la ribonucléotide réductase (RR) virale^{70,74,75}. La RR permet de transformer les ribonucléotides en désoxyribonucléotides (dNMPs), essentiels à la réplication virale^{69,70,74}. Ainsi, elle est importante dans les cellules qui ne sont pas en division. En effet, une cellule en division infectée par HSV-1 produit énormément de dNMPs grâce à la RR cellulaire et la RR virale. Si la cellule n'est pas en division et se fait infecter, le virus pourra tout de même se répliquer grâce à sa RR. Par conséquent, une mutation dans le gène UL39 bloquera la production des dNMPs nécessaires à la synthèse du génome viral et limitera sa réplication aux cellules en division. Or, les cellules cancéreuses sont des cellules en division rapide, alors que ce n'est pas le cas pour les neurones matures et cellules post-mitotiques du cerveau. Ainsi, la réplication par HSV-1 dont UL39 est muté, est de nouveau orientée vers les cellules cancéreuses⁷⁴. (Figure 1.9)

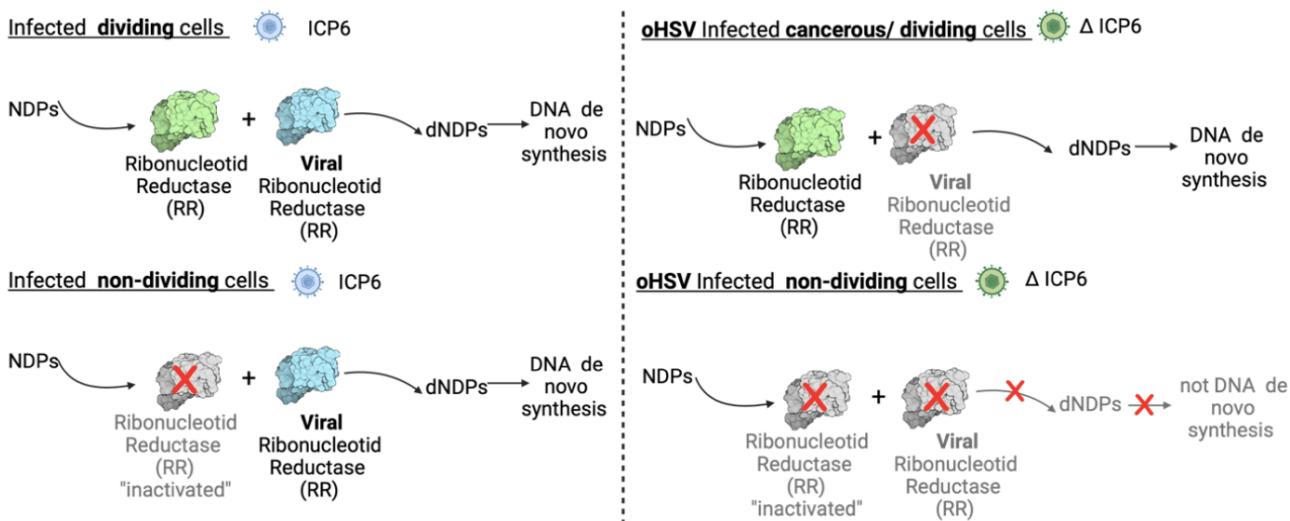


Figure 1.9 – Impact de la mutation du gène codant pour ICP6 dans oHSV. ICP6 est la plus grande sous-unité de la ribonucléotide réductase (RR) produit des dNTPs dans les cellules en non-division cellulaire pour pouvoir répliquer son ADN. Ainsi, en mutant le gène US39 codant pour ICP6, les virus ne savent plus répliquer correctement leur ADN dans les cellules en non-division telles que les cellules saines, mais bien dans les cellules en division rapide comme les cellules cancéreuses. Schéma créé par Judit Sanchez Gil dans le cadre de sa thèse.

Délétion du gène US12 codant pour ICP47

En déletant les gènes tardifs γ 34.5, HSV-1 ne se réplique plus efficacement dans les GSCs du GBM qui expriment un peu PKR. La troisième modification consiste à déléter le gène *immediate early* US12 codant pour ICP47, une protéine qui interfère avec la présentation des antigènes^{70,75}.

Lors d'une infection, les antigènes endogènes sont dégradés par le protéasome en petits peptides avant d'être transportés par la protéine TAP (*Transporters associated with Antigen Processing*) vers le réticulum endoplasmique où le CMH-1, qui est transmembranaire, est synthétisé. Les peptides sont alors pris en charge par le CMH-1 qui les amène à la surface de la cellule pour les présenter aux CD8+. Ce processus est bloqué par la protéine ICP47 qui interagit avec le transporteur TAP et empêche le transport vers le réticulum endoplasmique des peptides digérés. Dès lors, les cellules infectées ne présentent pas efficacement les peptides à la surface et le virus échappe à l'immunité^{70,74}. En déletant cette protéine, la capacité des cellules à présenter l'antigène à la surface est restaurée, puisque TAP peut reprendre son rôle de transporteur. Ainsi, les cellules tumorales infectées représentent correctement les peptides à leur surface via le CMH-1 et l'infection virale devient immunogène^{67,69,74}. (**Figure 1.10.A**)

Par ailleurs, le gène US11, voisin de US12, code pour une protéine *late* capable de se lier à l'ARNdb, et de bloquer l'activation de PKR. La déletion de US12 amène à un changement de promoteur pour le gène US11. Ce dernier, initialement exprimé tardivement, est désormais placé sous le contrôle du promoteur de US12, un promoteur de gène *immediate early*. La protéine tardive US11, en étant produite précocement, peut se lier à l'ARNdb et bloquer l'activation de PKR. La déphosphorylation de eIF2 α est engendrée et les protéines virales sont alors traduites^{70,74}.

De cette manière, la perte des γ 34.5 est balancée et la réplication du virus au sein des GSCs est rétablie^{70,74,75}. De plus, grâce à cette délétion, la présentation antigénique est restaurée ce qui améliore également l'immunité contre les cellules infectées. (Figure 1.10.B)

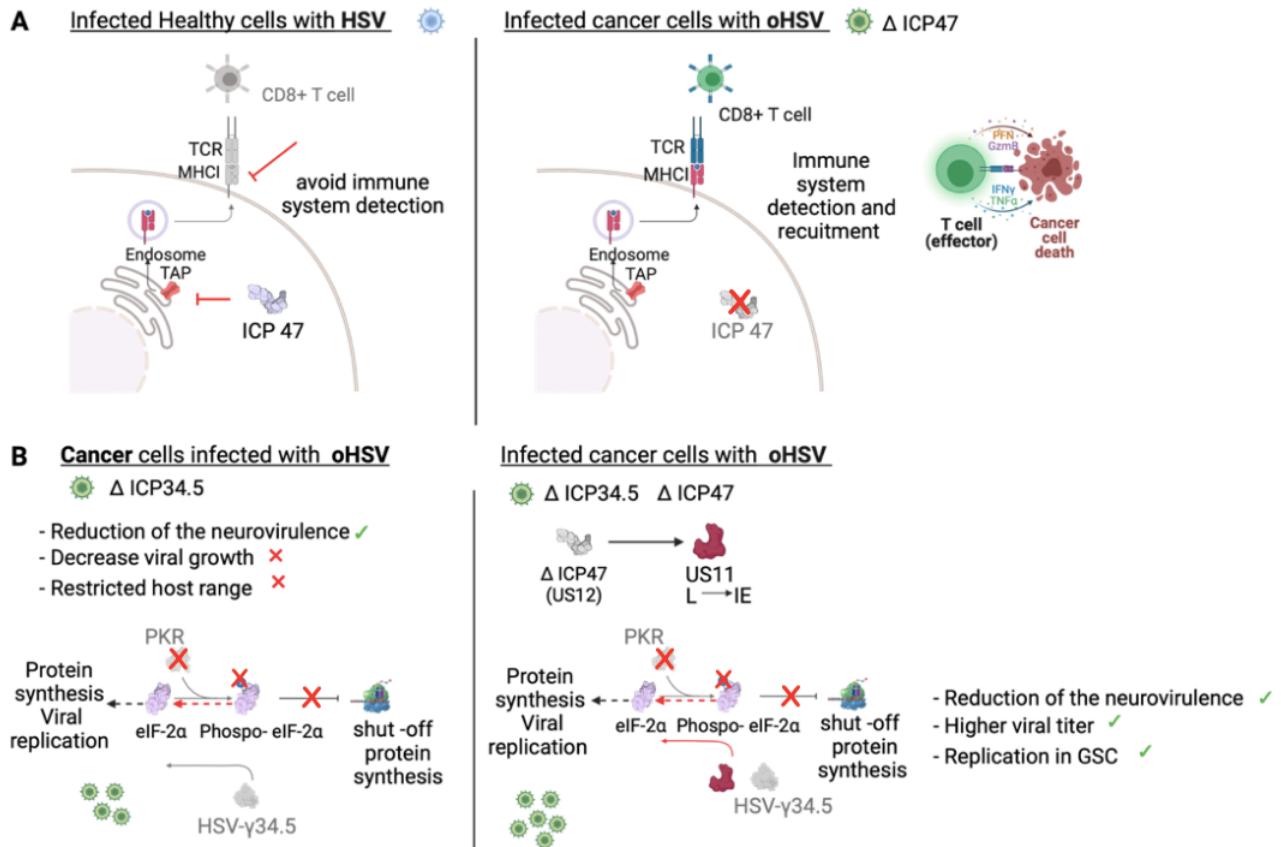


Figure 1.10 – Impact de la délétion du gène codant pour ICP47 dans oHSV. A) La protéine ICP47 empêche TAP d'apporter les peptides digérés au CMH-1, et bloque ainsi la présentation de l'antigène à la surface des cellules infectées. La présentation d'antigènes vitaux dans un contexte CMH-1 est rétablie grâce à la délétion du gène US12 dans oHSV. B) Le gène tardif US11 passe sous le contrôle du promoteur de US12 et est alors exprimé en tant que gène immediate early. La protéine US11 a la capacité de bloquer PKR ce qui permet la déphosphorylation de eIF2 α . Ainsi, la délétion de ICP47 compense l'inefficacité de la réplication virale suite aux délétions des gènes γ 34.5. Schéma créé par Judit Sanchez Gil dans le cadre de sa thèse.

1.5.4 Armement de oHSV par CXCL12-P2G

Dans le cadre de cette étude, le virusherpès oncolytique (oHSV) possédant les délétions et mutations décrites précédemment, a été armé avec un antagoniste de CXCL12. Cet antagoniste est nommé CXCL12-P2G, ou P2G⁷⁷. Comme montré par la Figure 1.11, P2G correspond à CXCL12 dont la proline (P) en position 2 a été remplacée par une glycine (G). P2G a été inséré dans le génome du virus oncolytique de manière à être contrôlé par le promoteur eucaryote EF1a, et est tagué par un HA-Tag. La sécrétion de P2G est assurée par l'insertion d'un peptide signal IL-2. De plus, oHSV-P2G a également été modifié pour exprimer la GFP (Green Fluorescence Protein) qui est contrôlée par le promoteur ICP6 (pORF6).

Tout comme CXCL12, P2G est capable de se lier au récepteur CXCR4 grâce à son motif RFFESH, mais contrairement à CXCL12, il est incapable de faire le changement de conformation nécessaire pour que les

8 premiers acides aminés NH₂-terminaux puisse interagir avec CXCR4 et l'activer. Ce virus oncolytique armé de P2G est nommé oHSV-P2G et inhibe donc le récepteur CXCR4.

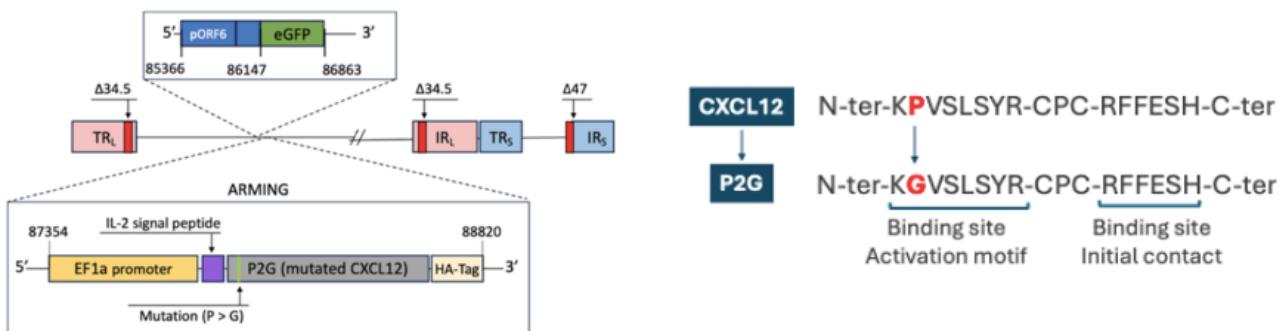


Figure 1.11 – oHSV-P2G. Le virus herpès simplex 1(HSV-1) a été modifié aux niveau de certains gènes pour faire de lui un virus oncolytique : délétion de γ 34.5, délétion de ICP47 et mutation de ICP6. HSV-1 en tant que virus oncolytique est nommé oHSV. Ce dernier a été armé par un inhibiteur de CXCR4, P2G. P2G correspond à CXCL12 avec la proline (P) en position 2 remplacée par une glycine (G). Il est sous le contrôle du promoteur eucaryote EF1a et est tagué par un HA-Tag. Le virus oncolytique armé de P2G est nommé oHSV-P2G.

De la sorte, oHSV armé de P2G permettrait de rétablir une réponse immunitaire au sein de la tumeur, mais aussi d'inhiber l'angiogenèse, la prolifération et la migration cellulaire. Par ailleurs, il empêcherait la migration des GSCs et leur auto-renouvellement.

Chapitre 2

Données préliminaires et objectifs du mémoire

2.1 Données préliminaires

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans la continuité de la thèse de doctorat menée par Maxime Dubois au sein du laboratoire.

Une analyse en *single-cell RNA sequencing* (sc-RNAseq) réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que l'expérience *in vivo* (voir 3.2) a mis en évidence la présence de différentes sous-populations de cellules immunes infiltrant la tumeur. Parmi les macrophages qui représentent une part importante de ces cellules immunes, une sous-population présente un profil pro-angiogénique, caractérisé par la surexpression de *VEGFA*, *IL17A*, *HIF1A*. Cette sous-population pro-angiogénique augmente après traitement par oHSV par rapport au groupe contrôle (PBS), mais diminue avec le traitement oHSV-P2G (Figure 2.1).

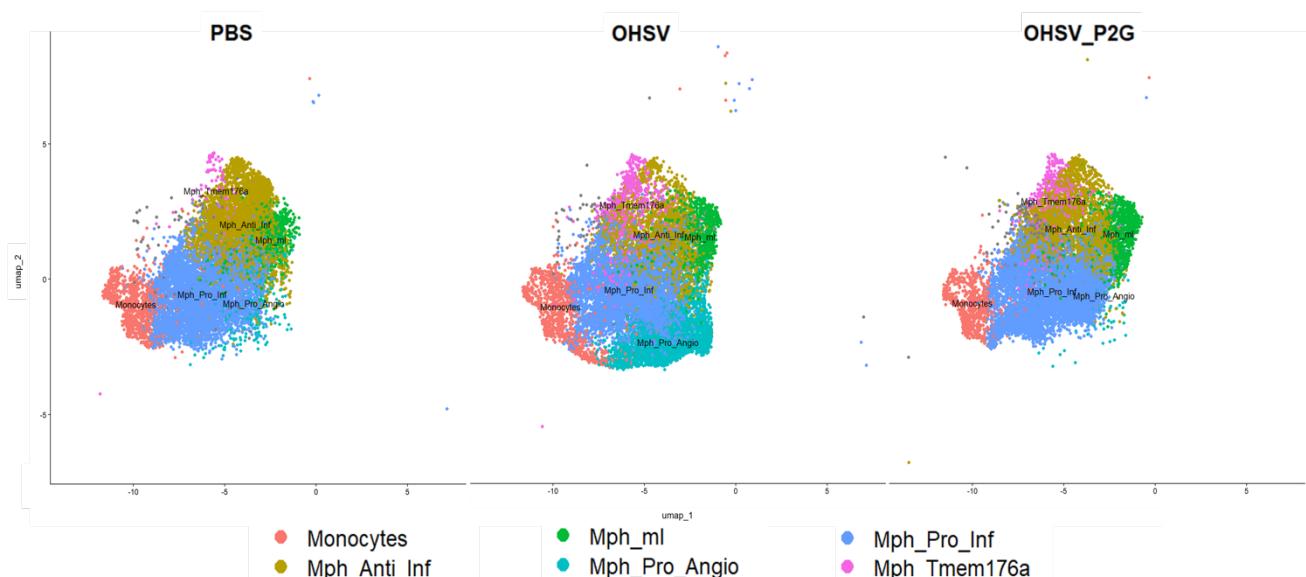


Figure 2.1 – Les différentes sous-populations de macrophages au sein du glioblastome, après traitement avec PBS, oHSV ou oHSV-P2G. Cette analyse a été réalisée par *single-cell RNA sequencing* sur des cerveaux de souris C57Bl6 greffées avec des cellules de glioblastome murin GL261N4. Chaque point correspond à une cellule colorée selon la sous-population à laquelle elle appartient. Abréviations : macrophages anti-inflammatoires (Mph_Anti_Inf), macrophages pro-inflammatoires (Mph_Pro_Inf), macrophages pro-angiogéniques (Mph_Pro_Angio), macrophages associé au métabolisme lipidique (Mph_ml) et macrophages exprimant le gène *Tmem176a* (Mph_Tmem176a).

La classification fonctionnelle des sous-populations de macrophages a été validée à l'aide de listes de gènes associés aux profils *M1-like* (pro-inflammatoires), *M2-like* (anti-inflammatoires), et pro-angiogéniques. Ces listes ont été issues de www.gsea-msigdb.org. Comme illustré par les *violin plots* de la **Figure 2.2**, les macrophages pro-inflammatoires (Mph_Pro_Inf) obtiennent un score plus élevé pour les gènes *M1-like* que les macrophages anti-inflammatoires (Mph_Anti_Inf), tandis que l'inverse peut être observé pour les gènes *M2-like*. Ces résultats confirment la pertinence fonctionnelle de la classification. La sous-population pro-angiogénique (Mph_Pro_Angio) montrait, quant à elle, une forte expression des gènes associés à l'angiogenèse, confirmant sa fonction présumée. De manière intéressante, cette population obtient également un score élevé pour les gènes *M2-like* suggérant une proximité avec les macrophages de type M2, pro-tumoraux, déjà connus pour être impliqués dans l'angiogenèse tumorale. Ces résultats soutiennent l'existence d'une sous-population de macrophages pro-angiogéniques et pro-tumoraux dans les cancers, déjà décrite dans la littérature notamment par Ma *et al.* (2022)³².

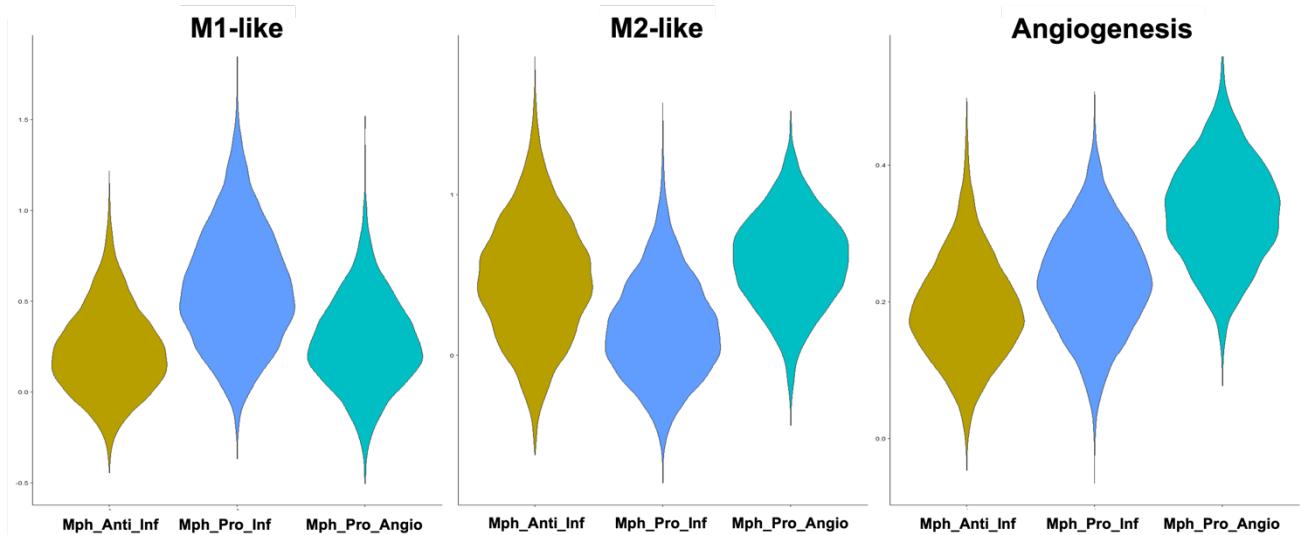


Figure 2.2 – Violin plots d'expression de gènes *M1-like*, *M2-like* et pro-angiogéniques dans les sous-populations macrophagiques identifiées par single-cell RNA-seq. Les données sont issues d'une analyse single-cell RNA sequencing réalisée sur des cerveaux de souris C57BL6 greffées avec des cellules tumorales GL261N4. Les sous-populations analysées sont les macrophages anti-inflammatoires (Mph_Anti_Inf), pro-inflammatoires (Mph_Pro_Inf) et pro-angiogéniques (Mph_Pro_Angio). Les profils d'expression observés valident la classification : les gènes *M1-like* sont majoritairement exprimés par la population pro-inflammatoire, tandis que la population anti-inflammatoire surexprime les gènes *M2-like*. Les gènes pro-angiogéniques présentent une forte expression dans la population pro-angiogénique.

Une analyse plus spécifique de l'expression des gènes caractérisant cette population pro-angiogénique a ensuite été réalisée (**Figure 2.3**). Des marqueurs connus pour être angiogéniques ont été identifiés à la fois des données single-cell du laboratoire et des travaux de Ma *et al.* Comme montré par la **Figure 2.3.A**, l'analyse des données obtenues en scRNASeq montre que ces gènes sont fortement exprimés dans la sous-population pro-angiogénique, comparativement aux autres populations macrophagiques. De plus, l'expression de ces marqueurs augmente après traitement par oHSV, mais diminue fortement avec oHSV-P2G (**Figure 2.3.B**). Ce résultat confirme les observations de la **Figure 2.1** et sont en accord avec les travaux de Kurozumi *et al.* (2008)⁷⁸ qui observent une induction de l'angiogenèse par les HSV-1 oncolytiques.

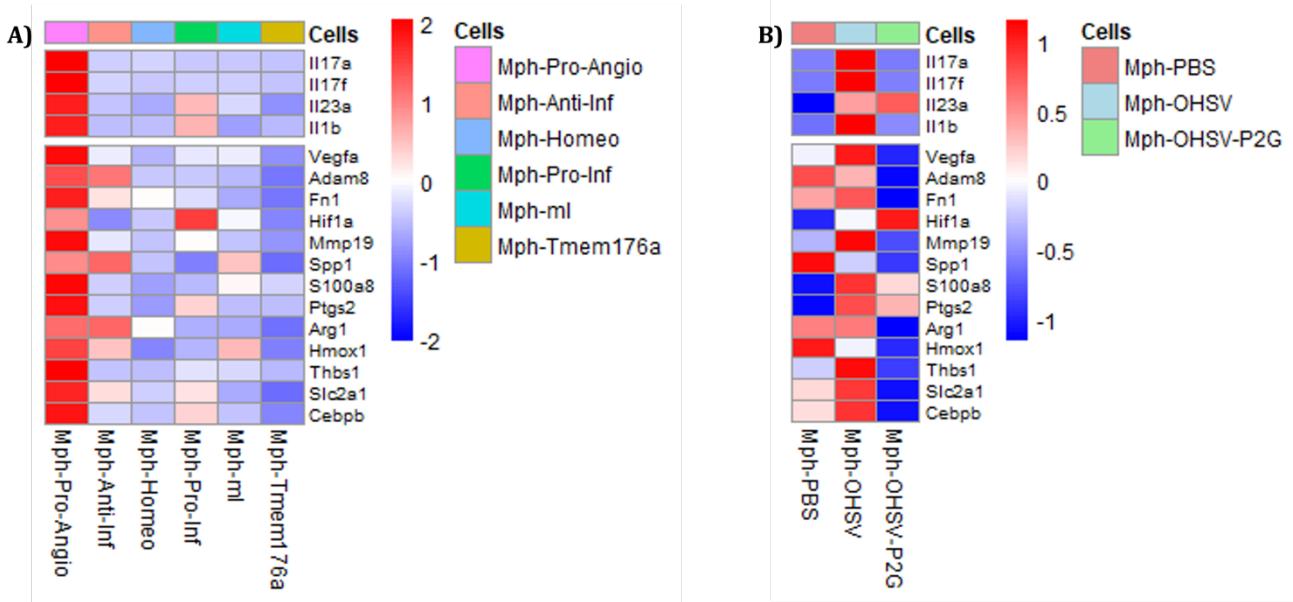


Figure 2.3 – Expression des marqueurs angiogéniques dans les sous-populations de macrophages (A), ou plus spécifiquement dans la sous-population pro-angiogénique après traitement au PBS, oHSV ou oHSV-P2G (B). Les données sont issues d'une analyse single-cell RNA sequencing réalisée sur des cerveaux de souris C57Bl6 greffées avec des cellules tumorales GL261N4. Les gènes angiogéniques analysés ont été issus à la fois des données single-cell du laboratoire et des travaux de Ma et al³². A) Une forte expression de ces gènes angiogéniques est observée dans la sous-population pro-angiogénique (Mph-Pro-Angio), par rapport aux autres sous-populations (anti-inflammatoire, pro-inflammatoire, homéostatique, etc.). B) Dans la sous-population angiogénique, l'expression de ces marqueurs angiogéniques après traitement par oHSV est augmentée par rapport au PBS, mais est fortement diminuée avec oHSV-P2G.

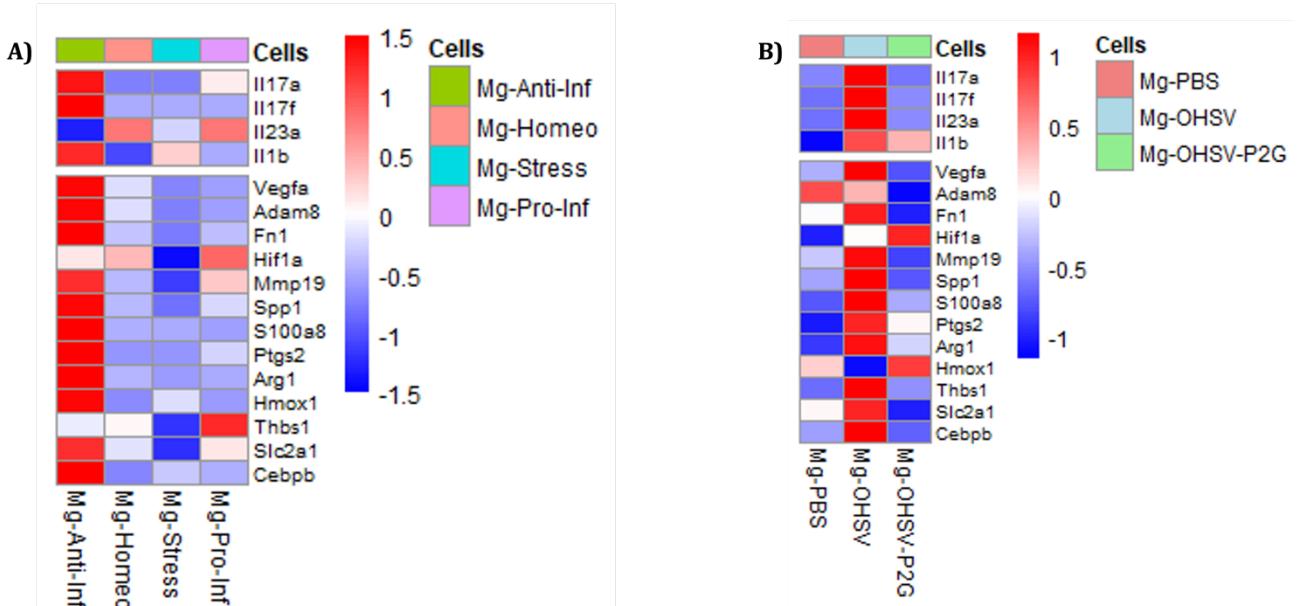


Figure 2.4 – Expression des marqueurs angiogéniques dans les sous-populations de microglie (A), ou plus spécifiquement dans la sous-population anti-inflammatoire après traitement au PBS, oHSV ou oHSV-P2G (B). Les données sont issues d'une analyse single-cell RNA sequencing réalisée sur des cerveaux de souris C57Bl6 greffées avec des cellules tumorales GL261N4. Les gènes angiogéniques analysés ont été issus à la fois des données single-cell du laboratoire et des travaux de Ma et al³². A) Aucune sous-population pro-angiogénique de la microglie est observée. Cependant, une forte expression des gènes angiogéniques est observée dans la sous-population anti-inflammatoire (Mg-Anti-Inf), par rapport aux autres sous-populations. B) Dans la sous-population anti-inflammatoire, l'expression de ces marqueurs angiogéniques après traitement par oHSV est augmentée par rapport au PBS, mais est fortement diminuée avec oHSV-P2G.

La même analyse a été réalisée sur les cellules de la microglie (**Figure 2.4**). Contrairement aux macrophages, aucune sous-population clairement pro-angiogénique n'a été identifiée dans ces cellules. Toutefois, une expression élevée de ces marqueurs pro-angiogéniques a été observée dans la population microgliale anti-inflammatoire (**Figure 2.4.A**). Comme pour les macrophages, leur expression augmente après traitement par oHSV, puis diminue avec le traitement oHSV-P2G (**Figure 2.4.B**).

Ces données préliminaires permettent d'émettre l'hypothèse qu'une sous-population de TAMMs pro-angiogéniques pourrait participer à la néovascularisation du glioblastome, suite à l'infection par oHSV. De plus, elles suggèrent que le traitement oHSV-P2G interférerait avec cet effet secondaire néfaste de la virothérapie.

2.2 Objectifs du mémoire

L'objectif de ce mémoire vise à confirmer ces résultats préliminaires de *single-cell RNA sequencing* obtenus *in vivo*, par l'analyse de cryosections de cerveau de souris par immunofluorescence. De plus, l'objectif sera également de démontrer l'impact de oHSV-P2G *in vitro* sur la production de facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales ainsi que par les macrophages ou la microglie.

Tout d'abord, des immunofluorescences permettront de visualiser la superficie occupée par les vaisseaux sanguins et leur localisation dans le cerveau, mais aussi d'analyser les populations de lymphocytes T anti- et pro-inflammatoires. Ensuite, les marqueurs pro-angiogéniques analysés par *Single-cell RNA-seq* seront étudiés par RT-qPCR. L'effet du virus oHSV-P2G, qui exprime l'antagoniste de CXCL12, sera comparé à celui du virus oHSV non armé. Nous avons évalué la possibilité d'utiliser 2 modèles cellulaires *in vitro* : les macrophages dérivés de monocytes (MDMs, *monocytes derived macrophages*) ou une lignée de microglie humaine (HMC3). Les MDM correspondent à des cellules qui peuvent être recrutées dans le cerveau suite à l'apparition de la tumeur. Les HMC3 correspondent à la microglie résidente du cerveau. En raison de la variabilité des monocytes dérivés du sang périphérique (MDMs) provenant de *buffy coats*, les cellules microgliales HMC3 ont été choisies comme modèle d'étude. Enfin, des expériences de tubulogenèse avec des HUVEC (cellules endothéliales humaines) seront réalisées pour déterminer l'impact d'oHSV-P2G sur la formation de structures tubulaires *in vitro*.

Chapitre 3

Matériels et Méthodes

3.1 Culture cellulaire

Les cellules croissent dans des milieux de culture enrichis avec des facteurs de croissance, qui varient en fonction du type cellulaire utilisé.

Des cellules de glioblastome humain ont été récupérées chez un patient par le laboratoire de Bernard Rogister (ULiège – CHU). Ces cellules primaires ont été étiquetées « GB138 ». Elles sont cultivées dans un milieu DMEM High Glucose (Biowest), complémenté avec 10% serum (FBS, *Fetal Bovine Serum*, Gibco) et 1% de pénicilline/streptomycine (pen/strep, Gibco).

Les cellules HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, Lonza) sont des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine. Elles sont cultivées dans un milieu de culture EBM-2 enrichi avec 10ml de FBS, 0,2ml d'hydrocortisone, 2ml de hFGF, 500µL de VEGF, 500µL de R3-IGF-1, 500µL d'acide ascorbique et 500µL de hEGF (Lonza). Les différentes flasques et boîtes de culture utilisées pour les HUVEC sont au préalable coatées avec une solution de gélatine 0,2% (dilution dans du PBS) (Sigma).

Enfin, les cellules HMC3 (*Human Microglial Clone 3*) sont cultivées dans un milieu DMEM High Glucose, complémenté avec 10% de FBS et 1% de pen/strep.

Pour permettre la croissance cellulaire, toutes les cellules sont incubées à 37°C avec 5% de CO₂. Par ailleurs, toutes les manipulations se font dans un environnement stérile, sous hotte à flux laminaire.

3.1.1 Passage et amplification des cellules

Tout d'abord, le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées au PBS qui est ensuite enlevé. Une solution de trypsine est ajoutée, permettant le décrochement des cellules. Les boîtes de culture sont incubées pendant 5 minutes pour favoriser le détachement. Un volume de milieu équivalent au volume de trypsine est ajouté de manière à neutraliser celle-ci. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 220-250 rcf. Le surnageant est jeté, et les cellules sont resuspendues dans du milieu, dont le volume est ajusté en fonction des manipulations effectuées. Les cellules fraîchement passées sont remises dans l'incubateur à 37°C.

3.1.2 Milieux conditionnés

D'une flasque T75 contenant des GB138 confluentes, le milieu est retiré, puis la flasque est rincée avec du PBS. Ensuite, 10 ml de DMEM/F-12 (Gibco), supplémenté avec 1 % de pen/strep et dépourvu de FBS, sont ajoutés. Un volume de virus équivalent à 1 MOI (*Multiplicity of Infection*) est éventuellement incorporé, avant de replacer la flasque en incubation pour 72 h. Enfin, les milieux de culture sont filtrés à l'aide d'une seringue et d'un filtre de 0,1 µm. Trois milieux conditionnés ont été utilisés dans nos expériences, à savoir le milieu de culture de GB138 non infectées (mNI), le milieu de culture de GB138 infectées par oHSV (mOHSV) et le milieu de culture de GB138 infectées par oHSV-P2G (mP2G).

3.1.3 Milieux conditionnés pour les cocultures GB138 – HMC3

Une coculture entre les cellules tumorales GB138 et les cellules microgliales HMC3 a été élaborée et puis mise au point par cytométrie en flux en vue de son utilisation dans les expériences de tubulogenèse.

Les cellules ont été ensemencées selon un ratio de 2/3 HMC3 pour 1/3 GB138 : $1,33 \times 10^6$ cellules GB138 et $6,6 \times 10^5$ cellules HMC3 ont été déposées dans des flasques T75, dans du milieu DMEM HG complémenté avec du FBS. Le milieu des T75 est ensuite retiré 48h après l'ensemencement pour être remplacé par du DMEM/f12 sans FBS. Puis, les cocultures sont infectées ou non selon un MOI de 1. Après 72 heures d'incubation, les milieux sont récupérés et filtrés à l'aide de filtres de 1 µm montés sur seringue.

3.1.4 Tubulogenèse

Les cellules sont prétraitées pendant 24h avec les différents traitements souhaités. Ensuite, dans une plaque 96 puits stérile, 35 µL de Matrigel (Corning) sont déposés par puits. La plaque est incubée à 37 °C pour permettre la polymérisation du gel. Pendant la polymérisation, les cellules à ensemencer sont trypsiniées, puis comptées grâce à une coloration Hoechst. Une suspension cellulaire est préparée dans du milieu de culture, de manière à avoir 8000 cellules dans 100 µL par puits, selon le nombre de puits nécessaires. 100 µL de cette suspension sont ajoutés directement dans chaque puits, sur le Matrigel. Le tout est incubé à 37 °C pendant 6 heures.

Après cette incubation, les puits sont observés au microscope Olympus 4X et des images des structures tubulaires formées sont capturées. La formation des tubes est ensuite analysée et quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

3.2 **Expériences *in vivo***

Des expériences *in vivo* ont été réalisées sur des souris C57Bl6, préalablement à mon arrivée au laboratoire. Dans celles-ci, 100.000 cellules GL261N4 (cellules de gliomes murins exprimant la nectine humaine) ont été injectées intracérébralement. Le jour de la greffe correspond au jour J0. Sept jours (J7) et quatorze jours (J14) post-greffe, les souris ont reçu 2 µL de traitement : PBS, oHSV ou oHSV-P2G (10^6 pfu). Ces injections ont été réalisées de manière stéréotaxique dans le striatum droit du cerveau à 2 mm à droite, 0.5 mm en haut, 2.5 mm en bas par rapport au bregma. À J21, les souris ont été euthanasiées avec de l'euthasol. Elles ont ensuite été perfusées à la saline (PBS EDTA), puis à la PAF 4%. Les cerveaux ont ensuite été mis 24h dans la PAF 4%, puis dans du sucre 30% pendant 48h. Ensuite, ils ont été encastrés dans de l'OCT et maintenus à -80°C jusqu'à la réalisation des coupes de 14µm au cryostat. Les coupes de cerveaux ont ensuite été déposées sur des lames superfrost™.

3.3 **Immunofluorescence (IF)**

L'immunofluorescence a été réalisée sur les coupes de cerveau de souris C57Bl6 traitées ou non au oHSV ou oHSV-P2G. Tout d'abord, les lames sont rincées au PBS pendant 5 min en réalisant des mouvements de va-et-vient (up and down), puis séchées pendant 30 min à 60°C. Elles sont ensuite recouvertes de paraformaldéhyde (PAF) 4% pendant 15 min sous hotte. Les bains suivants sont réalisés successivement pendant 5 min à température ambiante (RT) dans l'ordre suivant : EtOH 50%, EtOH 70% et EtOH 100%. Si les coupes nécessitent un démasquage, elles sont immergées dans un buffer Tris 10 mM - EDTA 1 mM pH 9,0, puis autoclavées 3 min à 120°C. Cette étape améliore la détection et l'accessibilité des épitopes par leurs anticorps. Ensuite, les membranes sont perméabilisées avec une solution PBS-Triton 0,1%, pendant 10 min à RT. Une incubation de True Black (1/20 dans EtOH 70%) est réalisée pendant 30 secondes à RT, suivie de trois lavages de 5 min au PBS. Les lames sont ensuite couvertes de Normal Fetal Serum 10% pendant 2 h, puis incubées overnight à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS (voir **Annexes**). Le lendemain, après trois lavages de 5 min au PBS, l'anticorps secondaire (1:250 dans du PBS) est appliqué sur les lames pendant 1 h à RT, à l'abri de la lumière. Trois nouveaux lavages de 5 min au PBS sont ensuite réalisés. Les lames sont incubées avec du Hoechst (1:50 000, dans de l'eau désoxygénée) 10 min à RT, puis rincée avec de l'eau distillée pendant 1 min. Enfin, elles sont laissées à sécher avant l'application de 70 µL de Mowiol pour coller la lamelle sur la lame. Les lames sont conservées à l'abri de la lumière, à 4°C.

Les coupes sont observées à l'Axioscan et analysées via le programme d'analyse d'images QuPath⁷⁹.

3.3.1 Prise de vue au microscope Axioscan

Les lames marquées par IF ont été observées au grossissement 20X de l'Axioscan (Zeiss). Les réglages appliqués aux différents canaux (channels) sont repris dans les **Annexes**.

3.3.2 Analyse d'images sur QuPATH

Les différentes mesures provenant des marquages immunofluorescents ont été obtenues à l'aide du logiciel QuPath⁷⁹ (version 0.5.1) en utilisant son module de *machine learning* (apprentissage automatique). Cet apprentissage automatique de QuPath permet de segmenter et classer différents éléments de l'image, que ce soit au niveau des pixels ou des objets. Le *machine learning* doit être entraîné, dans un premier temps, manuellement sur des images tests. C'est-à-dire qu'il faut apprendre au logiciel à différencier certains pixels ou objets entre eux. Dans un deuxième temps, le modèle est optimisé en ajustant les différents paramètres de segmentation et en évaluant les performances sur ces images tests.

Pour toutes les immunofluorescences réalisées sur les coupes de cerveau de souris, QuPath devait être capable de différencier la tumeur du reste du cerveau (stroma). Ceci a été réalisé grâce à un *machine learning pixel classifier Random trees (Rtree)* avec une résolution *Very Low* (11.04 µm/px). Les paramètres des *features* ont été modifiés en sélectionnant les canaux DAPI et EGFP, en activant tous les *scales* et en choisissant les filtres "*Gaussian*", "*Laplacian of Gaussian*" et "*Weighted deviation*". Ensuite, en fonction du marquage, un second *classifier* a été développé.

En ce qui concerne les coupes dont les CD31 ont été marqués, le second *classifier* développé est également un *pixel classifier Random tree*. La résolution de ce *classifier* a été ajustée à *High* (0,91 µm/px). Les paramètres des *features* ont été modifiés en sélectionnant uniquement le canal Cy5, en activant tous les *scales* et en choisissant les filtres "*Gaussian*" ainsi que les 3 filtres "*Hessian eigenvalue*". Un script a ensuite été créé pour combiner les deux modèles *pixel classifiers* et recevoir une analyse précise des marquages CD31 dans et en dehors de la tumeur.

Par rapport aux marquages CD8+, Foxp3+ et CD4+, les cellules ont d'abord été identifiées grâce au logiciel de *deep learning* StarDist⁸⁰ en détectant les noyaux marqués au DAPI. Ensuite, un *object classifier* a été développé pour les marquages CD8+/Foxp3+ et un autre pour les marquages CD4+. Aucun paramètre n'a été modifié. Ces *object classifiers* permettent de différencier les CD8+/Foxp3+/CD4+ des autres cellules. Comme pour CD31, les 3 modèles (cerveau vs stroma ; StarDist ; détections CD8+/Foxp3+ ou CD4+) ont été associés dans un même script de manière à recevoir ensuite une analyse précise des CD8+/Foxp3+ ou des CD4+ dans et en dehors des tumeurs.

3.4 Extraction d'ARN et RT-qPCR

200 000 cellules HMC3 sont mises en culture dans des plaques à 6 trous pendant 48 heures, selon les conditions détaillées dans le Tableau 4. L'ARN est extrait à l'aide du kit « *NucleoSpin® RNA Kit* » (Macherey-Nagel) et sa concentration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre *NanoDrop*. La transcription inverse en ADN complémentaire (cDNA) est réalisée avec le kit « *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* » (Thermo Scientific).

Pour l'amplification par qPCR, un mélange réactionnel est préparé, contenant 4 µL de cDNA (2,5 ng/µL), 1 µL d'un mix d'amorces spécifiques aux ARNm cibles (4 µM, voir **Annexes**) et 5 µL de SYBR Green. Chaque condition expérimentale est réalisée en triplicata. L'amplification qPCR est effectuée sur un thermocycleur *LightCycler 480 Real-Time PCR System* (Roche), en suivant le protocole suivant : activation de l'enzyme (3 min à 95°C), amplification sur 45 cycles (5 s à 95°C, 30 s à 60°C), génération de la courbe de fusion (10 s à 95°C, 10 s à 60°C, montée à 95°C) et phase de refroidissement (10 s à 40°C). L'expression relative des ARNm est déterminée à partir des valeurs de Ct (*threshold cycle*), qui correspondent au cycle où la fluorescence du signal d'amplification dépasse le seuil défini par le thermocycleur. Les résultats sont normalisés en utilisant TBPh comme gène de référence (*housekeeping gene*).

Chapitre 4

Résultats

4.1 Analyse par immunofluorescence de l'infiltration immunitaire et de la vascularisation dans le glioblastome

4.1.1 Effet de oHSV-P2G sur l'infiltration des cellules CD4+, CD8+ et Foxp3+ dans la tumeur

Afin d'évaluer l'impact de oHSV-P2G sur l'infiltration des lymphocytes T dans le glioblastome, un marquage par immunofluorescence (IF) des principales sous-populations de lymphocytes T a été réalisé sur des coupes de cerveaux de souris C57Bl6 atteintes de glioblastome (greffe de cellules GL261N4) et traitées ou non. Les cellules T CD4+, CD8+ et Foxp3+ ont été quantifiées à l'aide d'une combinaison des logiciels Stardist⁸⁰ et QuPath⁷⁹, permettant une détection automatisée des cellules marquées dans différentes régions du cerveau. En résumé, StarDist a été utilisé pour détecter de manière automatique les cellules sur les images, tandis que QuPath a permis de distinguer les cellules marquées des cellules non marquées. Trois conditions expérimentales ont été comparées : injection de PBS (contrôle), injection de oHSV et injection de oHSV-P2G. Les données ont été séparées selon les hémisphères droit (site de la greffe tumorale) et gauche du cerveau.

La **Figure 4.1** présente ainsi la distribution des lymphocytes T helper (CD4+), T cytotoxiques (CD8+) et T régulateurs (Foxp3+) dans les hémisphères gauche (HG) et droit (HD) du cerveau, permettant d'observer l'effet du traitement sur l'infiltration de ces cellules. Tout d'abord, quel que soit le traitement administré, l'ensemble des sous-populations de lymphocytes T est plus abondant dans l'hémisphère droit, correspondant au site d'implantation de la tumeur, comparé à l'hémisphère gauche. La présence de T CD4+ augmente après injection d'oHSV ou d'oHSV-P2G par rapport au contrôle et ce, dans les deux hémisphères. Bien qu'elle soit observée tant avec le virus armé qu'avec le virus non armé, cette augmentation est plus marquée suite au traitement avec oHSV-P2G. Néanmoins, ces augmentations en T CD4+ ne sont pas

statistiquement significatives, sauf dans l'hémisphère gauche où le recrutement de T CD4+ après un traitement par oHSV-P2G est statistiquement plus important qu'après le traitement au PBS.

La quantité de T CD8+ suit la même tendance que celle des T CD4+ avec une augmentation de leur quantité dans la condition oHSV-P2G. Toutefois, cette augmentation est significative, cette fois-ci, dans l'hémisphère droit, correspondant au site d'injection de la tumeur.

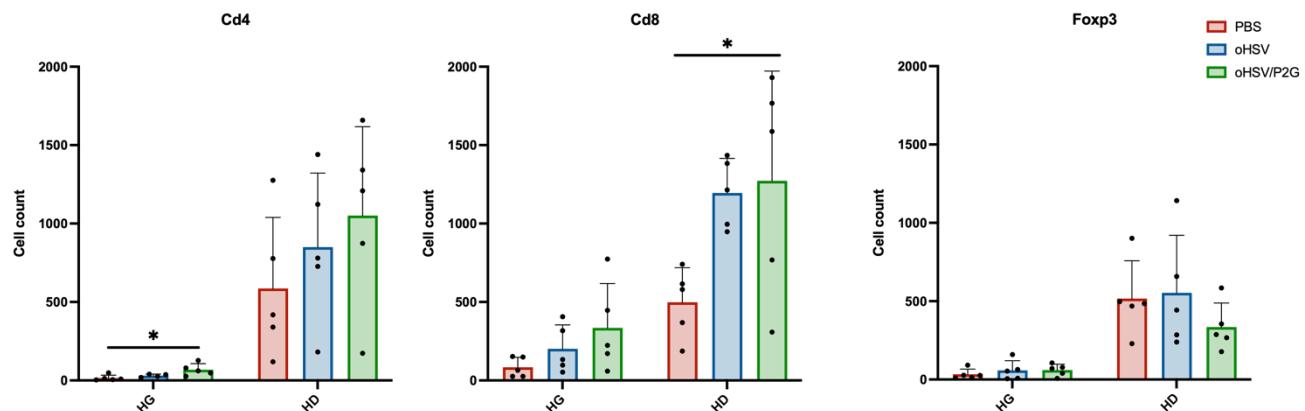


Figure 4.1 – Nombre de cellules des sous-populations de cellules T dans les hémisphères gauche et droit de cerveaux de souris C57Bl6 atteintes de glioblastome, traitées par PBS, oHSV ou oHSV-P2G. 5 souris ont été utilisées pour chaque condition, les données représentées en sont la moyenne et chacun des points du graphique correspond à une souris. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. Les statistiques ont été faites avec un test one-way ANOVA (pas de symbole = non significatif; * = p-valeur $\leq 0,05$). L'infiltration des sous-populations de cellules T est globalement plus élevée dans l'hémisphère droit (site tumoral) pour toutes les conditions. Le traitement oHSV-P2G augmente significativement le nombre de CD4+ dans l'hémisphère gauche et le nombre de CD8+ dans l'hémisphère droit. Les Foxp3+ montrent une légère augmentation non significative dans l'hémisphère gauche et une tendance à la baisse à droite avec le traitement oHSV-P2G. Abréviations : hémisphère gauche du cerveau (HG), hémisphère droit du cerveau (HD). Figure réalisée avec GraphPad Prism.

Les cellules Foxp3+, correspondant aux lymphocytes T régulateurs, sont quant à elles relativement rares dans l'hémisphère gauche, quelles que soient les conditions de traitement. En revanche, dans l'hémisphère droit, cette infiltration est nettement plus importante et tend à diminuer en réponse au traitement par oHSV-P2G, sans que la différence ne soit statistiquement significative (**Figure 4.1**). L'observation des coupes histologiques montre également cette tendance qui est appuyée par le calcul du ratio CD8+/Foxp3+ qui augmente significativement dans la condition oHSV-P2G par rapport au contrôle (PBS), reflétant une diminution des cellules Treg et une augmentation des lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) (**Figure 4.2**).

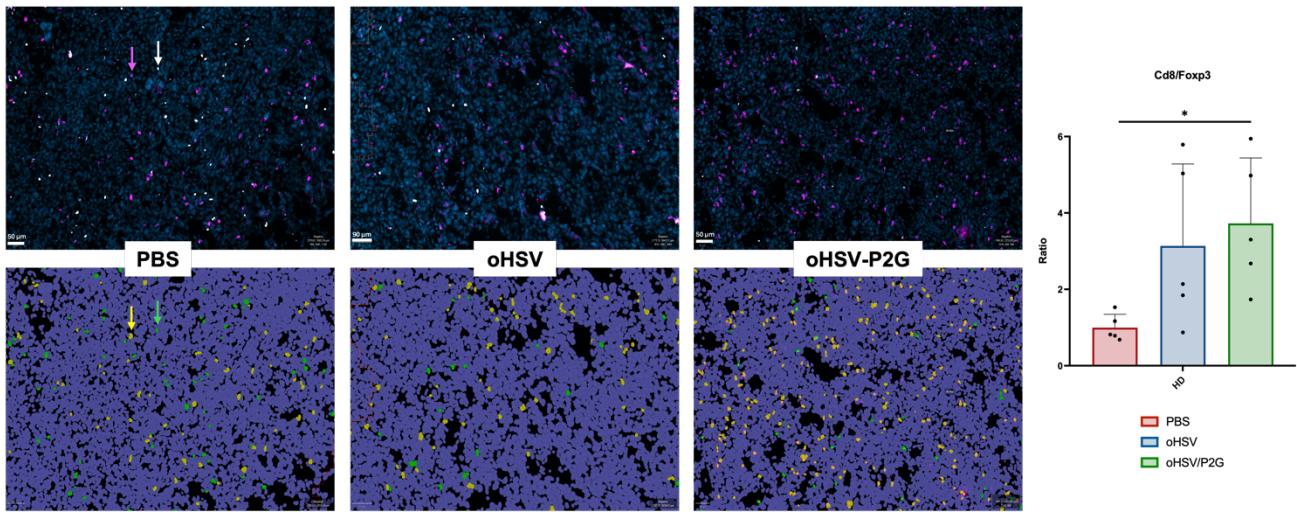


Figure 4.2 – Mise en évidence par immunofluorescence des cellules T CD8+ par rapport au nombre de Treg (Foxp3+) dans l'hémisphère droit (HD) de cerveaux de souris C57Bl6 atteintes de glioblastome, traitées par PBS, oHSV ou oHSV-P2G. 5 souris ont été utilisées pour chaque condition, les données représentées en sont la moyenne et chacun des points du graphique correspond à une souris. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. Les statistiques ont été faites avec un test one-way ANOVA (pas de symbole = non significatif; * = p-valeur <= 0,05). Les coupes histologiques montrent une baisse du nombre de Foxp3+ et une augmentation du nombre de CD8+ suite à l'infection par oHSV-P2G par rapport à la condition PBS. Ces tendances sont appuyées par le calcul du ratio CD8+/Foxp3 qui augmente significativement avec le traitement oHSV-P2G par rapport au PBS. Flèches : rose = CD8+ marqué par IF; blanche = Foxp3+ marqué par IF; jaune = CD8+ détecté par QuPath ; vert = Foxp3+ détecté par QuPath. Figure réalisée avec GraphPad Prism et PowerPoint.

4.1.2 Impact de oHSV-P2G sur la vascularisation tumorale

Afin d'évaluer l'impact de oHSV-P2G sur l'angiogenèse intra- et extra-tumorale, un marquage par immunofluorescence (IF) du marqueur endothéial CD31 a également été réalisé sur les coupes cérébrales décrites dans le point précédent (4.1.1). Le marquage CD31, détecté par QuPath⁷⁹, a été quantifié en mesurant l'aire des structures vasculaires positives (exprimée en μm^2). Pour chaque coupe, la somme des aires détectées a été calculée, reflétant ainsi la surface totale occupée par les vaisseaux sanguins dans les différentes régions analysées. Les analyses ont été séparées selon les hémisphères droit (site de la greffe tumorale) et gauche du cerveau. De plus, au sein de l'hémisphère droit, les données ont été distinguées entre la région tumorale et la zone périphérique (extra-tumorale). Trois conditions expérimentales ont été comparées : injection de PBS (contrôle), injection de oHSV et injection de oHSV-P2G.

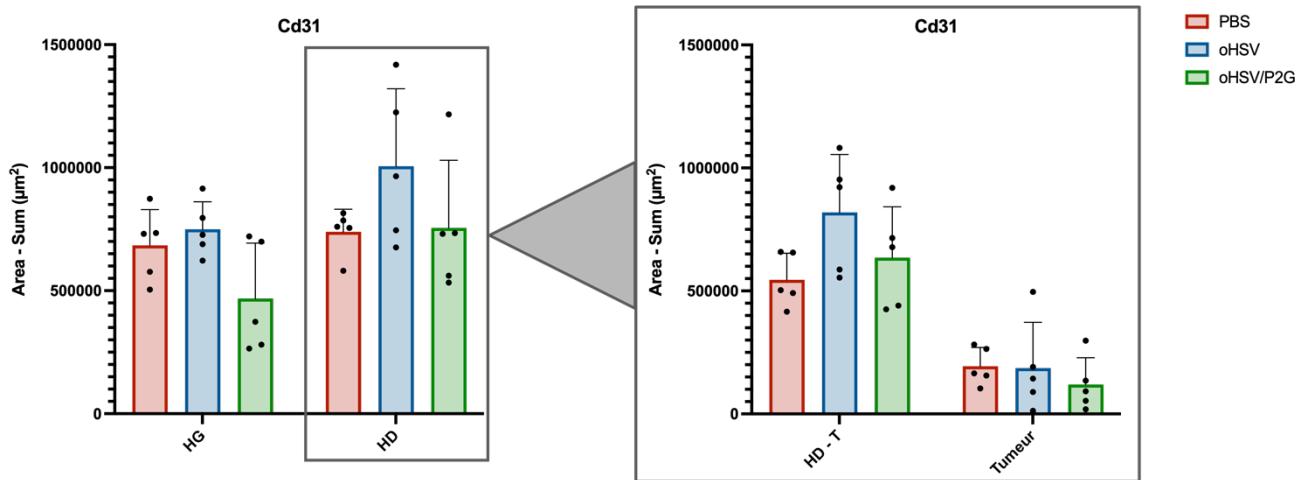


Figure 4.3 – Somme des aires des vaisseaux sanguins dans des cerveaux de souris C57Bl6 atteintes de glioblastome, traitées par PBS, oHSV ou oHSV-P2G. 5 souris ont été utilisées pour chaque condition, les données représentées sont la moyenne et chacun des points du graphique correspondent à une souris. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. Les statistiques ont été faites avec un test one-way ANOVA (pas de symbole = non significatif ; * = p-valeur <= 0,05 ; ** = p-valeur <= 0,01 ; *** = p-valeur <= 0,001 ; **** = p-valeur <= 0,0001). Le traitement oHSV augmente la surface vasculaire totale dans les deux hémisphères. Le traitement oHSV-P2G réduit la vascularisation dans l'hémisphère gauche (HG) et dans la tumeur, mais l'augmente dans l'hémisphère droit extra-tumoral (HD-T) par rapport au contrôle. Aucune variation n'est statistiquement significative. Abréviations : hémisphère gauche du cerveau (HG), hémisphère droit du cerveau (HD), hémisphère droit extra-tumoral (HD-T). Figure réalisée avec GraphPad Prism et PowerPoint.

La **Figure 4.3** montre une augmentation de la surface vasculaire totale marquée par CD31 dans le groupe oHSV, par rapport au contrôle (PBS), aussi bien dans l'hémisphère droit (HD) que dans l'hémisphère gauche (HG). Le traitement par oHSV-P2G, quant à lui, entraîne une diminution de la surface occupée par les structures CD31+ dans l'hémisphère gauche par rapport aux deux autres conditions, tandis qu'aucune variation n'est observée dans l'hémisphère droit par rapport au PBS. Une analyse plus fine de l'hémisphère droit révèle une augmentation de la vascularisation dans la zone extra-tumorale de l'hémisphère droit (HD-T) avec oHSV et oHSV-P2G comparé à PBS. La vascularisation dans la condition oHSV est plus élevée que celle dans la condition oHSV-P2G. En revanche, dans la zone tumorale (tumeur), la vascularisation est similaire entre les groupes PBS et oHSV, tandis qu'elle diminue avec un traitement par oHSV-P2G. Cette réduction dans la tumeur compense l'augmentation observée en périphérie, ce qui explique l'absence de variation globale entre les groupes oHSV-P2G et PBS dans l'hémisphère droit. Aucune des variations observées n'atteint le seuil de significativité statistique.

4.1.3 Analyse par immunofluorescence de la morphologie des vaisseaux sanguins

Avec le marquage par immunofluorescence (IF) du marqueur endothéial CD31 réalisé sur les coupes cérébrales, la morphologie des vaisseaux sanguins a également pu être étudiée. Pour chaque coupe, la moyenne des aires détectées a été calculée, reflétant ainsi la taille moyenne d'un vaisseau sanguin (exprimée en μm^2) dans ou en dehors de la tumeur. Trois conditions expérimentales ont été comparées : injection de PBS (contrôle), injection de oHSV et injection de oHSV-P2G.

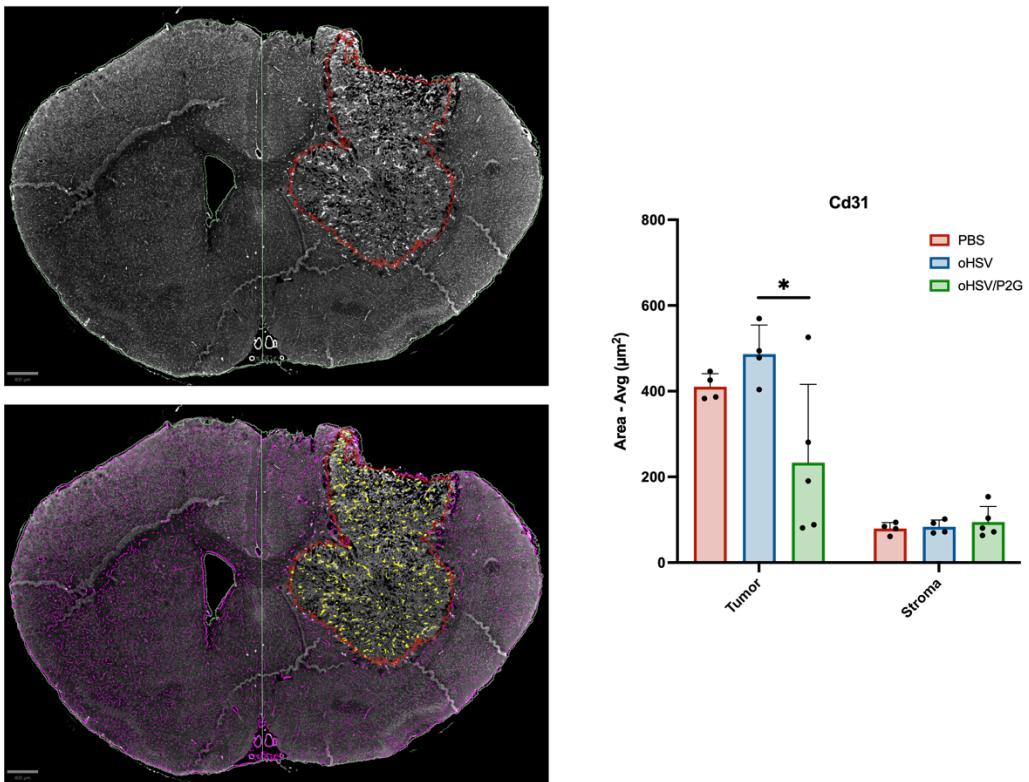


Figure 4.4 – Morphologie des vaisseaux sanguins dans et en dehors de la tumeur. 5 souris ont été utilisées pour chaque condition, les données représentées sont la moyenne et chacun des points du graphique correspond à une souris. Les barres d'erreur représentent les écarts-types. Les statistiques ont été faites avec un test one-way ANOVA (pas de symbole = non significatif ; * = p -valeur $\leq 0,05$). Les coupes histologiques montrent une différence morphologique entre les vaisseaux sanguins localisés dans la tumeur et ceux en dehors de la tumeur, traitée au PBS. Cette tendance est appuyée par le calcul de la moyenne de l'aire des vaisseaux sanguins. Dans la condition PBS, les structures CD31+ détectées dans la tumeur ont des aires plus grandes que les structures CD31+ détectées en dehors de la tumeur (Stroma). Marquage coupe histologique supérieure : blanc = CD31+ marqué par IF ; Marquages coupe histologique inférieure : mauve = CD31+ détecté par QuPath ; jaune = CD31+ détecté par QuPath.

Les coupes histologiques de la **Figure 4.4** correspondent à une coupe cérébrale de souris atteinte de glioblastome et traitée au PBS (contrôle). Elles montrent une différence morphologique entre les structures CD31+ localisées dans la tumeur (jaune) et celles localisées en dehors de la tumeur (mauve). En effet, les vaisseaux sanguins observés dans la tumeur apparaissent plus larges que ceux situés en dehors de la tumeur. Cette observation est confirmée par le calcul de la moyenne des aires détectées dans chaque coupe de souris. En condition contrôle, la taille moyenne d'un vaisseau sanguin est significativement plus élevée dans la tumeur que dans le stroma (zone extra-tumorale).

Quel que soit le traitement injecté, la taille moyenne des vaisseaux sanguins dans la zone extra-tumorale reste constante. Par contre, au sein de la tumeur, le traitement par le virus oncolytique oHSV entraîne une augmentation de la taille moyenne des structures CD31+ par rapport au contrôle. Le traitement par oHSV-P2G réduit significativement la taille moyenne d'un vaisseau sanguin au sein de la tumeur par rapport à oHSV. (**Figure 4.4**)

4.2 Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes angiogéniques dans des modèles cellulaires de glioblastome et de microglie humaine

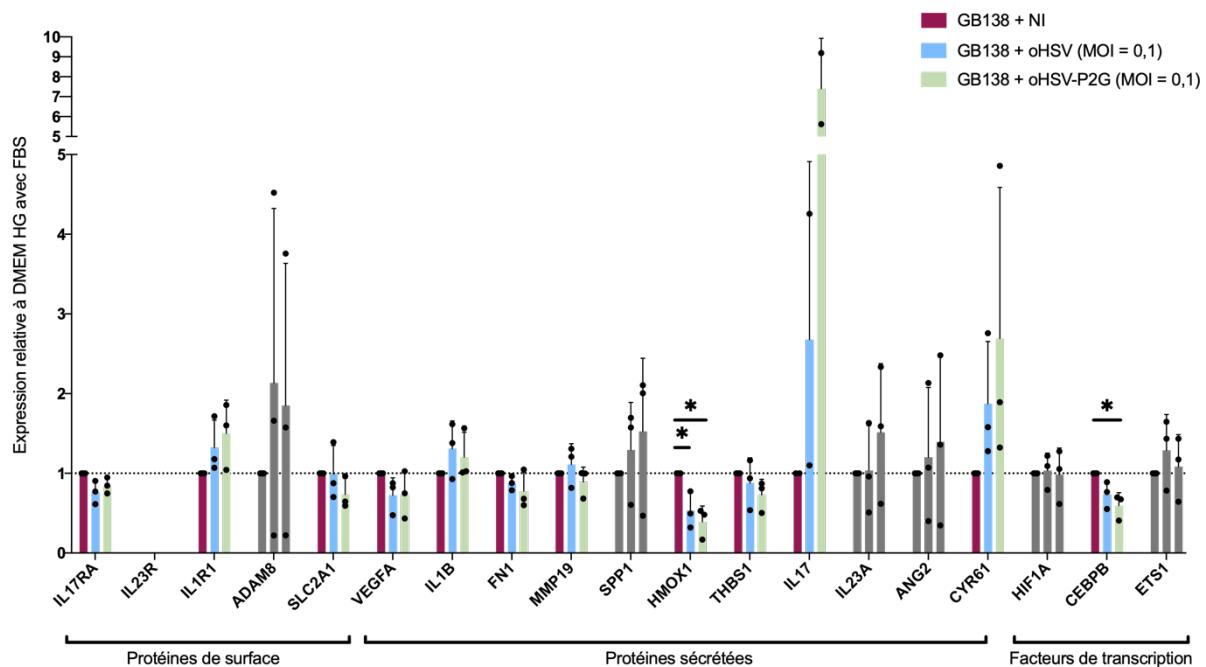
4.2.1 Effets de l'infection par oHSV-P2G sur l'expression des gènes angiogéniques par les cellules GB138

Tout d'abord, l'expression de gènes angiogéniques a été analysée par RT-qPCR sur des cellules de glioblastome (GB138). Les transcrits recherchés par RT-qPCR ont été choisis à la fois sur base des données *single-cell RNA-seq* du laboratoire (voir Données préliminaires) et de la littérature. Ils correspondent aux mêmes marqueurs angiogéniques utilisés pour évaluer la sous-population de macrophages pro-angiogéniques identifiée dans les données préliminaires. Cette analyse RT-qPCR vise à confirmer le rôle des cellules cancéreuses dans la régulation de l'angiogenèse. L'hypothèse principale suggère que l'infection des cellules cancéreuses par le virus oncolytique non armé oHSV augmente la production de facteurs angiogéniques par les cellules cancéreuses, tandis que le virus oncolytique armé oHSV-P2G diminue l'expression de ces gènes par rapport aux cellules non infectées.

Pour chacun des gènes, les valeurs mesurées dans la condition GB138 + NI ont été utilisées comme référence et fixées à 1 de manière à normaliser les données obtenues dans les autres conditions expérimentales. Les gènes dont l'expression présente une variabilité trop importante, c'est-à-dire donnant des résultats contradictoires entre les réplicas, et ne permettant donc pas de distinguer une augmentation ou une diminution claire ne seront pas interprétés (gènes grisés sur les graphiques).

Dans les cellules de glioblastome infectées par oHSV-P2G pendant 48h (GB138 + oHSV-P2G), 12 gènes sont interprétables. Parmi ceux-ci, quatre voient leur expression augmentée par rapport à celle observée dans les cellules non infectées (GB138 + NI). Ces surexpressions ne sont néanmoins pas significatives. À l'inverse, la présence d'oHSV-P2G diminue l'expression de 8 gènes par rapport à l'expression dans des cellules non infectées. Néanmoins, seules les diminutions de l'expression de HMOX1 et CEBPB sont significatives. Aucune différence significative n'est détectée entre les conditions mP2G et mOHSV. Le gène IL23R n'a été détecté dans aucune condition expérimentale. (**Figure 4.5.A**)

A) Expression des marqueurs angiogéniques par les GB138 infectées ou non pendant 48h



B) Expression des marqueurs angiogéniques par les GB138 infectées ou non pendant 72h

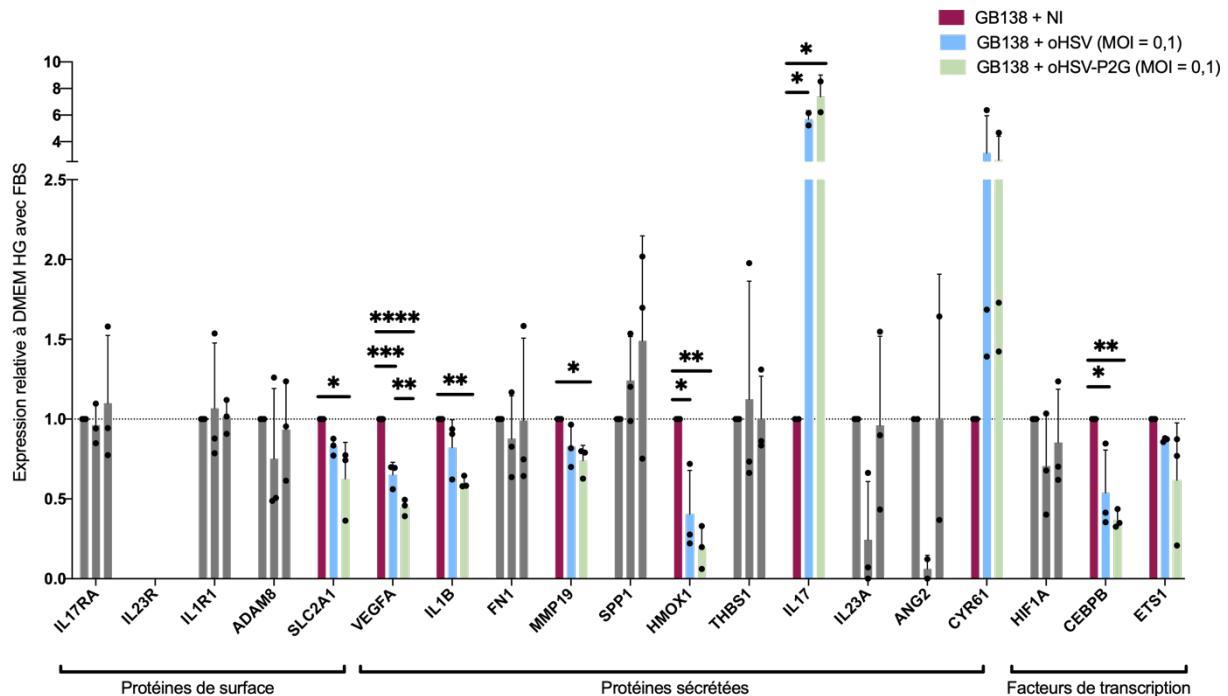


Figure 4.5 – Diminution de l'expression de VEGFA dans les cellules de GBM (GB138) infectées par oHSV-P2G pendant 72h. Les GB138 sont cultivées dans du milieu DMEM HG complémenté avec du FBS non-infecté (DMEM HG avec FBS), ou infecté avec un MOI de 0,1 de oHSV (oHSV), ou oHSV-P2G (P2G). Les GB138 sont cultivées dans ces conditions pendant A) 48h ou B) 72h. Puis, une extraction d'ARN suivie d'une reverse-transcription en cDNA est réalisée. Les cDNA sont ensuite amplifiés par qPCR. L'expression des différents gènes a été normalisée au housekeeping gene TBPh, et relativisée à la condition DMEM HG avec FBS. Pour chaque gène analysé en qPCR, les mesures ont été effectuées en triplicata. L'expérience a été réalisée trois fois indépendamment ($n=3$) ce qui correspond aux points, et les barres du graphique correspondent à la moyenne des trois réplicas. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques ont été faites avec un test 2way ANOVA (pas de symbole = non significatif ; * = p -valeur $\leq 0,05$; ** = p -valeur $\leq 0,01$; *** = p -valeur $\leq 0,001$; **** = p -valeur $\leq 0,0001$). ND : non détectable. Les gènes grisés sont les gènes dont l'expression présente une variabilité trop importante pour permettre de distinguer une augmentation ou une diminution claire. Figure réalisée avec GraphPad Prism.

Dans les GB138 infectées par oHSV-P2G pendant 72h (GB138 + oHSV-P2G), 2 gènes sur les 9 gènes interprétables, soit *IL-17* et *CYR61*, sont significativement surexprimés par rapport aux GB138 non infectées (GB138 + NI). En ce qui concerne *IL-17*, une surexpression significative est également observée dans les GB138 infectées par oHSV (GB138 + oHSV) par rapport à la condition non infectée. A contrario, 7 gènes présentent une expression réduite par rapport aux GB138 non infectées. Cette diminution est significative pour plus de la moitié de ces gènes, en particulier pour *VEGFA*, dont l'expression est la plus fortement affectée. De plus, l'expression de *VEGFA* est significativement plus faible dans les cellules infectées par oHSV-P2G pendant 72h que dans celles infectées par oHSV seul. Cette diminution d'expression de *VEGFA* est également significative dans les GB138 infectées par oHSV par rapport aux cellules non infectées. Aucune autre différence significative n'est détectée entre les conditions mP2G et mOHSV. Le gène *IL23R* n'a été détecté dans aucune condition expérimentale. (**Figure 4.5.B**)

4.2.2 Effets des milieux conditionnés des cellules GB138 infectées par oHSV-P2G sur l'expression des gènes angiogéniques dans les cellules HMC3

Le set de gènes a ensuite été analysé par RT-qPCR sur des cellules HMC3 exposées à du milieu conditionné de GB138 préalablement infectées ou non. Cette étude vise à vérifier l'hypothèse selon laquelle les cellules microgliales induisent l'expression de gènes angiogéniques en présence de mNI tandis que la présence de mP2G la diminue. Par ailleurs, au vu des résultats du *Single-cell RNA Seq* (voir Données préliminaires) et des immunofluorescences (voir 4.1.2), un impact positif sur l'angiogenèse après une infection par oHSV est également attendu.

Pour chacun des gènes, les valeurs mesurées dans la condition GB138 + NI ont été utilisées comme référence et fixées à 1 de manière à normaliser les données obtenues dans les autres conditions expérimentales. Les gènes dont l'expression présente une variabilité trop importante pour permettre de distinguer une augmentation ou une diminution claire ne seront pas interprétés.

Sur 5 gènes interprétables, 3 gènes sont surexprimés dans les cellules HMC3 en présence de milieu conditionné de GB138 infectées par oHSV-P2G (mP2G) par rapport aux cellules microgliales exposées au milieu conditionné de GB138 non infectées (mNI). Cependant, cette surexpression n'est significative pour aucun des gènes. À l'inverse, l'expression d'*ADAM8* et des *IL23A* est diminuée significativement en présence de mP2G. Une diminution de l'expression de ces deux gènes est également observée en présence de mOHSV bien que seule la diminution d'expression d'*ADAM8* est significative. Aucune différence significative n'a été détectée entre les conditions HMC3 + mOHSV et HMC3 + mP2G. Le gène *IL23R* n'a été détecté dans aucune condition expérimentale. (**Figure 4.6**)

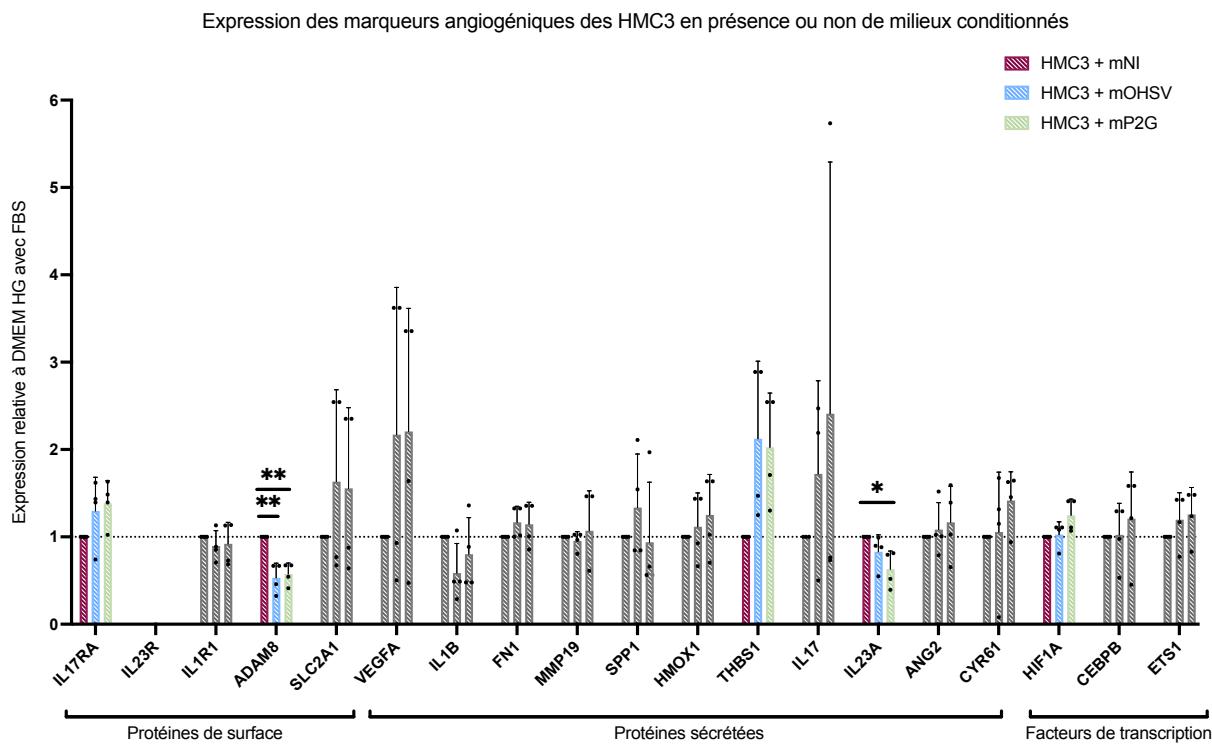


Figure 4.6 – Expression de marqueurs angiogéniques par la microglie (HMC3). Les HMC3 sont cultivées dans du milieu DMEM HG complémenté avec du FBS, ou dans des milieux conditionnés de cellules de GMB (GB138) non-infectées (mNI), ou infectées avec oHSV (mOHSV), ou oHSV-P2G (mP2G) avec un MOI de 1. Les HMC3 sont cultivées dans ces conditions pendant 48h. Puis, une extraction d'ARN suivie d'une reverse-transcription en cDNA est réalisée. Les cDNA sont ensuite amplifiées par qPCR. L'expression des différents gènes a été normalisée au housekeeping gene TBPh, et relativisée à la condition DMEM HG avec FBS. Pour chaque gène analysé en qPCR, les mesures ont été effectuées en triplicata. L'expérience a été réalisée quatre fois indépendamment ($n=4$) ce qui correspond aux points, et les barres du graphique correspondent à la moyenne des quatre réplicatas. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les statistiques ont été faites avec un test 2way ANOVA (pas de symbole = non significatif ; * = p -valeur $\leq 0,05$; ** = p -valeur $\leq 0,01$). ND : non détectable. Les gènes grisés sont les gènes dont l'expression présente une variabilité trop importante pour permettre de distinguer une augmentation ou une diminution claire. Figure réalisée avec GraphPad Prism.

4.3 Étude *in vitro* de la tubulogenèse endothéiale

4.3.1 Effet de CXCL12 et AMD3100 sur le nombre d'embranchements tubulaires

Tout d'abord, les effets de CXCL12 et de son antagoniste AMD3100 sur la formation de structures tubulaires ont été testés *in vitro* sur des HUVEC par tubulogenèse (**Figure 4.7.A**). Cette expérience vise à démontrer que CXCL12 favorise la formation de structure tubulaire via la voie CXCR4, tandis que AMD3100, inhibiteur de celle-ci approuvé par la FDA, réduit cette formation. Les nombres d'embranchements comptés dans les conditions CXCL12 20pM, AMD3100 10 μ M et AMD3100 10 μ M + CXCL12 20pM ont été relativisés à la condition EGM2, qui correspond au milieu de culture des HUVEC (voir Matériels et Méthodes).

L'ajout de CXCL12 20 pM n'entraîne pas de variation significative du nombre d'embranchements par rapport au contrôle, suggérant un effet plafonné. Cependant, la présence d'AMD3100 10 μ M induit une diminution significative de la formation de structures tubulaires par rapport à la condition EGM2. Lorsque

CXCL12 et AMD3100 sont combinés, la capacité à former des tubes est partiellement rétablie par rapport à AMD3100 seul (p -value = 0,056), le nombre d'embranchements restant tout de même inférieur à celui mesuré avec CXCL12 seul. (**Figure 4.7.B**)

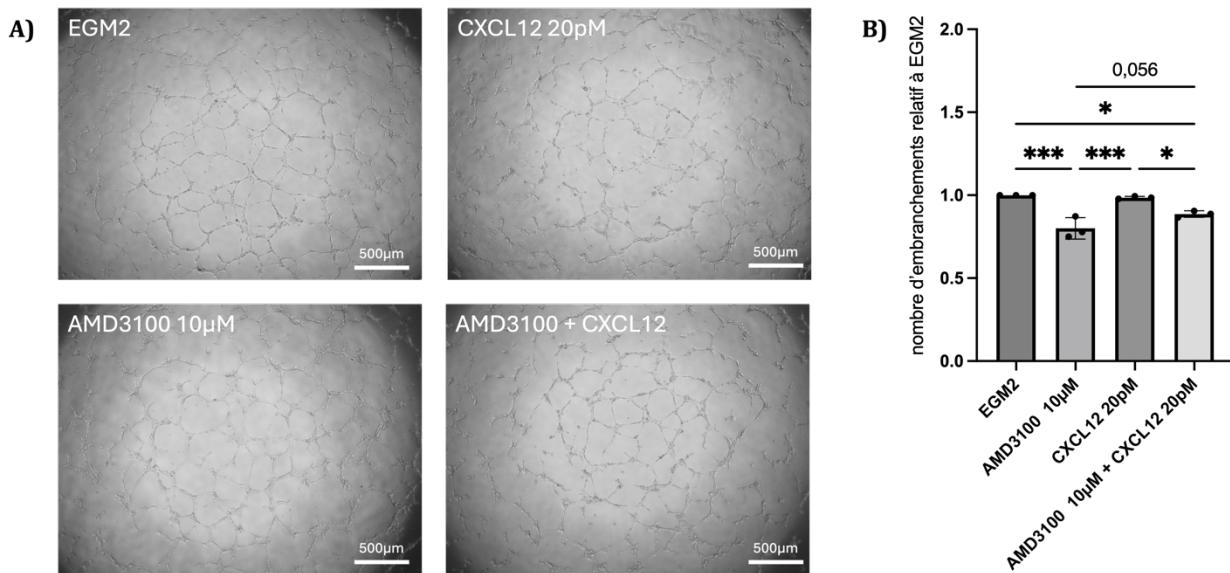


Figure 4.7 – Les effets angiogéniques in vitro de CXCL12 et AMD3100. Tubulogenèse sur des cellules HUVEC cultivées dans du EGM2 traité ou non avec AMD3100 10µM, CXCL12 20pM ou AMD3100 10µM + CXCL12 20pM. **A)** Images représentant les structures formées par les HUVEC sur le Matrikel en présence des différentes conditions. La barre indique 500µm. **B)** Pour chaque condition, 5 répliques techniques ont été réalisées. Le nombre d'embranchements de chaque réplica a été comptabilisé, puis une moyenne a été calculée. Ces moyennes ont ensuite été normalisées par rapport à celles de la condition EGM2. Cette procédure a été réalisée trois fois indépendamment ($n=3$) et chaque point du graphique représente un réplica biologique individuel. Les barres du graphique correspondent à la moyenne des trois répliques biologiques relativisée à la condition EGM2, et les barres d'erreur associées correspondent aux écarts-types. Les statistiques ont été faites avec un test one-way ANOVA (pas de symbole = non significatif ; * = p -valeur $< 0,05$; ** = p -valeur $<= 0,01$; *** = p -valeur $<= 0,001$). Figure réalisée avec GraphPad Prism.

4.3.2 Influence des milieux conditionnés de GB138 sur les structures tubulaires

Dans un premier temps, la capacité des cellules HUVEC à former *in vitro* des structures tubulaires en présence de milieu conditionné de cellules de glioblastome GB138 (mNI GB138) a été analysée afin de vérifier si ce milieu permet la formation de tubes (**Figure 4.8.A**). Dans un second temps, la formation de structures tubulaires *in vitro* en présence de milieux conditionnés produits à partir de cellules GB138 infectées par oHSV (moHSV GB138) ou par oHSV-P2G (mP2G GB138) sera analysée (**Figure 4.9**).

Les nombres d'embranchements comptés dans les conditions DMEM/f12 sans FBS et mNI GB138 ont été relativisés à la condition EGM2, qui est utilisée comme contrôle pour valider le bon fonctionnement de l'expérience. En effet, comme le confirme la **Figure 4.8.A**, les HUVEC sont capables de former *in vitro* des structures tubulaires dans leur milieu de culture EGM2.

Tel qu'expliqué dans les Matériels et Méthodes, le milieu DMEM/f12 sans FBS est utilisé pour produire les milieux conditionnés des GB138. Lorsque les HUVEC sont mises en présence de ce milieu seul, elles ne sont pas capables de former *in vitro* des tubes (**Figure 4.8.A**). Les embranchements des tubes dans

cette condition sont rares et leur nombre diminue significativement par rapport à la condition contrôle (EGM2) (**Figure 4.8.B**). En revanche, quand le DMEM/f12 sans FBS est mis en contact avec des cellules GB138 pendant 72 heures, produisant ainsi le milieu conditionné des cellules GB138 (mNI GB138), une augmentation significative de la tubulogenèse est observée par rapport à la condition DMEM/f12 sans FBS (**Figure 4.8.B**). Ainsi, en présence de milieu conditionné provenant de GB138, la capacité des HUVEC a formé des tubes *in vitro* est restaurée (**Figure 4.8.A**).

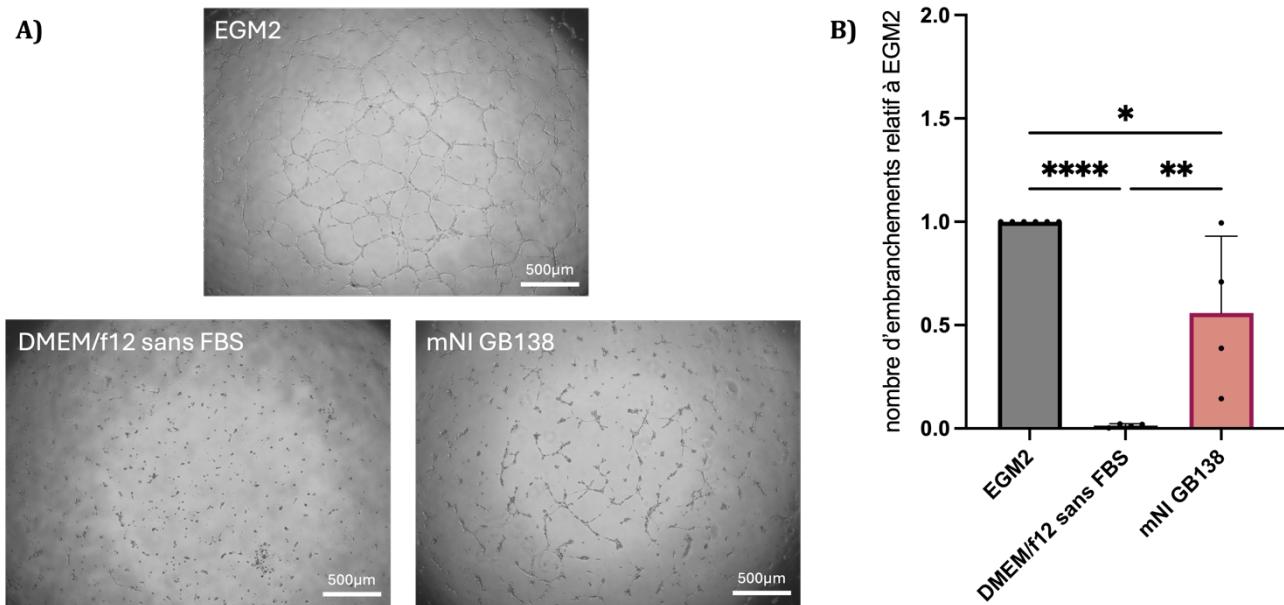


Figure 4.8 – Les effets angiogéniques *in vitro* du milieu DMEM/f12 sans FBS et du milieu conditionné de cellules de GBM (GB138) non-infectées (mNI GB138). A) Images représentant les structures tubulaires formées par les HUVEC sur le Matrigel lors de tests de tubulogenèse réalisés en présence de EGM2, DMEM/f12 sans FBS ou de milieux conditionnés provenant de GB138 non infectées. La barre indique 500µm. B) Pour chaque condition, 5 réplicas techniques ont été réalisés. Le nombre d'embranchements de chaque réplica a été comptabilisé, puis une moyenne a été calculée. Ces moyennes ont ensuite été normalisées par rapport à celle de la condition EGM2. Cette procédure a été réalisée quatre fois indépendamment ($n=4$) et chaque point du graphique représente un réplica biologique individuel. Les barres du graphique correspondent à la moyenne des quatre réplicas biologiques relativisée à la condition EGM2, et les barres d'erreur associées correspondent aux écarts-types. Les statistiques ont été faites avec un test one-way 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.

Afin de vérifier si l'hypothèse principale selon laquelle l'infection des cellules GB138 par oHSV-P2G diminue la formation de tubes est confirmée, des essais de tubulogenèse sont réalisés avec les milieux conditionnés de GB138 infectées par oHSV ou oHSV-P2G (**Figure 4.9.A**). Ces expériences visent également à confirmer les données du scRNASeq et les travaux de Kurozumi *et al.* (2008) qui démontrent une augmentation de l'angiogenèse suite à une infection par oHSV.

Le nombre d'embranchements des structures tubulaires compté dans les conditions mOHSV GB138 et mP2G GB138 a été relativisé à la condition mNI GB138, considérée comme étant égale à 1. Une diminution significative du nombre d'embranchements est observée en présence de milieu conditionné de GB138 infectées par oHSV (mOHSV GB138) par rapport au milieu conditionné de cellules non infectées (mNI GB138). De même, le milieu conditionné de GB138 infectées par oHSV-P2G (mP2G GB138) entraîne une réduction significative du nombre d'embranchements en comparaison à mNI GB138.

Aucune différence significative n'est détectée entre mOHSV GB138 et mP2G GB138, bien qu'une diminution soit observable. (Figure 4.9.B)

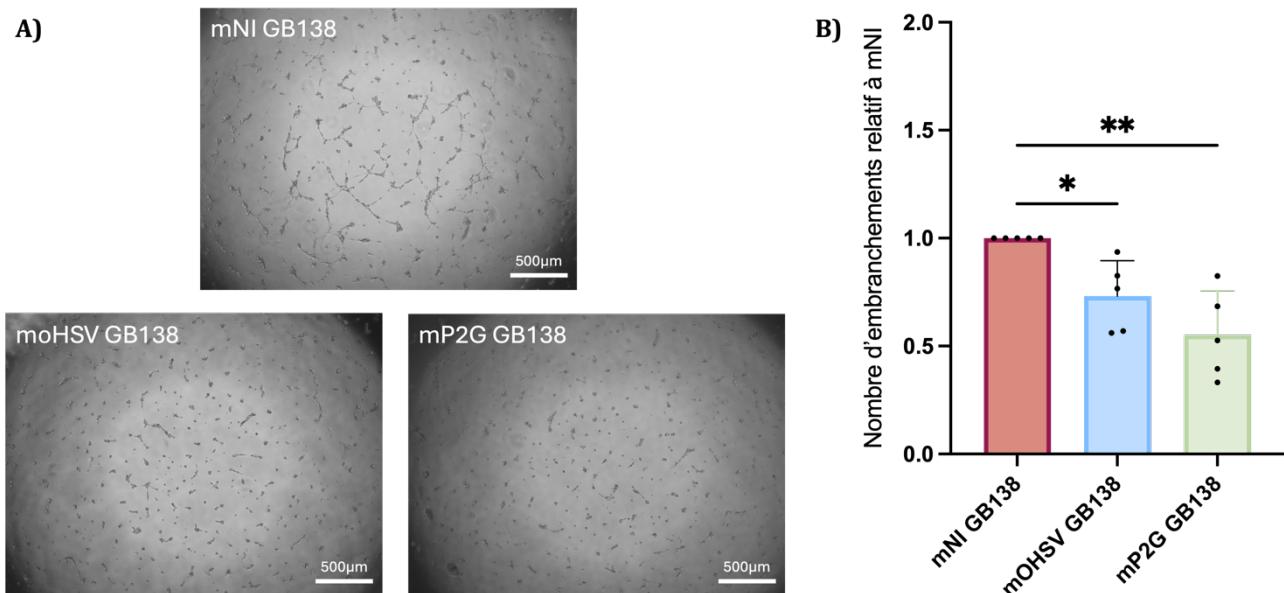


Figure 4.9 – Les effets angiogéniques in vitro des milieux conditionnés de cellules de GBM (GB138) non-infectées (mNI GB138) ou infectées par oHSV (moHSV GB138) ou par oHSV-P2G (mP2G GB138) avec un MOI de 1. A) Images représentant les structures formées par les HUVEC sur le Matrigel lors de tests de tubulogenèse réalisés en présence de milieux conditionnés provenant de GB138 infectées ou non. La barre indique 500µm. **B)** Pour chaque condition, 5 réplicas techniques ont été réalisés. Le nombre d'embranchements de chaque réplica a été comptabilisé, puis une moyenne a été calculée. Ces moyennes ont ensuite été normalisées par rapport à celle de la condition mNI. Cette procédure a été réalisée cinq fois indépendamment ($n=5$) et chaque point du graphique représente un réplica biologique individuel. Les barres du graphique correspondent à la moyenne des 5 réplicas biologiques relativisée à la condition mNI, et les barres d'erreur associées correspondent aux écarts-types. Les statistiques ont été faites avec un test one-way ANOVA (pas de symbole = non significatif; * = p -valeur $\leq 0,05$: ** = p -valeur $\leq 0,01$). Figure réalisée avec GraphPad Prism.

4.3.3 Impact des milieux conditionnés issus de cocultures GB138-HMC3 sur la formation de tubules

Ensuite, afin d'analyser l'influence des interactions entre les cellules de glioblastomes et la microglie sur l'angiogenèse, une expérience de tubulogenèse est réalisée avec différents milieux conditionnés issus soit de cellules GB138 non infectées, soit de cellules HMC3 non infectées, soit de cocultures entre des GB138 et des HMC3 infectées ou non par oHSV ou oHSV-P2G. Les données de la littérature suggèrent que les cellules microgliales, en interaction avec les cellules de glioblastome, sont capables d'augmenter la vascularisation dans le microenvironnement tumoral. Par ailleurs les données préliminaires obtenues en scRNASeq et immunofluorescence suggèrent que l'infection par oHSV augmente la tubulogenèse tandis que l'infection par oHSV-P2G tend à la diminuer.

Le nombre d'embranchements des structures tubulaires compté dans les différentes conditions a été relativisé à la condition mNI Coculture, considérée comme étant égale à 1.

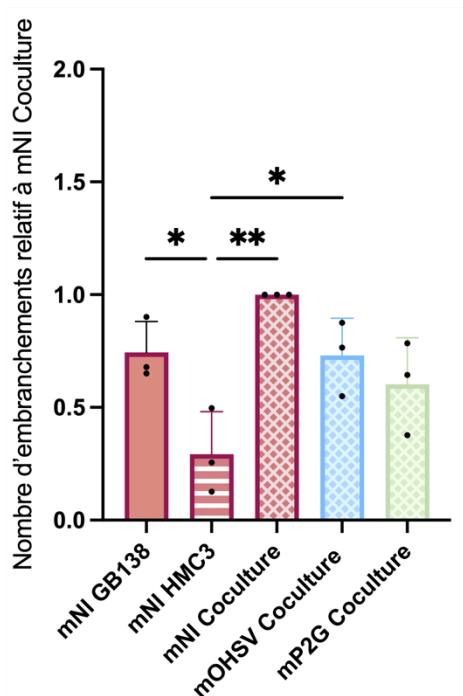


Figure 4.10 – Les effets angiogéniques *in vitro* des milieux conditionnés de cocultures entre les GB138 et les HMC3 non-infectées (mNI coculture) ou infectées par oHSV (mOHSV coculture) ou par oHSV-P2G (mP2G coculture) avec un MOI de 1. Pour chaque condition des tests de tubulogenèse, 5 répliques techniques ont été réalisées. Le nombre d'embranchements de chaque réplica a été comptabilisé, puis une moyenne a été calculée. Ces moyennes ont ensuite été normalisées par rapport à celle de la condition mNI Coculture. Cette procédure a été réalisée trois fois indépendamment ($n=3$) et chaque point du graphique représente un réplica biologique individuel. Les barres du graphique correspondent à la moyenne des 3 répliques biologiques relativisée à la condition mNI Coculture, et les barres d'erreur associées correspondent aux écarts-types. Les statistiques ont été faites avec un test one-way ANOVA (pas de symbole = non significatif; * = p -valeur $\leq 0,05$; ** = p -valeur $\leq 0,01$). Figure réalisée avec GraphPad Prism.

En présence de milieu conditionné provenant de cellules HMC3 (mNI HMC3), il y a une réduction significative du nombre d'embranchements par rapport au milieu conditionné de GB138 non infectées (mNI GB138). Cependant, quand les HMC3 sont cultivées en présence de GB138, la formation de structures tubulaires est restaurée. En effet, en présence de milieu conditionné issus de cocultures entre des GB138 et des HMC3 (mNI Coculture), le nombre d'embranchements est augmenté par rapport aux GB138 seules et aux HMC3 seules.

Les milieux conditionnés des cocultures infectées par oHSV (mOHSV Coculture) ou par oHSV-P2G (mP2G Coculture) entraînent une diminution non-significative du nombre d'embranchements comparé au milieu conditionné issu de la coculture non infectée (mNI Coculture). Une diminution est également observable entre les milieux conditionnés de coculture infectée par oHSV et oHSV-P2G, bien que cette réduction ne soit pas significative. (**Figure 4.10**)

Chapitre 5

Discussion

Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale maligne la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte. Il correspond à 50% de tous les gliomes. Le glioblastome est capable de développer un microenvironnement tumoral (MET) complexe caractérisé par une invasion des tissus voisins, une grande hétérogénéité, une hypervasculisation, une prolifération rapide et une forte immunosuppression. Ces processus contribuent à sa croissance agressive et à sa résistance aux traitements. En effet, malgré les thérapies standards actuelles, correspondant à une résection chirurgicale suivie d'une radiochimiothérapie, l'espérance de vie après le diagnostic reste de 15 mois et seulement 7 % des patients survivent au-delà de 5 ans. Cela est en partie dû à la capacité de certaines cellules cancéreuses présentant des propriétés de cellules souches, nommées GSCs, de migrer vers la zone sous-ventriculaire (SVZ) où elles sont protégées des traitements. Ces GSCs peuvent ensuite se différencier et régénérer une tumeur secondaire, généralement plus agressive qu'à l'origine. Il a été démontré que la capacité de migration des GSCs vers la SVZ était en partie médiée par la voie de signalisation CXCL12/CXCR4. Les cellules de la SVZ sécrètent CXCL12 qui se lie au récepteur CXCR4 exprimé à la surface des cellules tumorales. Par ailleurs, en plus d'induire la migration cellulaire, cet axe intervient dans de nombreux processus pro-tumoraux tels que l'angiogenèse ou encore l'immunosuppression. Dès lors, compte tenu du rôle multifonctionnel de la voie CXCL12/CXCR4 dans la progression du glioblastome, son inhibition représente une stratégie thérapeutique prometteuse. Dans cette optique, l'utilisation de la virothérapie oncolytique ciblant spécifiquement cette voie constitue une approche innovante, susceptible d'agir à la fois sur les cellules tumorales et sur plusieurs mécanismes tumorigènes, tout en limitant le risque de récidive du GBM.

Dans cette étude, le virus oncolytique utilisé est un herpèsvirus atténué (oHSV) et armé d'un inhibiteur de CXCR4 nommé P2G. Ce dernier agit comme un antagoniste de CXCL12, capable de se lier à CXCR4 sans l'activer, conduisant ainsi à une inhibition fonctionnelle de la voie. Les effets de ce virus oncolytique armé sur la migration des GSCs, la croissance tumorale ainsi que sur la polarisation et la phagocytose des TAMMs ont déjà été étudiés au laboratoire. L'objectif de ce mémoire était d'évaluer

l'impact de ce virus oncolytique armé, oHSV-P2G, sur les mécanismes angiogéniques dans le contexte du glioblastome.

L'angiogenèse, processus par lequel la tumeur induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, joue un rôle central dans la progression du glioblastome et constitue un marqueur de malignité. Cette vascularisation tumorale est principalement médiée par le facteur de croissance vasculaire endothérial (VEGF), dont l'expression est fortement augmentée dans les cellules de GBM, notamment dans des conditions d'hypoxie. Face à l'importance de ce mécanisme dans la tumorigénèse du glioblastome, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées au cours des dernières décennies pour cibler spécifiquement l'angiogenèse tumorale⁸¹.

Parmi ces approches, l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-VEGF, comme le bérvacizumab, a été évaluée dans de nombreux essais cliniques. Le bérvacizumab est le premier agent anti-angiogénique approuvé par la FDA et son utilisation contre les récidives de GBM a été autorisée en 2009. Malgré que ce traitement montrait une diminution de la taille de la tumeur, des œdèmes cérébraux et de certains symptômes cliniques, aucune amélioration significative de la survie globale n'a été démontrée. Des résultats similaires ont été rapportés avec d'autres stratégies anti-angiogéniques, incluant les protéines de fusion recombinantes, les inhibiteurs de tyrosine kinases ou encore les inhibiteurs de protéasomes. De plus, une résistance à l'inhibition de VEGF a fréquemment été observée grâce à une revascularisation par des voies alternatives comme par exemple via le mimétisme vasculaire ou bien la cooptation vasculaire. Ces mécanismes, qui ne dépendent pas directement de signaux angiogéniques classiques, permettent à la tumeur de contourner l'inhibition de VEGF et participent à l'échec thérapeutique observé, notamment en termes de survie globale⁸¹.

En conséquence, les approches anti-angiogéniques conventionnelles contre le GBM ont progressivement été abandonnées. Face à ces limites, Zhang *et al.* souligne la nécessité de développer des stratégies alternatives, capables de cibler l'angiogenèse de manière plus spécifique, tout en prenant en compte la complexité du microenvironnement tumoral⁸¹. Cela met en lumière l'intérêt de cibler des axes multifonctionnels, comme la voie CXCL12/CXCR4 impliquée non seulement dans l'angiogenèse, mais également dans la migration des cellules tumorales et l'immunomodulation.

Afin de mieux comprendre l'impact d'oHSV-P2G sur le microenvironnement tumoral, nous avons évalué à la fois l'infiltration des cellules immunitaires et la vascularisation tumorale tant *in vivo* qu'*in vitro*, ces deux processus étant liés à la voie de signalisation CXCL12/CXCR4. Nous discuterons dans un premier temps des résultats obtenus par immunofluorescence sur des sections cérébrales, en distinguant d'abord les effets du traitement sur l'immunité tumorale, puis sur les mécanismes angiogéniques. Dans un deuxième temps, nous analyserons les données de RT-qPCR relatives aux modèles cellulaires de glioblastome et de microglie humaine, avant d'interpréter les observations issues des essais de tubulogenèse.

5.1 oHSV-P2G remodèle l'immunité dans le microenvironnement du glioblastome en faveur d'un profil pro-inflammatoire

L'analyse par immunofluorescence sur des sections cérébrales de souris porteuses de GBM a révélé que par rapport au traitement au PBS, le traitement par virothérapie oncolytique (oHSV) permettait l'augmentation des lymphocytes T CD4+ et des lymphocytes T CD8+ non seulement dans la région du site d'implantation de la tumeur mais également, dans le tissus sain entourant la tumeur. Par ailleurs, cette augmentation du nombre de lymphocytes T CD4+ et T CD8+ est également observée en présence d'oHSV-P2G.

Les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ jouent un rôle essentiel dans la destruction des cellules tumorales et leur présence est souvent corrélée à un meilleur pronostic dans de nombreux cancers, y compris le GBM^{23,62,82}. Toutefois, la littérature rapporte que les cellules CD8+ infiltrées dans le GBM sont épuisées et non-fonctionnelles, ce qui compromet leur efficacité face aux immunothérapies et limite leur capacité à freiner la croissance tumorale^{21,23,34,36}. Récemment, Cao *et al.* (2024) ont montré que ces lymphocytes T CD8+ et en particulier ceux présentant un phénotype épuisé, expriment le récepteur CXCR4. Ces auteurs ont démontré que l'inhibition de CXCR4 permet de réduire cet état d'épuisement tout en favorisant l'infiltration de cellules T CD8+ naïves⁸³. Ces dernières peuvent alors se différencier en lymphocytes T cytotoxiques fonctionnels, capables de déclencher une réponse antitumorale efficace dans le MET. L'étude de Cao *et al.* suggère que l'épuisement des CD8+ médié par CXCR4 est orchestré par le facteur de transcription TOX, via l'activation de la voie de signalisation JAK2-STAT3⁸³. Ce facteur est connu pour être un régulateur majeur des caractéristiques associées à l'épuisement des lymphocytes T, comme en augmentant l'expression d'*immune checkpoint* inhibiteurs tels que PD-1 et CTLA-4⁸⁴. Par ailleurs, plusieurs travaux ont mis en évidence que CXCR4 peut activer la voie JAK2-STAT3, dont l'activation dans un contexte tumoral est associée à des mécanismes favorisant la tumorigénèse⁸⁵⁻⁸⁷. Cai *et al.* (2020) ont d'ailleurs démontré que l'activation de la voie JAK2 – STAT3 par CXCR4 dirigeait la polarisation des macrophages vers un phénotype M2, connu pour être anti-inflammatoire et pro-tumoral⁸⁸.

En conclusion, les virus oncolytiques oHSV et oHSV-P2G entraînent le recrutement de cellules immunitaires avec un effet plus marqué pour oHSV-P2G. L'épuisement des CD8+ n'a pas été étudié dans le cadre de ce mémoire, mais des données préliminaires du laboratoire obtenues en scRNASeq (non abordées ici) corroborent avec la littérature et suggèrent que l'armement du virus oncolytique avec P2G permet d'éviter l'épuisement des CD8+. Il serait donc intéressant de vérifier si l'expression de P2G permet effectivement d'empêcher l'épuisement des CD8+ et de restaurer leurs fonctions.

Nos résultats indiquent que l'infiltration des cellules Foxp3+, correspondant aux lymphocytes T régulateurs (Tregs) tend à diminuer en réponse au traitement par oHSV-P2G, en comparaison au

traitement par PBS et oHSV, notamment dans l'hémisphère droit du cerveau où l'infiltration des Tregs est nettement plus importante. Par ailleurs, cette tendance est confirmée par le ratio CD8+/Foxp3+ qui augmente significativement dans la condition oHSV-P2G comparé au contrôle.

Ces cellules Treg sont connues pour leur rôle immunosuppresseur, favorisant l'échappement tumoral. Dès lors, leur diminution dans le MET du GBM est intéressante pour rétablir un environnement pro-inflammatoire. Par ailleurs, ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature rapportant que la voie de signalisation CXCL12/CXCR4 est impliquée dans le recrutement des cellules immunitaires suppressives vers le MET du glioblastome^{61,62}. En effet, CXCR4 étant exprimé à la surface de lymphocytes T régulateurs, ceux-ci peuvent être attirés par le CXCL12 se trouvant dans le MET et induire une réponse anti-inflammatoire^{61,62}. Par conséquent, le blocage de cet axe CXCL12/CXCR4 grâce à oHSV-P2G réduit le recrutement des Treg et favorise l'immunité en faveur d'un profil pro-inflammatoire.

En somme, le traitement par oHSV-P2G induit un remodelage immunitaire du microenvironnement tumoral, caractérisé par un recrutement accru de lymphocytes T CD4+ et CD8+, une prévention de l'épuisement des CD8+ et une diminution des cellules T régulatrices. En ciblant l'axe CXCL12/CXCR4, oHSV-P2G favorise donc une réponse immunitaire plus efficace, contribuant potentiellement à convertir le GBM, initialement considéré comme une tumeur froide, en une tumeur chaude.

5.2 oHSV-P2G diminue la vascularisation tumorale *in vivo*

L'analyse de la densité vasculaire par immunofluorescence a révélé que l'injection intratumorale d'oHSV induit une augmentation de la superficie occupée par les vaisseaux sanguins dans les cerveaux par rapport aux contrôles ayant été traités au PBS. Cependant, le traitement par oHSV-P2G, quant à lui, entraîne une diminution de la surface occupée par les structures CD31+ en comparaison au traitement par oHSV seul. Ces observations suggèrent que le blocage de la signalisation CXCL12/CXCR4 interfère avec la néoangiogenèse induite par la virothérapie oncolytique, comme le laissaient supposer les données préliminaires.

Le potentiel pro-angiogénique du virus oncolytique oHSV a déjà été décrit par Aghi *et al.* (2007)⁸⁹ et Kurozumi *et al.* (2008)⁷⁸ qui ont observé une augmentation de la vascularisation tumorale après infection par oHSV. Cette néovascularisation accrue serait en partie liée à une augmentation de la perméabilité vasculaire et à une infiltration de leucocytes. Ce phénomène peut être attribué à l'inflammation locale induite par la virothérapie. En effet, le lien entre inflammation et angiogenèse est bien décrit dans la littérature^{90,91}. Ainsi, les virus oncolytiques permettent le recrutement de cellules immunitaires qui, en réponse à l'infection, libèrent de nombreuses cytokines et chimiokines à effet pro-angiogénique.

Par ailleurs, les cellules immunitaires recrutées sont elles-mêmes influencées par le microenvironnement tumoral. Par exemple, dans le contexte du glioblastome, celui-ci favorise la polarisation des TAMMs vers un phénotype *M2-like*. Ce phénotype, en partie dû à l'expression de CXCR4 à leur surface, est connu pour soutenir l'angiogenèse, comme le suggèrent également nos résultats préliminaires. Ainsi, les TAMMs *M2-like* contribuent activement à la revascularisation de la tumeur, en produisant diverses cytokines pro-angiogéniques^{25,26,59,90}.

Par conséquent, bien que l'injection d'oHSV vise à détruire les cellules tumorales, elle peut paradoxalement stimuler l'angiogenèse tumorale via l'activation du système immunitaire et le remodelage du microenvironnement tumoral. Ceci souligne l'importance de stratégies combinées, comme l'armement d'oHSV avec l'antagoniste P2G, afin de limiter les effets secondaires indésirables comme l'angiogenèse protumore. Comme le démontrent nos résultats, cette approche permet de réduire significativement la surface occupée par les vaisseaux sanguins dans les cerveaux de souris atteintes de GBM, en contrecarrant les effets pro-angiogéniques délétères du virus oncolytique seul, mais aussi en bloquant l'implication directe de cette voie dans l'angiogenèse.

La chimiokine CXCL12 est un facteur pro-angiogénique clé libéré par de nombreux types cellulaires du MET, et sa voie de signalisation via le récepteur CXCR4 joue un rôle important dans l'angiogenèse tumorale, comme expliqué dans l'introduction (point 1.4.4). L'inhibition de cette voie par l'antagoniste P2G, exprimé par le virus oncolytique oHSV-P2G, permet de bloquer plusieurs mécanismes de néovascularisation impliqués dans la progression du glioblastome. Premièrement, la liaison de CXCL12 au CXCR4 exprimé par les GSCs active la voie de signalisation PI3K/AKT et permet l'expression du facteur de transcription HIF-1 α . Ce dernier induit la transcription de VEGFA, un puissant inducteur de l'angiogenèse par bourgeonnement^{60,63}. Deuxièmement, CXCL12 favorise le mimétisme vasculaire, processus résultant de la capacité des GSCs exprimant CXCR4 de se différencier et de former des vaisseaux sanguins^{61,63}. Enfin, cette chimiokine est impliquée dans le recrutement des cellules endothéliales progénitrices (EPCs) qui expriment également le récepteur CXCR4 à leur surface. Ces cellules peuvent alors former *de novo* des vaisseaux sanguins^{47,61,63}.

Par conséquent, l'inhibition de la voie CXCL12/CXCR4 via oHSV-P2G permet de bloquer simultanément l'angiogenèse par bourgeonnement, le mimétisme vasculaire et l'angiogenèse à partir d'EPCs. De plus, la voie CXCL12/CXCR4 intervient également dans des mécanismes de contournement des thérapies anti-angiogéniques classiques, tels que la cooptation vasculaire. Pour rappel, la cooptation vasculaire est un processus où les cellules cancéreuses migrent le long des vaisseaux sanguins existants pour les utiliser comme source de nutrition, sans induire d'angiogenèse. Il a été démontré par Pham *et al.* (2015) que l'inhibition de VEGFR augmentait l'expression de CXCR4 dans les cellules de GBM⁹². Ainsi, CXCL12, libéré

par les vaisseaux sanguins, agit alors comme un facteur chimiotactique attirant ces cellules tumorales exprimant CXCR4 vers les structures vasculaires préexistantes^{50,92}.

Ainsi, en ciblant cette voie, oHSV-P2G ne se contente pas de réduire l'angiogenèse tumorale classique, mais empêche également un mécanisme de revascularisation alternatif, soit la cooptation vasculaire. Les résultats obtenus, montrant une diminution de la superficie occupée par les vaisseaux sanguins dans les cerveaux traités par oHSV-P2G, sont donc en accord avec la littérature et soutiennent la pertinence de l'armement de l'oHSV par P2G.

5.3 oHSV-P2G diminue la taille moyenne d'un vaisseau sanguin au sein de la tumeur

L'analyse par immunofluorescence du marqueur endothérial CD31 a permis de mettre en évidence des altérations morphologiques des vaisseaux sanguins selon le traitement reçu. En condition contrôle, les vaisseaux localisés dans la zone tumorale présentaient une taille significativement plus importante que ceux du stroma, ce qui reflète une vascularisation anormale, typique du glioblastome. La littérature décrit en effet les vaisseaux sanguins du GBM comme étant hautement perméables, désorganisés et sinueux. Leur diamètre est plus grand et leur recouvrement par des péricytes est réduit ce qui augmente la pression interstitielle^{26,46,48,52,53}.

Bien que nous n'ayons pas procédé à un immunomarquage des péricytes, il semble que le traitement par oHSV-P2G restaure partiellement une vascularisation plus "normale", avec une diminution significative de la taille moyenne des structures vasculaires CD31+ dans la zone tumorale. Cette observation pourrait refléter une réduction de la néoangiogenèse tumorale ou une restructuration des vaisseaux sanguins. Cependant, cette normalisation apparente de la vascularisation peut être interprétée de façon ambiguë. D'un côté, la présence de vaisseaux plus fins et potentiellement plus réguliers peut théoriquement favoriser l'apport de nutriments à la tumeur, et ainsi soutenir sa progression. D'un autre côté, une meilleure perfusion pourrait améliorer la perfusion tumorale, réduire l'hypoxie, et favoriser l'infiltration des cellules immunitaires, éléments bénéfiques dans le cadre de la virothérapie. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour déterminer si ces vaisseaux reflètent une vascularisation plus structurée et stable, potentiellement plus propice à une réponse thérapeutique.

5.4 oHSV-P2G induit *in vitro* une diminution de l'expression de VEGFA dans les GB138

Pour approfondir l'hypothèse selon laquelle oHSV induit l'angiogenèse alors qu'oHSV-P2G tend à interférer avec ce processus, nous avons mesuré par RT-qPCR l'expression de gènes pro-angiogéniques dans des cellules GBM (GB138) infectées ou non par oHSV ou oHSV-P2G, ainsi que dans des cellules microgliales (HMC3) exposées à des milieux conditionnés.

Dans les cellules GB138, l'infection par oHSV-P2G pendant 72 heures a entraîné une diminution significative de l'expression de plusieurs gènes pro-angiogéniques classiques : *SLC2A*, *VEGFA*, *IL1B*, *MMP19*, *HMOX1*, *CEPB* et *ETS1*. Ces résultats confirment l'effet anti-angiogénique du virus armé, suggérant que le blocage de la voie CXCL12/CXCR4 par P2G réduit la production par les cellules tumorales de facteurs pro-angiogéniques, en particulier VEGFA. Cette observation est en accord avec des études antérieures mettant en évidence le rôle de CXCL12/CXCR4 dans la régulation de VEGFA^{60,63}. Pour les autres gènes pour lesquels une diminution de l'expression est observée dans nos expériences *in vitro*, aucun lien clair n'a encore été mis en avant dans la littérature entre leurs protéines et le voie CXCL12/CXCR4.

Les expressions de *IL17* et *CYR61* sont fortement augmentées dans les GB138 que ce soit en présence de oHSV ou de oHSV-P2G par rapport au contrôle. Cette hausse peut s'expliquer par le rôle multifonctionnel et parfois contextuel de ces gènes.

Principalement produite par les lymphocytes Th17, l'interleukine IL-17 est également sécrétée par les macrophages et la microglie, les lymphocytes T CD8+, les cellules NK, et les neutrophiles^{34,35,37}. Elle possède un rôle complexe ambigu en présentant à la fois des effets pro- et anti-tumoraux, en fonction du contexte tumoral^{34,35,37}. Sur le plan immunitaire, IL-17 est avant tout connue pour ses propriétés pro-inflammatoires. Elle module la réponse immunitaire adaptative en recrutant des lymphocytes T CD4+, T CD8+ ainsi que des cellules NK, et en stimulant leur activité effectrice³⁷. L'augmentation marquée de IL17 observée dans les cellules GB138 infectées par oHSV ou oHSV-P2G pourrait ainsi s'expliquer par une réponse inflammatoire aiguë induite par l'infection virale. Au niveau du GBM, IL-17 régule la prolifération et la migration des cellules cancéreuses, mais aussi l'angiogenèse^{34,35}. L'induction de processus tumoraux par IL-17 semble indépendante de l'axe CXCL12/CXCR4, ce qui pourrait expliquer que l'armement du virus avec P2G n'empêche pas l'augmentation de IL-17.

Comme mentionné ci-dessus, Kurozumi *et al.* (2008) ont montré que l'infection par oHSV induisait l'angiogenèse dans les gliomes, notamment via une induction rapide de CYR61 (*Cysteine-Rich angiogenic inducer 61*)⁷⁸. Cette protéine, également nommée CCN1 (*Cellular Communication Network 1*), est une protéine de la matrice extracellulaire connue pour son rôle dans la progression tumorale et l'angiogenèse. Xie *et al.* (2004)⁹³, ont mis en avant l'implication de CYR61 dans la progression des gliomes, en montrant

une corrélation entre l'expression de CYR61, le grade tumoral et la survie des patients. 68 % des patients atteints de GBM dans leur cohorte surexprimaient cette protéine. Leurs travaux ont également mis en évidence une activation de la voie PI3K/AKT par CYR61, suggérant que cette protéine participe à plusieurs mécanismes pro-tumoraux⁹³. Ces observations ont été renforcées par Goodwin *et al.* (2010)⁹⁴ puis par Cheng *et al.* (2015)⁹⁵. Ainsi, bien que le virus armé oHSV-P2G cible la voie CXCL12/CXCR4, il n'est pas surprenant que l'expression de CYR61 ne soit pas inhibée. Cette protéine peut en effet induire des processus tumorigènes et promouvoir l'angiogenèse indépendamment de CXCL12, notamment par l'activation de la voie PI3K/AKT.

Par ailleurs, Haseley *et al.* (2012)⁹⁶, dans la continuité des travaux de Kurozumi, ont montré que l'induction de CYR61 inhibait l'activité des virus oncolytiques, en particulier ceux dérivés de HSV. CYR61 se lie en effet à des intégrines exprimées par les cellules de gliome, activant une réponse antivirale innée via la sécrétion d'IFN- α ⁹⁶. Cette capacité de la tumeur à induire CYR61 constitue un mécanisme de résistance à la virothérapie oncolytique, et explique la surexpression de ce gène observée dans nos expériences de RT-qPCR sur les cellules GB138 infectées par oHSV ou oHSV/P2G.

En conclusion, l'augmentation de certains gènes comme *IL17* et *CYR61* dans les cellules cancéreuses pourrait expliquer l'augmentation de l'angiogenèse, observée *in vivo*, par oHSV. L'expression de ces gènes ne semble cependant pas impactée par la présence de P2G. Ceux-ci ne peuvent donc pas expliquer la diminution de l'angiogenèse observée *in vivo* avec oHSV-P2G comparé à oHSV.

Par ailleurs, l'expression des autres gènes pro-angiogéniques interprétés est réduite en présence de oHSV mais plus encore en présence de P2G. Par exemple, l'expression de *VEGFA*, un des principaux régulateurs de l'angiogenèse, est significativement réduite par oHSV par rapport à PBS, et encore significativement plus inhibée par oHSV-P2G par rapport à oHSV. Ainsi, ces résultats nous montrent un potentiel équilibre, lors de l'infection, entre des voies « CXCR4-indépendantes » et des voies « CXCR4-dépendantes » expliquant l'augmentation de l'angiogenèse avec oHSV et la diminution de celle-ci par oHSV/P2G dans les résultats obtenus par immunofluorescence *in vivo*. Il est important de noter toutefois que la présence d'autres cellules du MET, et leur interaction avec les cellules tumorales, pourraient avoir un impact différent lors de l'infection par oHSV. Par exemple, ces interactions pourraient entraîner l'augmentation, dans les cellules tumorales, de certains gènes (e.g. *VEGFA*) dont l'expression est ici diminuée en monoculture.

Pour évaluer l'impact indirect du virus oHSV-P2G sur les cellules myéloïdes du microenvironnement tumoral, nous avons opté, dans le cadre de ce mémoire d'étudier dans un premier temps le rôle des cellules de microglie humaine en prenant les cellules de la lignée HMC3 comme modèle principal. Cette lignée immortalisée, bien caractérisée, présente plusieurs avantages techniques : cultures faciles et rapides, résultats homogènes et reproductibles, conservent la plupart des propriétés antigéniques originales²⁷.

Le rôle des macrophages sera envisagé dans des analyses ultérieures. Cette caractérisation peut être envisagée- soit en utilisant des lignées cellulaires issues de monocytes humains (comme THP-1), soit en travaillant avec des macrophages dérivés de monocytes primaires (MDMs). Les lignées cellulaires assurent une forte homogénéité mais ne reflètent pas pleinement la diversité biologique observée *in vivo*. À l'inverse, les MDMs issus de *buffy coats* humains reproduisent mieux le phénotype *in vivo*, mais présentent une forte variabilité inter- et intra-donneurs^{97,98}.

Enfin, des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris (BMDMs, *Bone Marrow-Derived Macrophages*) pourraient également être utilisés. Ces cellules sont faciles à obtenir, elles présentent peu de variabilité, et sont souvent utilisées dans des modèles murins pour étudier les macrophages infiltrants. Toutefois, leur origine murine limite leur transposabilité aux interactions humaines.

L'analyse par RT-qPCR sur les HMC3 a été réalisée après leur exposition à des milieux conditionnés provenant des cellules GB138 infectées ou non, afin de reproduire les interactions du microenvironnement tumoral en présence ou non des virus. Ces milieux, filtrés pour éliminer les particules virales, contiennent les facteurs solubles sécrétés par les cellules GB138 en réponse à l'infection, dont la protéine antagoniste P2G.

L'exposition des HMC3 au milieu conditionné issu de cellules infectées par oHSV-P2G (mP2G) a conduit à une diminution significative de l'expression des gènes *ADAM8* et *IL23A*, suggérant un effet anti-angiogénique médié par P2G. Ces deux gènes sont impliqués dans des mécanismes pro-inflammatoires et pro-angiogéniques, ce qui conforte l'idée que le virus armé module le microenvironnement tumoral en atténuant les signaux pro-angiogéniques transmis à la microglie.

ADAM8, une métalloprotéinase de la matrice extracellulaire, est connue pour favoriser la migration cellulaire, la dégradation de la matrice et la néoangiogénèse dans divers cancers, dont les tumeurs cérébrales. Bien qu'aucun lien direct n'a été établi entre l'axe CXCL12/CXCR4 et la protéine *ADAM8* dans le glioblastome, nos résultats suggèrent que la diminution de son expression en présence de P2G pourrait refléter une réduction du potentiel pro-invasif et pro-angiogénique de la microglie.

IL-23 est une interleukine pro-inflammatoire qui active les cellules microgliales et induit la sécrétion d'*IL-17*. Quand la microglie est active, elle sécrète également *IL-23* pour amplifier le signal. Dans le glioblastome, la microglie présente un phénotype *M2-like*. Le récepteur CXCR4 étant fortement exprimé à la surface des cellules microgliales, l'axe CXCL12/CXCR4 permet la différenciation de ces cellules vers un phénotype pro-tumoral^{34,35,61,62}. Si cette voie est inhibée par P2G, il n'est pas étonnant de voir l'expression de l'interleukine *IL23A* diminuer. Sa régulation négative pourrait ainsi limiter le feedback positif entre les cellules microgliales *M2-like* et l'*IL-23*, mais aussi limiter la stimulation de l'axe *IL-23/IL-17*, réduisant potentiellement les signaux pro-tumorigènes et donc pro-angiogéniques, notamment par la voie PI3K/AKT³⁵.

De manière intéressante, les gènes *ADAM8* et *IL23A* sont inhibés dans les cellules microgliales HMC3 en présence de P2G, mais ne le sont pas dans les cellules GB138. Cette différence reflète les synergies et complémentarités potentielles entre les divers types cellulaires. En effet, dans les conditions précédentes, les cellules microgliales HMC3 sont exposées aux facteurs solubles présents dans les milieux de culture des GB138, simulant ainsi partiellement le microenvironnement tumoral. Toutefois, ce modèle ne permet pas de reproduire les interactions cellulaires directes entre les cellules tumorales et la microglie. Ces observations doivent donc être interprétées avec prudence et soulignent l'intérêt de compléter ces analyses. Il serait pertinent de reproduire ces expériences de RT-qPCR sur des HMC3 cocultivées avec les cellules GB138, permettant ainsi une interaction cellulaire directe. Néanmoins, il est probable que certains effets pro-angiogéniques nécessitent un microenvironnement plus complexe que celui permis par le modèle *in vitro* actuel, incluant d'autres types de cellules immunitaires ou la présence de cytokines supplémentaires.

5.5 oHSV-P2G diminue la vascularisation tumorale *in vitro*

Afin de vérifier si les modulations de l'expression des facteurs pro-angiogéniques en présence de P2G peut avoir des conséquences sur l'angiogenèse, des expériences de tubulogenèse ont été réalisées. Cette approche vise à étudier *in vitro* la formation de structures tubulaires à partir de cellules endothéliales. La tubulogenèse correspond à l'étape de réorganisation des cellules endothéliales en réseaux vasculaires structurés. Bien que ce modèle ne reproduit pas l'ensemble des étapes de l'angiogenèse *in vivo*, il permet d'évaluer rapidement la capacité de différents stimuli à induire ou inhiber la formation de structures vasculaires.

Les HUVEC sont des cellules endothéliales obtenues à partir des veines du cordon ombilical humain. Elles sont largement utilisées comme référence pour évaluer l'activité pro- ou anti-angiogénique de facteurs solubles, et leur utilisation dans la tubulogenèse est largement répandue en raison de leur capacité unique à modéliser *in vitro* la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

La tubulogenèse sur matrice extracellulaire reproduit principalement l'angiogenèse par bourgeonnement, c'est-à-dire la capacité des cellules endothéliales à s'aligner, migrer et s'organiser en structures ramifiées. C'est la forme d'angiogenèse la plus classique, impliquant l'activation de cellules endothéliales par des facteurs angiogéniques (ex : VEGF), suivie de leur prolifération, leur migration et leur réorganisation.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de CXCL12 et de son antagoniste AMD3100, sur la capacité des HUVEC à former des structures tubulaires. L'ajout de CXCL12 (20 pM) n'induit pas de variation significative du nombre d'embranchements par rapport à la condition contrôle (EGM2), ce qui pourrait s'expliquer par un effet plafonné : il est possible que la signalisation angiogénique soit déjà maximale dans les conditions de base, empêchant toute augmentation supplémentaire du phénomène de tubulogenèse en présence de CXCL12. En d'autres termes, l'absence de réponse observable ne signifie pas nécessairement une absence d'effet, mais peut refléter une saturation de la réponse endothéiale.

Par contre, l'ajout de AMD3100, un inhibiteur de CXCR4 approuvé par la FDA, réduit significativement la formation de structures tubulaires *in vitro*. Lorsque CXCL12 et AMD3100 sont combinés, une restauration partielle est observée par rapport à la condition AMD3100 seule, bien que le niveau de tubulogenèse reste inférieur à celui induit par CXCL12 seul. Ces résultats confirment que l'axe CXCL12/CXCR4 est impliqué dans l'induction de la tubulogenèse, et que son inhibition réduit cette capacité. L'effet plafonné observé avec CXCL12 seul pourrait masquer sa réelle contribution, qui se révèle plus clairement dans un contexte partiellement inhibé.

De plus, ces résultats valident l'approche thérapeutique consistant à cibler cet axe, puisque l'inhibition de CXCR4 par AMD3100 perturbe la tubulogenèse. Par analogie, l'expression de P2G, antagoniste de CXCL12, est donc susceptible d'exercer un effet anti-angiogénique similaire, renforçant l'intérêt de cet armement pour moduler l'environnement tumoral du glioblastome.

Nous avons ensuite évalué la capacité des milieux conditionnés issus des cellules GB138 à moduler la formation de structures tubulaires. Comme attendu, les HUVEC ne forment pas de tubes dans un milieu DMEM/F12 dépourvu de FBS (milieu utilisé dans la production des milieux conditionnés – cf. Matériels et Méthodes), tandis que le milieu conditionné non infecté (mNI GB138) restaure significativement cette capacité. Ces observations indiquent que les cellules tumorales GB138 produisent des facteurs pro-angiogéniques solubles capables de stimuler la tubulogenèse, ce qui est cohérent avec leur profil hautement angiogénique.

Pour tester l'hypothèse principale selon laquelle l'infection des cellules GB138 par oHSV augmente la formation de tubes tandis que oHSV-P2G la diminue, d'autres essais de tubulogenèse ont été réalisés avec des milieux conditionnés de GB13 infectées ou non par oHSV ou oHSV-P2G. Dans les deux cas, une diminution significative du nombre d'embranchements est observée par rapport au milieu conditionné de cellules non infectées (mNI GB138).

Ce résultat peut sembler contradictoire avec les données *in vivo* rapportant une augmentation de l'angiogenèse après infection par des virus oncolytiques. Cette divergence pourrait s'expliquer par le fait qu'*in vivo*, l'infection virale induit une inflammation locale qui recrute des cellules immunitaires (macrophages, microglie, etc.), qui en réponse à l'infection produisent une variété de cytokines pro-

angiogéniques^{90,91}. Par ailleurs, l'environnement tumoral (MET) oriente ces cellules vers un phénotype pro-angiogénique, amplifiant encore cette réponse^{25,26,59,90}. Cet environnement cellulaire complexe est très différent de celui observé *in vitro* où le milieu conditionné mis en présence des cellules endothéliales provient seulement de GB138 infectées. Ainsi, l'effet indirect du virus sur l'angiogenèse via le recrutement immunitaire est absent, et seule l'interaction directe entre le virus et les cellules tumorales est analysée. Dans ce contexte et malgré que l'augmentation de certains facteurs pro-angiogéniques tels qu'IL17 et CYR61 ait été mise en évidence par RT-qPCR après infection par oHSV, aucune augmentation de l'angiogenèse n'a été observée dans les expériences de tubulogenèse, contrairement à ce que suggère la littérature.

Enfin, bien qu'aucune différence significative ne soit observée entre les conditions mOHSV GB138 et mP2G GB138, une tendance à la réduction plus marquée du nombre d'embranchements est visible avec le milieu conditionné issu de cellules infectées par oHSV-P2G. Cette observation suggère que l'antagonisme de CXCL12 par la protéine P2G contribue à l'inhibition de la tubulogenèse, en cohérence avec les résultats obtenus avec l'antagoniste pharmacologique AMD3100.

Enfin, l'influence des interactions entre les cellules de glioblastome et la microglie sur l'angiogenèse a été étudiée par tubulogenèse avec des milieux conditionnés issus de l'infection de cultures simples (HMC3 ou GB138 seules) ou de cellules HMC3 cocultivées avec les GB138. Ces expériences visent à mimer plus fidèlement le microenvironnement tumoral, où les interactions entre cellules tumorales et microgliales sont connues pour favoriser l'angiogenèse, comme le suggèrent de nombreuses données de la littérature^{25,26,59}.

Premièrement, le milieu conditionné issu des cellules microgliales HMC3 seules (mNI HMC3) entraîne une diminution significative de la formation de structures tubulaires par rapport au milieu conditionné de GB138 non infectées (mNI GB138). Cela indique que les cellules HMC3, isolées, ne produisent pas spontanément de facteurs solubles pro-angiogéniques.

Cependant, lorsque les cellules HMC3 sont cocultivées avec des cellules GB138 (mNI Coculture), une restauration marquée de la tubulogenèse est observée. Le nombre d'embranchements dépasse celui mesuré dans les conditions avec HMC3 seules ou même GB138 seules. Ces résultats soulignent l'importance des interactions cellulaires dans l'induction de facteurs pro-angiogéniques.

L'utilisation des milieux conditionnés issus de cocultures infectées par les virus oncolytiques oHSV et oHSV-P2G (respectivement mOHSV Coculture et mP2G Coculture) dans les essais de tubulogenèse entraîne une diminution du nombre d'embranchements comparativement à la coculture non infectée (mNI Coculture), bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative. De manière étonnante, le milieu conditionné issu de la coculture infectée par oHSV n'induit pas une augmentation de la tubulogenèse, contrairement à ce que l'on aurait pu anticiper. En effet, plusieurs éléments suggèrent que la présence du virus oncolytique devrait activer la microglie, déclenchant une réponse inflammatoire

accompagnée de la sécrétion de cytokines pro-angiogéniques, comme cela a été décrit *in vivo*^{90,91}. Par ailleurs, les interactions directes entre la microglie et les cellules de glioblastome sont connues pour favoriser un phénotype pro-angiogénique de la microglie, renforçant encore cette hypothèse^{25,26,59,90}. Or, dans notre système *in vitro*, cette activation ne se traduit pas par une augmentation de la formation de structures tubulaires. Cette absence d'effet pro-angiogénique dans la condition mOHSV Coculture est donc surprenante et pourrait s'expliquer par le fait que l'infection virale pourrait altérer les échanges moléculaires entre les cellules tumorales et la microglie, en perturbant leur sécrétion coordonnée de facteurs pro-angiogéniques. De plus, l'infection reste un stress pour les cellules, qui pourrait réorienter leurs ressources vers des mécanismes de défense au détriment de la sécrétion de facteurs angiogéniques. Par conséquent, ces résultats suggèrent que, contrairement aux observations *in vivo*, l'infection par oHSV ne suffit pas, dans un système *in vitro* dépourvu d'immunité, à induire un effet pro-angiogénique notable. Cela souligne l'importance du contexte immunitaire et tissulaire global pour interpréter les effets angiogéniques de la virothérapie.

Enfin, bien qu'aucune différence significative ne soit détectée entre les conditions mOHSV Coculture et mP2G Coculture, une tendance à une diminution plus marquée est observée avec le virus armé. Cette tendance pourrait refléter l'effet additionnel de l'antagonisme de CXCL12 par la protéine P2G, venant renforcer l'inhibition de la tubulogenèse au sein d'un environnement mimant de plus près le glioblastome humain.

Il est important de noter que bien que la technique de tubulogenèse est largement utilisée, elle est de plus en plus critiquée dans la communauté scientifique, en particulier pour les raisons suivantes : instabilité des structures vasculaires, modèle très simplifié et variabilité des résultats. Les réseaux formés par les cellules endothéliales sur Matrigel sont transitoires, souvent instables après 6h, et ne présentent pas de vraie lumière ni de péricytes. Cela limite leur pertinence pour modéliser la vascularisation fonctionnelle. Ensuite, la tubulogenèse ne reproduit qu'une étape de l'angiogenèse à savoir la réorganisation/migration des cellules endothéliales. Enfin, les résultats peuvent varier parce qu'il existe plusieurs types de cellules endothéliales et le Matrigel peut varier d'un lot à l'autre⁹⁹.

Cependant, malgré ces critiques, le test de tubulogenèse reste utilisé car il est simple, rapide et peu coûteux et constitue un bon outil pour faire une première évaluation fonctionnelle des effets angiogéniques de facteurs ou de milieux conditionnés¹⁰⁰.

Chapitre 6

Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus à travers les approches d'immunofluorescence, de RT-qPCR et de tubulogenèse ouvrent plusieurs pistes de réflexion et d'investigation quant au rôle de l'axe CXCL12/CXCR4 dans l'angiogenèse tumorale du glioblastome et à la pertinence de l'armement de la virothérapie par P2G.

Les analyses en immunofluorescence ont permis de confirmer l'effet, *in vivo*, du virus oHSV-P2G sur la réduction de la vascularisation tumorale, tout en montrant une modulation de l'infiltrat immunitaire, notamment des populations T CD4⁺, CD8⁺ et Foxp3⁺. Ces observations suggèrent que le virus armé pourrait à la fois atténuer les signaux angiogéniques et reprogrammer favorablement le microenvironnement tumoral vers un profil pro-inflammatoire. Il serait toutefois essentiel de confirmer ces résultats par des expériences complémentaires.

En parallèle, l'analyse par immunofluorescence du marqueur endothéial CD31 a permis de mettre en évidence la vascularisation anormale, typique du glioblastome, caractérisée par des vaisseaux de plus grande taille. Par ailleurs, la présence d'oHSV-P2G semble réduire la taille des vaisseaux, ce qui pourrait indiquer une restauration d'une angiogenèse plus fonctionnelle. Cependant, l'interprétation de cette restauration est ambiguë. Dès lors, afin de mieux caractériser la nature des vaisseaux formés, il serait pertinent de compléter cette analyse par une immunofluorescence incluant un marquage des péricytes (par exemple avec NG2 ou PDGFR β). Cela permettrait d'évaluer le taux de couverture péricyttaire, indicateur important de la maturation et de la fonctionnalité des vaisseaux sanguins. En effet, la couverture péricyttaire est souvent altérée dans les tumeurs, menant à des vaisseaux instables, hyperperméables et sinueux. Ce type d'analyse apporterait un éclairage supplémentaire sur l'effet du traitement oHSV-P2G sur la qualité de la néovascularisation tumorale.

Les approches *in vitro* ont confirmé par RT-qPCR l'expression de facteurs angiogéniques par les cellules de glioblastome. L'infection par oHSV-P2G réduit l'expression de certains d'entre eux, suggérant que l'antagonisme de CXCL12 peut entraver cette cascade pro-angiogénique. Toutefois, ces données restent limitées à un modèle de monoculture. Afin de mieux refléter la complexité du microenvironnement

tumoral, il serait intéressant d'évaluer l'expression génique dans des cellules microgliales HMC3 cocultivées avec des cellules GB138, avec ou sans infection virale. Après tri des HMC3 par cytométrie en flux, leur ARN pourrait être analysé par RT-qPCR, permettant ainsi d'évaluer l'impact indirect du virus armé sur les cellules immunitaires associées à la tumeur.

Par ailleurs, il serait pertinent d'évaluer l'expression de *VEGFA* à l'aide d'approches expérimentales complémentaires, afin de confirmer les résultats obtenus par RT-qPCR par une analyse au niveau protéique. L'infection des cellules de glioblastome (GB138) par oHSV ou oHSV-P2G pendant 72 heures entraîne une diminution marquée et significative de l'expression de *VEGFA* au niveau transcriptionnel. Afin de valider cette régulation au niveau protéique, des techniques telles que la cytométrie en flux ou le Western blot pourraient être envisagées.

Enfin, les expériences de tubulogenèse ont permis de valider l'impact de CXCL12 sur la formation de structures vasculaires. Les milieux conditionnés de GB138 infectées par oHSV-P2G montrent que le virus armé interfère spécifiquement avec les signaux pro-angiogéniques en réduisant la formation de structures tubulaires *in vitro*. Notamment, la coculture GB138-HMC3 accentue la tubulogenèse, suggérant une reprogrammation de la microglie vers un phénotype pro-angiogénique en présence de cellules tumorales. De même, l'infection par oHSV-P2G tend à réduire la formation de structures tubulaires.

Il est important de souligner que l'absence d'effet pro-angiogénique clair suite à l'infection par oHSV révèle les limites des systèmes *in vitro* simplifiés, qui ne reflètent qu'imparfaitement les interactions cellulaires complexes *in vivo*. Dans cette optique, il serait pertinent de développer des modèles complémentaires mieux adaptés à l'étude des divers types d'angiogenèse tumorale. En effet, la tubulogenèse *in vitro* ne modélise que l'angiogenèse par bourgeonnement. Elle ne permet pas de reproduire des phénomènes importants tels que la cooptation vasculaire (utilisation de vaisseaux préexistants), le mimétisme vasculaire (différenciation de cellules tumorales en pseudo-cellules endothéliales), et le recrutement des cellules progénitrices endothéliales (EPCs). Mettre en place des approches permettant d'explorer ces mécanismes apporterait un éclairage complémentaire sur les effets du virus armé et affinerait notre compréhension de la dynamique angiogénique dans le glioblastome.

Malgré leur caractère préliminaire et la nécessité de procéder à des analyses complémentaires, nos résultats sont encourageants quant à la capacité de oHSV-P2G à induire une réponse immunitaire pro-inflammatoire et antitumorale, et à réduire la vascularisation tumorale.

Cette utilisation d'un oHSV exprimant un inhibiteur de la voie CXCL12/CXCR4 pourrait être complétée par l'utilisation d'inhibiteurs de points de contrôle immunitaires de manière à diminuer le caractère immunosupresseur de l'environnement tumoral et à amplifier davantage la tendance de P2G à rendre ce microenvironnement plus efficace dans le contrôle de la tumeur.

Annexes

Listes des anticorps

Anticorps primaires

Protéine ciblée	Fabricant	Nom	Type	Dilution	Référence
CD31 (IF)	R&D Systems	Human/ Mouse/Rat CD31/PECAM-1 Antibody, R&D Systems™	Chèvre	1 :200	18729147
CD8 (IF)	Invitrogen	CD8+ alpha Polyclonal Antibody,	Lapin	1 :200	PA581344
Foxp3 (IF)	eBioscience, Invitrogen	FOXP3+ Monoclonal Antibody	Rat	1 :100	15247457
CD4 (IF)	BioLegend	Purified anti-mouse CD4+ Antibody	Rat	1 :200	100506

Anticorps secondaires

Cible	Fabricant	Nom	Référence
Chèvre	Jackson Immunoresearch	1MG AF 647 Donkey IGG Anti-Goat IGG(H+L)	705-605-003
Lapin	Jackson Immunoresearch	A-Rabbit IGG H+L Donkey F(AB)2 RRX	711-296-152
Rat	Jackson Immunoresearch	A-Rat IGG H+L Donkey PAB CY5	712-175-150

Séquences des primers

Gènes	Séquence de l'amorce sens	Séquence de l'amorce antisens	Entreprise
<i>ADAM8</i>	5' – GGGCCTGGAGATTGGAATAG – 3'	5' – CGTGATGAGCTGTACGTTGT – 3'	IDT
<i>Ang2</i>	5' – GTGACTGCCACGGTGAATAA – 3'	5' – TCGTGGTGTGTCCTGATTG – 3'	IDT
<i>CEBPB</i>	5' – AACTCTCTGCTTCTCCCTCT – 3'	5' – TGACAGTTACACGTGGGTTG – 3'	IDT
<i>CYR61</i>	5' – TGGGTCTGTGACGAGGATAG – 3'	5' – GCGAGGCTCCATTCCAAA – 3'	IDT
<i>ETS1</i>	5' – GAAGAGTGGTGGGTGGTTAT-3'	5' – CCAGAATGGAGAAGGGAACAA – 3'	IDT
<i>FN1</i>	5' – GAACCCAGTCCACAGCTATTCT – 3'	5' – CTTTCATTGGTCCGGTCTTCT – 3'	IDT
<i>HIF1A</i>	5' – TCTCC TCTCCTACCCACATAC – 3'	5' – CGTTAGGGCTTCTGGATGAG – 3'	IDT
<i>HMOX1</i>	5' – GGGCCTTACACTCAGCTTTC – 3'	5' – GGAAGCAGCCAAGAGAAAT – 3'	IDT
<i>IL17</i>	5' – GGAATCTCCACCGCAATGA – 3'	5' – GGACAGAGTTCATGTGGTAGT – 3'	IDT
<i>IL17RA</i>	5' – CCCTGTTCTCCTCACATTCC – 3'	5' – CGGACAGCAAACACCATACT – 3'	IDT
<i>IL1B</i>	5' – CCTGGACTTCCTGTCTAC – 3'	5' – AAGTGAGTAGGAGAGGTGACAG-3'	IDT
<i>IL1R1</i>	5' – ATGCCCTCTGAATGTTGA – 3'	5' – TGGGCTGTGGATGACTTAAC – 3'	IDT
<i>IL23A</i>	5' – CCCAGCAAGGCCAAGATAAA – 3'	5' – CAGCATCACATGTCAGTCAGTA – 3'	IDT
<i>IL23R</i>	5' – CCTGGCTCTGAAGTGGATTAA – 3'	5' – GACACCAGCTGAAGAGTATGT – 3'	IDT
<i>MMP19</i>	5' – GAGCCCTTCTTCCATCAA – 3'	5' – CCGCACCTGGTCTTGAAATA – 3'	IDT
<i>SLC2A1</i>	5' – GTCCCTACGTCTTCATCATCTTC – 3'	5' – CTCGGGTGTCTTGTCACTTT – 3'	IDT
<i>SPP1</i>	5' – GCCACAAGCAGTCCAGATTA – 3'	5' – GGGTGTACAACCAGCATATCTTC – 3'	IDT
<i>TBPH</i>	5' – ACAGCCTGCCACCTTACG – 3'	5' – TGCCATAAGGCATATTGGACTA – 3'	IDT
<i>THBS1</i>	5' – AGGCCAAGTGTACCAATAAG – 3'	5' – GACCTCAAAGCCAGACCTTTA – 3'	IDT
<i>VEGFA</i>	5' – GCCAGCACATAGGAGAGATG – 3'	5' – CCAGGACTTATACCGGGATTTC – 3'	IDT

Réglages des channels pour l'Axioscan

CD31 / TMEM119

Channels	DAPI	RhReX	Cy5	EGFP
Cible observée	Noyaux	TMEM119	CD31	Autofluorescence
Intensité du laser	2.00 %	20.00 %	15.00 %	50.00 %
Exposition	5 ms	200 ms	50 ms	50 ms

CD8+ / Foxp3+

Channels	DAPI	RhReX	Cy5	EGFP
Cible observée	Noyaux	CD8+	Foxp3+	Autofluorescence
Intensité du laser	2.00 %	30.00 %	30.00 %	50.00 %
Exposition	5 ms	100 ms	100 ms	50 ms

CD4+

Channels	DAPI	RhReX	Cy5	EGFP
Cible observée	Noyaux	CD4+	/	Autofluorescence
Intensité du laser	2.00%	50.00 %	50.00 %	50.00 %
Exposition	5 ms	150 ms	150 ms	50 ms

Bibliographie

1. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*. 2021;23(8):1231-1251. doi:10.1093/neuonc/noab106
2. Xu S, Tang L, Li X, Fan F, Liu Z. Immunotherapy for glioma: Current management and future application. *Cancer Letters*. 2020;476:1-12. doi:10.1016/j.canlet.2020.02.002
3. Czarnywojtek A, Borowska M, Dyrka K, et al. Glioblastoma Multiforme: The Latest Diagnostics and Treatment Techniques. *Pharmacology*. 2023;108(5):423-431. doi:10.1159/000531319
4. Chen R, Smith-Cohn M, Cohen AL, Colman H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics*. 2017;14(2):284-297. doi:10.1007/s13311-017-0519-x
5. Wu W, Klockow JL, Zhang M, et al. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacological Research*. 2021;171:105780. doi:10.1016/j.phrs.2021.105780
6. Wang LM, Englander ZK, Miller ML, Bruce JN. Malignant Glioma. In: Rezaei N, Hanaei S, eds. *Human Brain and Spinal Cord Tumors: From Bench to Bedside. Volume 2*. Vol 1405. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing; 2023:1-30. doi:10.1007/978-3-031-23705-8_1
7. Davis M. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *CJON*. 2016;20(5):S2-S8. doi:10.1188/16.CJON.S1.2-8
8. Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol*. 2012;108(1):11-27. doi:10.1007/s11060-011-0793-0
9. Sattiraju A, Sai KKS, Mintz A. Glioblastoma Stem Cells and Their Microenvironment. In: Birbrair A, ed. *Stem Cell Microenvironments and Beyond*. Vol 1041. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer International Publishing; 2017:119-140. doi:10.1007/978-3-319-69194-7_7
10. Goffart N, Kroonen J, Rogister B. Glioblastoma-Initiating Cells: Relationship with Neural Stem Cells and the Micro-Environment. *Cancers*. 2013;5(3):1049-1071. doi:10.3390/cancers5031049
11. Yao M, Li S, Wu X, et al. Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cell Mol Immunol*. 2018;15(8):737-739. doi:10.1038/cmi.2017.159
12. Ah-Pine F, Khettab M, Bedoui Y, et al. On the origin and development of glioblastoma: multifaceted role of perivascular mesenchymal stromal cells. *acta neuropathol commun*. 2023;11(1):104. doi:10.1186/s40478-023-01605-x
13. Stiles CD, Rowitch DH. Glioma Stem Cells: A Midterm Exam. *Neuron*. 2008;58(6):832-846. doi:10.1016/j.neuron.2008.05.031
14. Zhang X, Zhao L, Zhang H, et al. The immunosuppressive microenvironment and immunotherapy in human glioblastoma. *Front Immunol*. 2022;13:1003651. doi:10.3389/fimmu.2022.1003651
15. Tang X, Zuo C, Fang P, et al. Targeting Glioblastoma Stem Cells: A Review on Biomarkers, Signal Pathways and Targeted Therapy. *Front Oncol*. 2021;11:701291. doi:10.3389/fonc.2021.701291

16. Goffart N, Lombard A, Lallemand F, et al. CXCL12 mediates glioblastoma resistance to radiotherapy in the subventricular zone. *Neuro-Oncology*. 2017;19(1):66-77. doi:10.1093/neuonc/now136
17. Lombard A, Digregorio M, Delcamp C, Rogister B, Piette C, Coppiepers N. The Subventricular Zone, a Hideout for Adult and Pediatric High-Grade Glioma Stem Cells. *Front Oncol*. 2021;10:614930. doi:10.3389/fonc.2020.614930
18. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444(7120):756-760. doi:10.1038/nature05236
19. Wang D, Wang C, Wang L, Chen Y. A comprehensive review in improving delivery of small-molecule chemotherapeutic agents overcoming the blood-brain/brain tumor barriers for glioblastoma treatment. *Drug Delivery*. 2019;26(1):551-565. doi:10.1080/10717544.2019.1616235
20. Sharma P, Aaroe A, Liang J, Puduvalli VK. Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts. *Neuro-Oncology Advances*. 2023;5(1):vdad009. doi:10.1093/noajnl/vdad009
21. Andersen RS, Anand A, Harwood DSL, Kristensen BW. Tumor-Associated Microglia and Macrophages in the Glioblastoma Microenvironment and Their Implications for Therapy. *Cancers*. 2021;13(17):4255. doi:10.3390/cancers13174255
22. Mi Y, Guo N, Luan J, et al. The Emerging Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Glioma Immune Suppressive Microenvironment. *Front Immunol*. 2020;11:737. doi:10.3389/fimmu.2020.00737
23. Wang H, Zhou H, Xu J, et al. Different T-cell subsets in glioblastoma multiforme and targeted immunotherapy. *Cancer Letters*. 2021;496:134-143. doi:10.1016/j.canlet.2020.09.028
24. Khan F, Pang L, Dunteman M, Lesniak MS, Heimberger AB, Chen P. Macrophages and microglia in glioblastoma: heterogeneity, plasticity, and therapy. *Journal of Clinical Investigation*. 2023;133(1):e163446. doi:10.1172/JCI163446
25. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2008;66(1):1-9. doi:10.1016/j.critrevonc.2007.07.004
26. Boutilier AJ, Elsawa SF. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *IJMS*. 2021;22(13):6995. doi:10.3390/ijms22136995
27. Dello Russo C, Cappoli N, Coletta I, et al. The human microglial HMC3 cell line: where do we stand? A systematic literature review. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):259. doi:10.1186/s12974-018-1288-0
28. Geribaldi-Doldán N, Fernández-Ponce C, Quiroz RN, et al. The Role of Microglia in Glioblastoma. *Front Oncol*. 2020;10:603495. doi:10.3389/fonc.2020.603495
29. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res*. 2020;8(1):49. doi:10.1186/s40364-020-00228-x
30. Himes BT, Geiger PA, Ayasoufi K, Bhargav AG, Brown DA, Parney IF. Immunosuppression in Glioblastoma: Current Understanding and Therapeutic Implications. *Front Oncol*. 2021;11:770561. doi:10.3389/fonc.2021.770561
31. Widodo SS, Dinevska M, Furst LM, Stylli SS, Mantamadiotis T. IL-10 in glioma. *Br J Cancer*. 2021;125(11):1466-1476. doi:10.1038/s41416-021-01515-6

32. Ma RY, Black A, Qian BZ. Macrophage diversity in cancer revisited in the era of single-cell omics. *Trends in Immunology*. 2022;43(7):546-563. doi:10.1016/j.it.2022.04.008
33. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*. 2018;48(2):202-213. doi:10.1016/j.immuni.2018.01.007
34. Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. T cells in health and disease. *Sig Transduct Target Ther*. 2023;8(1):235. doi:10.1038/s41392-023-01471-y
35. Łaszczych D, Czernicka A, Gostomczyk K, Szylberg Ł, Borowczak J. The role of IL-17 in the pathogenesis and treatment of glioblastoma—an update on the state of the art and future perspectives. *Med Oncol*. 2024;41(8):187. doi:10.1007/s12032-024-02434-1
36. Woroniecka KI, Rhodin KE, Chongsathidkiet P, Keith KA, Fecci PE. T-cell Dysfunction in Glioblastoma: Applying a New Framework. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(16):3792-3802. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0047
37. Asadzadeh Z, Mohammadi H, Safarzadeh E, et al. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cellular Immunology*. 2017;322:15-25. doi:10.1016/j.cellimm.2017.10.015
38. Lin H, Liu C, Hu A, Zhang D, Yang H, Mao Y. Understanding the immunosuppressive microenvironment of glioma: mechanistic insights and clinical perspectives. *J Hematol Oncol*. 2024;17(1):31. doi:10.1186/s13045-024-01544-7
39. Huang J, Liu F, Liu Z, et al. Immune Checkpoint in Glioblastoma: Promising and Challenging. *Front Pharmacol*. 2017;8:242. doi:10.3389/fphar.2017.00242
40. Grice S, Olsson-Brown A, Naisbitt DJ, Hammond S. Immunological Drug–Drug Interactions Affect the Efficacy and Safety of Immune Checkpoint Inhibitor Therapies. *Chem Res Toxicol*. 2024;37(7):1086-1103. doi:10.1021/acs.chemrestox.4c00067
41. Taefehshokr N, Baradaran B, Baghbanzadeh A, Taefehshokr S. Promising approaches in cancer immunotherapy. *Immunobiology*. 2020;225(2):151875. doi:10.1016/j.imbio.2019.11.010
42. Inocencio JF, Mitrasinovic S, Asad M, Parney IF, Zang X, Himes BT. Immune checkpoint pathways in glioblastoma: a diverse and evolving landscape. *Front Immunol*. 2024;15:1424396. doi:10.3389/fimmu.2024.1424396
43. Yabo YA, Niclou SP, Golebiewska A. Cancer cell heterogeneity and plasticity: A paradigm shift in glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2022;24(5):669-682. doi:10.1093/neuonc/noab269
44. Doucette T, Rao G, Rao A, et al. Immune Heterogeneity of Glioblastoma Subtypes: Extrapolation from the Cancer Genome Atlas. *Cancer Immunology Research*. 2013;1(2):112-122. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0028
45. Bjerkvig R, Johansson M, Miletic H, Niclou SP. Cancer stem cells and angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 2009;19(5):279-284. doi:10.1016/j.semancer.2009.09.001
46. Carmeliet P. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology*. 2005;69(Suppl. 3):4-10. doi:10.1159/000088478
47. Hillen F, Griffioen AW. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(3-4):489-502. doi:10.1007/s10555-007-9094-7
48. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor:

Glioblastoma. *Mol Neurobiol.* 2020;57(5):2461-2478. doi:10.1007/s12035-020-01892-8

49. Wei X, Chen Y, Jiang X, et al. Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments. *Mol Cancer.* 2021;20(1):7. doi:10.1186/s12943-020-01288-1
50. Seano G, Jain RK. Vessel co-option in glioblastoma: emerging insights and opportunities. *Angiogenesis.* 2020;23(1):9-16. doi:10.1007/s10456-019-09691-z
51. Donnem T, Hu J, Ferguson M, et al. Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment? *Cancer Medicine.* 2013;2(4):427-436. doi:10.1002/cam4.105
52. Monteiro A, Hill R, Pilkington G, Madureira P. The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion. *Cells.* 2017;6(4):45. doi:10.3390/cells6040045
53. Park JH, Lee HK. Current Understanding of Hypoxia in Glioblastoma Multiforme and Its Response to Immunotherapy. *Cancers.* 2022;14(5):1176. doi:10.3390/cancers14051176
54. Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-Oncology.* 2005;7(2):134-153. doi:10.1215/S1152851704001115
55. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular Signalling.* 2007;19(10):2003-2012. doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.013
56. Wang X, Bove AM, Simone G, Ma B. Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:599281. doi:10.3389/fcell.2020.599281
57. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & Cancer.* 2011;2(12):1097-1105. doi:10.1177/1947601911423031
58. Mao J ming, Liu J, Guo G, Mao X gang, Li C xin. Glioblastoma vasculogenic mimicry: signaling pathways progression and potential anti-angiogenesis targets. *Biomark Res.* 2015;3(1):8. doi:10.1186/s40364-015-0034-3
59. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol.* 2014;5. doi:10.3389/fphys.2014.00075
60. Ping Y, Yao X, Jiang J, et al. The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 promote glioma stem cell-mediated VEGF production and tumour angiogenesis via PI3K/AKT signalling. *The Journal of Pathology.* 2011;224(3):344-354. doi:10.1002/path.2908
61. Mortezaee K. CXCL12/CXCR4 axis in the microenvironment of solid tumors: A critical mediator of metastasis. *Life Sciences.* 2020;249:117534. doi:10.1016/j.lfs.2020.117534
62. Mezzapelle R, Leo M, Caprioglio F, et al. CXCR4/CXCL12 Activities in the Tumor Microenvironment and Implications for Tumor Immunotherapy. *Cancers.* 2022;14(9):2314. doi:10.3390/cancers14092314
63. WÄrth R, Bajetto A, Harrison JK, Barbieri F, Florio T. CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment. *Front Cell Neurosci.* 2014;8. doi:10.3389/fncel.2014.00144

64. Janssens R, Struyf S, Proost P. The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell Mol Immunol.* 2018;15(4):299-311. doi:10.1038/cmi.2017.107
65. Goffart N, Kroonen J, Di Valentin E, et al. Adult mouse subventricular zones stimulate glioblastoma stem cells specific invasion through CXCL12/CXCR4 signaling. *Neuro-Oncology.* 2015;17(1):81-94. doi:10.1093/neuonc/nou144
66. Zhang S, Rabkin SD. The discovery and development of oncolytic viruses: are they the future of cancer immunotherapy? *Expert Opinion on Drug Discovery.* 2021;16(4):391-410. doi:10.1080/17460441.2021.1850689
67. Goradel NH, Baker AT, Arashkia A, Ebrahimi N, Ghorghanlu S, Negahdari B. Oncolytic virotherapy: Challenges and solutions. *Current Problems in Cancer.* 2021;45(1):100639. doi:10.1016/j.currprob-cancer.2020.100639
68. Davis JJ, Fang B. Oncolytic virotherapy for cancer treatment: challenges and solutions. *J Gene Med.* 2005;7(11):1380-1389. doi:10.1002/jgm.800
69. Rius-Rocabert S, García-Romero N, García A, Ayuso-Sacido A, Nistal-Villan E. Oncolytic Virotherapy in Glioma Tumors. *IJMS.* 2020;21(20):7604. doi:10.3390/ijms21207604
70. Kardani K, Sanchez Gil J, Rabkin SD. Oncolytic herpes simplex viruses for the treatment of glioma and targeting glioblastoma stem-like cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;13:1206111. doi:10.3389/fcimb.2023.1206111
71. Ahmad I, Wilson DW. HSV-1 Cytoplasmic Envelopment and Egress. *IJMS.* 2020;21(17):5969. doi:10.3390/ijms21175969
72. Lin D, Shen Y, Liang T. Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions. *Sig Transduct Target Ther.* 2023;8(1):156. doi:10.1038/s41392-023-01407-6
73. Zhu S, Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence.* 2021;12(1):2670-2702. doi:10.1080/21505594.2021.1982373
74. Peters C, Rabkin SD. Designing herpes viruses as oncolytics. *Molecular Therapy - Oncolytics.* 2015;2:15010. doi:10.1038/mto.2015.10
75. Nguyen HM, Saha D. The Current State of Oncolytic Herpes Simplex Virus for Glioblastoma Treatment. *OV.* 2021;Volume 10:1-27. doi:10.2147/OV.S268426
76. Ling AL, Solomon IH, Landivar AM, et al. Clinical trial links oncolytic immunoactivation to survival in glioblastoma. *Nature.* 2023;623(7985):157-166. doi:10.1038/s41586-023-06623-2
77. Crump MP. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *The EMBO Journal.* 1997;16(23):6996-7007. doi:10.1093/emboj/16.23.6996
78. Kurozumi K, Hardcastle J, Thakur R, et al. Oncolytic HSV-1 infection of tumors induces angiogenesis and upregulates CYR61. *Mol Ther.* 2008;16(8):1382-1391. doi:10.1038/mt.2008.112
79. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):16878. doi:10.1038/s41598-017-17204-5
80. Schmidt U, Weigert M, Broaddus C, Myers G. Cell Detection with Star-Convex Polygons. In: Frangi AF, Schnabel JA, Davatzikos C, Alberola-López C, Fichtinger G, eds. *Medical Image Computing and*

Computer Assisted Intervention – MICCAI 2018. Vol 11071. Lecture Notes in Computer Science. Springer International Publishing; 2018:265-273. doi:10.1007/978-3-030-00934-2_30

81. Zhang AB, Mozaffari K, Aguirre B, et al. Exploring the Past, Present, and Future of Anti-Angiogenic Therapy in Glioblastoma. *Cancers*. 2023;15(3):830. doi:10.3390/cancers15030830
82. Mauldin IS, Jo J, Wages NA, et al. Proliferating CD8+ T Cell Infiltrates Are Associated with Improved Survival in Glioblastoma. *Cells*. 2021;10(12):3378. doi:10.3390/cells10123378
83. Cao C, Xu M, Wei Y, et al. CXCR4 orchestrates the TOX-programmed exhausted phenotype of CD8+ T cells via JAK2/STAT3 pathway. *Cell Genomics*. 2024;4(10):100659. doi:10.1016/j.xgen.2024.100659
84. Khan O, Giles JR, McDonald S, et al. TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion. *Nature*. 2019;571(7764):211-218. doi:10.1038/s41586-019-1325-x
85. Kim J, Patel M, Ruzevick J, Jackson C, Lim M. STAT3 Activation in Glioblastoma: Biochemical and Therapeutic Implications. *Cancers*. 2014;6(1):376-395. doi:10.3390/cancers6010376
86. Vila-Coro AJ, Rodríguez-Frade JM, Martín De Ana A, Moreno-Ortíz MC, Martínez-A C, Mellado M. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J*. 1999;13(13):1699-1710.
87. Ahr B, Denizot M, Robert-Hebmann V, Brelot A, Biard-Piechaczyk M. Identification of the Cytoplasmic Domains of CXCR4 Involved in Jak2 and STAT3 Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(8):6692-6700. doi:10.1074/jbc.M408481200
88. Cai X, Chen R, Ma K, et al. Identification of the CXCL12–CXCR4/CXCR7 axis as a potential therapeutic target for immunomodulating macrophage polarization and foreign body response to implanted biomaterials. *Applied Materials Today*. 2020;18:100454. doi:10.1016/j.apmt.2019.100454
89. Aghi M, Rabkin SD, Martuza RL. Angiogenic Response Caused by Oncolytic Herpes Simplex Virus-Induced Reduced Thrombospondin Expression Can Be Prevented by Specific Viral Mutations or by Administering a Thrombospondin-Derived Peptide. *Cancer Research*. 2007;67(2):440-444. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3145
90. Noonan DM, De Lerma Barbaro A, Vannini N, Mortara L, Albini A. Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer Metastasis Rev*. 2008;27(1):31-40. doi:10.1007/s10555-007-9108-5
91. Frantz S, Vincent KA, Feron O, Kelly RA. Innate Immunity and Angiogenesis. *Circulation Research*. 2005;96(1):15-26. doi:10.1161/01.RES.0000153188.68898.ac
92. Pham K, Luo D, Siemann DW, et al. VEGFR inhibitors upregulate CXCR4 in VEGF receptor-expressing glioblastoma in a TGF β R signaling-dependent manner. *Cancer Letters*. 2015;360(1):60-67. doi:10.1016/j.canlet.2015.02.005
93. Xie D, Yin D, Wang HJ, et al. Levels of Expression of **CYR61** and **CTGF** Are Prognostic for Tumor Progression and Survival of Individuals with Gliomas. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(6):2072-2081. doi:10.1158/1078-0432.CCR-0659-03
94. Goodwin CR, Lal B, Zhou X, et al. Cyr61 mediates hepatocyte growth factor-dependent tumor cell growth, migration, and Akt activation. *Cancer Res*. 2010;70(7):2932-2941. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3570

95. Cheng G, Zhang H, Zhang L, Zhang J. Cyr61 promotes growth of glioblastoma in vitro and in vivo. *Tumor Biol.* 2015;36(4):2869-2873. doi:10.1007/s13277-014-2915-8
96. Haseley A, Boone S, Wojton J, et al. Extracellular Matrix Protein CCN1 Limits Oncolytic Efficacy in Glioma. *Cancer Research.* 2012;72(6):1353-1362. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2526
97. Hoppenbrouwers T, Bastiaan-Net S, Garssen J, Pellegrini N, Willemse LEM, Wichers HJ. Functional differences between primary monocyte-derived and THP-1 macrophages and their response to LCPUFAs. *PharmaNutrition.* 2022;22:100322. doi:10.1016/j.phanu.2022.100322
98. Nascimento CR, Rodrigues Fernandes NA, Gonzalez Maldonado LA, Rossa Junior C. Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-1 as macrophage models for in vitro studies. *Biochemistry and Biophysics Reports.* 2022;32:101383. doi:10.1016/j.bbrep.2022.101383
99. Beloglazova I, Zubkova E, Dergilev K, Goltseva Y, Parfyonova Y. New Insight on 2D In Vitro Angiogenesis Models: All That Stretches Is Not a Tube. *Cells.* 2022;11(20):3278. doi:10.3390/cells11203278
100. DeCicco-Skinner KL, Henry GH, Cataisson C, et al. Endothelial Cell Tube Formation Assay for the In Vitro Study of Angiogenesis. *JoVE.* 2014;(91):51312. doi:10.3791/51312