THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

Ecole doctorale CBS2 n°168- Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche CNRS UMR 9002 Institut de Génétique Humaine - AZELEAD

IMPACT DES ACIDES NUCLEIQUES CYTOSOLIQUES SUR L'IMMUNITE ANTITUMORALE DANS UN MODELE DE GLIOBLASTOME

Présentée par Johanna MARINES

Le 13 Décembre 2021

Sous la direction de Karima KISSA et Nadine LAGUETTE

Devant le jury composé de

Dr. Céline GONGORA, DR2, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier	Présidente du Jury
Dr. Stéphane BIACCHESI, DR2, HDR, Inrae	Rapporteur
Dr. Pierre-Olivier ANGRAND, Professeur des Universités, Université de Lille	Rapporteur
Dr. Vahan KEPENEKIAN, Praticien Hospitalier, Hôpital Lyon Sud	Examinateur
Dr. Karima KISSA, CR1, UMR5235, Montpellier	Directrice de thèse
Dr. Nadine LAGUETTE, DR2, Institut de Génétique Humaine, Montpellier	Co-Directrice de thèse
Dr. Laura FONTENILLE, PhD, Azelead	Invitée

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

« Dans la vie rien n'est à craindre… tout est à comprendre. »

Marie Curie

Remerciements

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail, en particulier Mr. Stéphane BIACCHESI et Mr. Pierre-Olivier ANGRAND pour leur investissement en tant que rapporteur de cette thèse. Je tiens également à remercier Mme Céline GONGORA pour présider cette thèse et Mr Vahan KEPENEKIAN pour avoir accepté d'examiner mon travail. C'est un honneur pour moi de vous compter parmi les membres de mon jury et de vous présenter les résultats de ces trois années de thèse.

Je tiens évidemment à remercier mes deux directrices de thèse Karima KISSA et Nadine LAGUETTE, sans oublier Laura FONTENILLE sans qui la thèse n'aurait pas vu le jour. Merci à vous trois pour m'avoir accueilli dans vos équipes respectives. Malgré les difficultés, j'ai beaucoup appris à vos côtés au cours de ces trois dernières années. Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance et une grande liberté dans mon travail de recherche.

Je remercie aussi les membres de mon comité de thèse Mme Céline COUGOULE, Mr. Sébastien NISOLE, et Mme Christelle LANGEVIN pour m'avoir guidé et conseillé au cours de la thèse.

Je remercie également mes collègues au sein de mes deux équipes.

- Merci à toi Francesca pour avoir été là au cours de mes deux dernières années de thèse, pour ton amitié, ta confiance. Tu as été un vrai rayon de soleil qui éclairait mes semaines brumeuses et moroses. Et n'oublie pas « I'm a survivor ».
- Merci à toi Nam pour ton aide technique qui ne faillit jamais, pour ta gentillesse et ton écoute en toute circonstance. C'est un vrai bonheur de travailler avec toi.
- Merci à toi Julien, le pro des statistiques mais aussi des blagues misogynes et pour ta bonne humeur !
- Merci à toi Clara, pour tout. Tu as été l'épaule sur laquelle j'ai pu m'appuyer au cours de ces trois années de thèse et je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi. Travailler avec toi a été une vraie chance tant au niveau humain que professionnel ! Merci aussi pour ton amitié et tous ces moments partagés en dehors du laboratoire.
- Merci à toi Isabelle pour tes conseils séries, tes classiques musicaux (parfois inavouables) chantés à tue-tête dans le laboratoire et ta bienveillance. Je n'oublierai pas ces quelques manips matinales à tes côtés à disséquer des souris. Travailler à tes côtés m'a beaucoup apporté !
- Merci à toi Mathilde, pour ta bonne humeur et ton dynamisme, tu es une fille extra, toujours. joviale et de bonne humeur avec qui j'ai adoré travailler !
- Merci à toi Hanane pour nos discussions, je te souhaite le meilleur pour la suite de ta thèse.
- Merci à toi Alizée pour nos discussions littéraires et instagramesques.
- Merci à Anna, Kashia et Jessica pour votre aide, vos conseils, votre patience et votre gentillesse.

Je tiens à remercier les deux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer au cours de ma thèse. Tout d'abord, ma première stagiaire Eva, merci pour ta participation à ce projet et ton efficacité ! Je garde un excellent moment des moments que l'on a pu partager. Merci aussi à toi Aischa, pour ta motivation

exceptionnelle et tes questions toujours pertinentes. Tu as été la stagiaire que tout le monde rêve d'avoir. Merci à toi pour ton soutien et pour avoir continué de prendre de mes nouvelles même après ton départ.

Je remercie mes amis avec qui l'amitié a perduré avec le temps, qui m'ont vu évolué, qui m'ont toujours soutenu.

- Je pense à toi Pauline, plus de douze ans d'amitié et tu es toujours là, à t'endormir sur mon canapé, à partager des sushis et des pizzas qui n'arrivent pas devant Koh-Lanta. Merci pour ton écoute sans faille, ta joie de vivre et ta générosité qui me font toujours passer des moments exceptionnels. Je me sens si chanceuse de t'avoir dans ma vie.

- Merci à mes formidables amis, Jennifer, ma « sœur-cière » d'amour pour ton énergie, ta folie communicative, ton écoute. Je ne pourrais plus me passer de toi ça c'est sûr ! Merci à toi Alric pour ta gentillesse, ta douceur et tes conseils toujours avisés. Tu es une personne sensationnelle au grand cœur. Avec Jenn vous êtes tous les deux devenus des [piliers] indispensables à ma vie. #Destinée

Je remercie ma famille, sans qui ce parcours n'aurait jamais abouti, mon frère, mes oncles, mes tantes, cousins, cousines, j'ai beaucoup de chance d'être si bien entourée. Je tiens à remercier mes grands-parents, mes deux grands-pères Jean-Louis et Gilbert. A mes deux grands-mères parties trop tôt Thérèse et Marie-Thé vos forces de caractères ont toujours été une immense source d'inspiration dans mon quotidien, vous êtes des exemples pour moi et ce travail vous est dédié. Dans les moments de doute, il me suffisait de penser à vous deux pour rebondir et retrouver l'envie de ne rien lâcher. Merci pour les doux souvenirs d'enfance que vous m'avez laissés. Où que vous soyez, je sais que vous etes fières de moi.

Je remercie mes parents, Papa, Maman à chaque fois que je vous vois, je vois la fierté et l'amour dans vos yeux, ce sont les plus beaux cadeaux qu'un enfant puisse rêver avoir. Papa, merci pour ta force, tu es un roc que rien ne peux perturber et je t'admire pour cela. Maman, merci pour m'avoir transmis cette curiosité qui me pousse à vouloir aller plus loin et donner le meilleur de moi. Tu es un modèle pour moi.Je vous aime tant. Promis cette fois-ci les études c'est fini ! Vous pouvez dormir tranquille je n'enchaine pas sur une troisième thèse !!

Pour finir merci à toi Roro, mon compagnon de vie. Presque la moitié de notre jeune vie passée ensemble. Un vieux couple en somme. 14 ans que tu me pousses à aller le plus loin possible, à donner le meilleur de moi. Merci d'avoir accepté tous les choix que j'ai fait même si cela demandait parfois des sacrifices personnels. Pour tes blagues décalées dont toi seul à le secret, pour ton amour. Tu es ma plus grande force aujourd'hui. Je suis fière d'être à tes côtés. Je sais qu'ensemble on relèvera tous les défis qui jalonneront notre route.

Table des matières

Remerciements 3

Liste des abréviations 7

Liste des figures 9

Partie A : INTRODUCTION 12

Chapitre 1 : Le système immunitaire, inflammation & cancer 12

A) Le système immunitaire inné et adaptatif 12

1) Rappel sur le développement du système immunitaire : l'hématopoïèse 12

2) Macrophages 14

i) Historique et ontogénie des macrophages. 14

ii) Fonctions générales des macrophages 16

iii) Les différents sous-types de macrophages 18

3) Les acteurs du système immunitaire inné et adaptatif 21

i) Le système immunitaire inné 21

ii) Le système immunitaire adaptatif 24

4) Les différentes voies de reconnaissance des acides nucléiques cytosoliques 24

B) L'axe de signalisation cGAS-STING 26

1) Description générale de la voie cGAS-STING 26

2) Implication de la voie CGAS-STING dans le cancer 30

i) Rôle anti-tumoral de la voie cGAS-STING 30

ii) Rôle pro-tumoral de la voie cGAS-STING 32

3) Agonistes de la voie cGAS-STING et expression de cGAS et de STING dans différents types de cancers 34

Chapitre 2 : Le glioblastome & son microenvironnement 38

A) Présentation générale du glioblastome 38

1) Épidémiologie 38

2) Origine & classification 39

3) Prise en charge & résistances 41

i) Traitements conventionnels 41

ii) Récurrence et Résistances associées 44

B) Pourquoi étudier le microenvironnement tumoral ? 46

5) Différents types cellulaires associés au microenvironnement tumoral 46

6) Microglie & TAMs 48

i) Origine & fonction de la microglie 48

ii) Macrophages et microglie associés au Glioblastome (GAMM) & fonctions associées. 49

iii) De nouveaux traitements ciblant les macrophages associés aux tumeurs ? 55

7) Le microenvironnement vasculaire dans le glioblastome 60

i) Caractéristique du système vasculaire cérébral : physiologie vs pathologie 60

ii) Les processus de néovascularisation dans le glioblastome 62

iii) Thérapies ciblant les vaisseaux sanguins 65
Chapitre 3 : Les modèles in *vitro* et *in vivo* utilisés pour l'étude du glioblastome et de son microenvironnement 67
A) Modèles in *vitro* & *in vivo* 67
1) Modèles in *vitro* 67
i) Modèles 2D & 3D 67
2) Modèles *In vivo* utilisés pour l'étude du glioblastome 70
B) Le modèle zebrafish : un outil pertinent pour l'étude du glioblastome et son microenvironnement tumoral en temps réel 73
1) Présentation générale du modèle 73
i) Avantages du modèle 73
ii) Les différents stades de développement du poisson zèbre 74
iii) Développement du système immunitaire du poisson zèbre 75
2) Intérêt du poisson zèbre en oncologie 78
3) Le poisson-zèbre, un modèle fiable pour l'étude du glioblastome et de son microenvironnement 81
i) Lignées transgéniques disponibles 81
ii) Xénotransplantations 83
iii) Visualisation du microenvironnement tumoral dans le modèle zebrafish 86
iv) Étude des macrophages/microglie et des vaisseaux sanguins associée aux glioblastome dans le poisson zèbre 87
4) Le poisson-zèbre, un outil efficace pour évaluer l'efficacité de nouvelles thérapies anticancéreuses 88
Partie B : OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE 92
Partie C : RESULTATS 95
A) Effet des acides nucléiques sur la polarisation des macrophages in *vitro* & impact de la voie de signalisation cGAS-STING 95
B) Effet de cGAS sur la tumorigenèse, sur le recrutement et la polarisation des macrophages : in *vitro*/*in vivo* 102
C) Autres résultats : Effet de cGAS sur la réponse aux traitements en modèle sphéroïde 3D 110
D) Article 1 : Modélisation 3D du microenvironnement tumoral *in vivo* : un outil pour prédire le devenir du cancer 113
E) Article 2 : Caractérisation d'un modèle de glioblastome chez le poisson zèbre et étude du rôle des macrophages dans la progression tumorale par imagerie en temps réel. 124
Partie D : DISCUSSION DES RESULTATS 146
Partie E : PERSPECTIVES & APPLICATIONS FUTURES 155
Partie F : MATERIELS ET METHODES 159
A) Expériences in-*vitro* 159
B) Expériences in-vivo 164
Annexe 1 167
Annexe 2 178
Bibliographie 206

Liste des abréviations

A-B

AIM2 : Interferon-inducible protein AIM2
ADN : Acide désoxyribonucléique
AGM : Aorte gonade mesonephros
AKT : Protein kinase B
AMPs : Peptides antimicrobiens
ApoE : apolipoprotéine E
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine tri-phosphate
BHE : Barrière hémato-encéphalique
BMDM : Macrophages dérivés de la moelle osseuse

C-D

CAR-T : Chimeric Antigen receptor
CD206 (MRC1) : Récepteur au mannose
CDKN2A : kinase cycline-dépendante 2A
CDN : di-nucléotides cycliques
cGAS : GMP-AMP cyclique synthase
cGAMP : 2'3'di-GMP-AMP cyclique
CCL2 : CC chimiokine ligand 2
CLX : Xénogreffes issues de lignées cellulaires
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CMP : Progéniteurs myéloïdes communs
CLR : Récepteurs de lectine de type C
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CRM1 : Chromosomal Maintenance 1 / Exportin 1
CSF-1 : Facteur soluble de stimulation des colonies
CSH : Cellules souches hématopoïétiques
CTD : domaine C terminal
CTLA-4 : Antigène 4 cytotoxique associé aux lymphocytes T
CX3CL1 : chemokine [C-X3-C motif] ligand 1
CXCL12 : CXC chemokine ligand 12 - SDF-1
DA : Aorte dorsale
DAG : dianhydrogalactitol
DAI : DNA-dependent activator of IRFs
DAMPs : Danger associated molecular pattern
DC : dendritic cells / cellules dendritiques
DDR : DNA damage response
DDX41 : DEAD-box helicase 41
DMBA : 7,12-diméthylbenz (a) anthracène
DNA-PK: protéine kinase dépendante de l'ADN
DNA-PKcs : sous unite catalytique de DNA-PK
DPF : Day post fertilization , jour post fécondation
DSB : Cassure doubles brins

E-F-G

EGF : Facteur de croissance epidermal
EGFR : Récepteur du facteur de croissance epidermal
EHT : Transition endothéliale-hématopoïétique
EMA : Agence Eurpéenne du medicament
EMT : Transition Epithélio-mésenchymateuse
ENPP1 : Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1
EPC : Cellules progénitrices endothéliales
FDA : Food and Drug Administration
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes
GAMs : Macrophages associés au glioblastome
GBM : Glioblastome
GDNF : facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales
GEMM : modèles de souris génétiquement modifiées
GM-CSF : Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
GMT : Transition gliale mésenchymateuse
GSC : Cellules souches de glioblastome
GTP : Guanosine triphosphate

H-I-J-K

HBV : Virus de l'hépatite B
HGF : Facteur de croissance dérivé des hépatocytes
HIF-1 : Hypoxia-inducible factor 1
HIV : Virus de l'immunodéficience Humaine
HPF : Heures post fécondation
HSPC : Cellules souches et progénitrices hématopoïétiques
HSV : Herpes Simplex Virus
ICAM1 : Inter Cellular Adhesion Molecule-1
ICM : masse cellulaire intermédiaire
IDH : Isocitrate dehydrogenase
IFI16 : Interferon Gamma Inducible Protein 16
IFNAR : récepteur des interférons de type I
IFN I : Interferon de type I
IKK : IκB kinase
IRF3 : interferon regulatory factor 3

IRF9 : interferon regulatory factor 9
IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique
ISGs : Gènes stimulés par l'interféron
ISGF3 : IFN stimulated gene factor 3
ISRE : Interferon-stimulated response element
JAK1: Janus kinase 1

L-M

LPS : Lipopolysaccharides
M0 : Macrophage pré-différencié
MCP1 : Monocyte Chemoattractant protein 1
MCP-3 : Monocyte chemotactic protein-3
MDSCs : Cellules myéloïdes immunosuppressives
MMPs : Métalloprotéases Matricielles
MMP2 : Métalloprotéinase Matricielle 2
MMP9 : métalloprotéinase matricielle 9
MO : morpholino
mtDNA : ADN mitochondrial
MTIC : 3-méthyl-(triazen-1-yl)imidazole-4-carboxamide

N-O

NF1A : Nuclear factor-1
NFkB : Nuclear factor-kappa B
NGF : Facteur de croissance neuronal
NHEJ : Jonction d'extrémités non homologues
NK : Natural killer
NLR : Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins Like-Receptor
NO : oxyde nitrique
NOD mice : Non-obese diabetic mice
NOS2 : Nitric Oxide Synthase 2
OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P-Q-R

PAMPs : Pathogen associated molecular pattern
PARP1 : Poly(ADP-ribose) polymérase 1
Pb : paire de bases
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear cell
PD-1 : Programmed cell death 1
PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PD-L1 : Programmed death-ligand 1
PDX : Patients derived xenograft
PI3K : phosphatidylinositol-3-OH kinase
PJA1 : Praja Ring Finger Ubiquitin Ligase 1
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate
PNN : Polynucléaire neutrophiles
PRR : Pattern recognition receptor
Pten : Phosphatase and TENsin homolog
Ptf1a : Pancreas Associated Transcription Factor 1a
PTU : Phénylthiourée
q-RTPCR : Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
RLR : les récepteurs de type gène inductible à l'acide rétinoïque I (RIG-I)
RE : Reticulum endoplasmique
ROS : Espèces réactives de l'oxygène,

S

SASP : Phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SCF : Stell cell factor
SCID mice : severe combined immunodeficiency mice
SNC : Système nerveux central
SNP : Polymorphismes mono-nucléotidiques
STAT : signal transducer and activator of transcription
STI1 : protéine 1 inductible par le stress
STING : Stimulateur des gènes de l'interféron
STIM1 : Stromal interaction molecule 1
SVF : Sérum de Veau Foetal

T-U

TAM : Macrophage associé aux tumeurs
TBK1 : TRAF family member associated NFkB activator binding kinase 1
TERT : Telomerase Reverse Transcriptase
TGF-β ; Facteur de croissance transformant b
THC : Tissu Hématopoïétique Caudal
TIM3 : T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3)
TLR : Récepteur de type Toll
TME : Tumor microenvironment
TMZ : Témozolomide
TNFa: tumor necrosis factor alpha
TP53 (P53) : Tumor protein 53
TYK2 : Tyrosine kinase 2

V-W-X-Y-Z

VCAM1 : vascular cell adhesion molecule 1
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
WB : Western Blot
WT : Wild Type

Liste des figures

Figure 1 : Hématopoïèse 13
Figure 2 : Les macrophages résidents des tissus 15
Figure 3 : Fonction principale des macrophages 16
Figure 4 : Fonctions secondaires des macrophages 17
Figure 5 : Les différents sous-types de macrophages 18
Figure 6 : Les macrophages M1 19
Figure 7: Les macrophages M2 20
Figure 8 : Les acteurs de l'immunité innée 22
Figure 9 : Les principaux récepteurs spécialisés de l'immunité innée 23
Figure 10 : Les différentes voies de reconnaissance des acides nucléiques cytosoliques 25
Figure 11 : La voie de signalisation cGAS-STING 28
Figure 12 : Le récepteur IFNAR et la voie JAK1/STAT 29
Figure 13: Rôle antitumoral de la voie cGAS-STING 31
Figure 14 : Rôle pro-tumoral de la voie cGAS-STING 33
Figure 15 : Agonistes de la voie cGAS-STING 35
Figure 16 : Illustration du glioblastome 38
Figure 17 : Différents types de gliomes 40
Figure 18 : Approche multimodale dans la prise en charge du glioblastome 41
Figure 19 : Formule chimique du témozolomide 42
Figure 20 : Mécanismes de résistance 44
Figure 21 : Mécanisme de récurrence du glioblastome 45
Figure 22 : Le microenvironnement tumoral 46
Figure 23 : Les niches tumorales associées au glioblastome 47
Figure 24 : Microglie et macrophages recrutés, deux origines hématopoïétiques 48
Figure 25 : Évolution morphologique de la microglie sous l'effet de stimuli 49
Figure 26: Recrutement des macrophages 50
Figure 27 : Évolution du phénotype des TAM 51
Figure 28 : Fonctions pro-tumorales des TAM 51
Figure 29 : Rôle des TAM dans l'invasion tumorale 53
Figure 30 : Nouvelles thérapies ciblant les macrophages 55
Figure 31: Thérapies bloquant le recrutement des TAM 56
Figure 32 : Thérapies entrainant la déplétion des TAM 57
Figure 33: Thérapies reprogrammant les TAM-M2 en M1 58
Figure 34 : Le système vasculaire cérébral physiologique et pathologique 60
Figure 35: Mécanismes principaux de néovascularisation dans le glioblastome 62
Figure 36 : Phénomène de co-optation des vaisseaux 63

Figure 37 : Phénomène d'angiogenèse 63
Figure 38 : Phénomène de vasculogénèse 64
Figure 39 : Phénomène de mimétisme vasculaire 65
Figure 40 : Culture 2D 67
Figure 41: Culture 3D 68
Figure 42 : Différents modèles murins 70
Figure 43: Xénogreffes CLX et PDX 70
Figure 44 : Modèle syngénique 71
Figure 45: Modèle de souris génétiquement modifiées (GEMM) 72
Figure 46 : Avantages du modèle poisson-zèbre 73
Figure 47 : Les différents stades de développement du poisson zèbre 74
Figure 48 : Hématopoïèse chez le poisson zèbre 75
Figure 49 : Evolution du nombre de publications 78
Figure 50 : L'expression de KRAS induit la formation de tumeurs cérébrales 82
Figure 51 : Lignée casper (White et al. 2008) 84
Figure 52 : Les différents sites de transplantation chez le poisson zèbre 85
Figure 53: Lignée transgénique marquant les macrophages totaux Tg(mpeg1:gfp) 86
Figure 54 : Tg(fli:eGFP) Lawson et Weinstein 2002a 86
Figure 55 : Interaction microglie-glioblastome (Hamilton et al. 2016) 87
Figure 56 : Angiogénèse et dilatation des vaisseaux 88

Partie A : INTRODUCTION

Partie A : INTRODUCTION

Chapitre 1 : Le système immunitaire, inflammation & cancer

Au cours de ce chapitre, nous détaillerons les acteurs du système immunitaire inné et adaptatif et en particulier de la population macrophagique. Nous aborderons également la voie de signalisation moléculaire cGAS-STING qui joue un rôle clé dans la reconnaissance des acides nucléiques et son importance en cancérologie.

A) Le système immunitaire inné et adaptatif

Au cours de l'évolution, les vertébrés ont développé un système immunitaire complexe afin de se défendre face à leur environnement et aux nombreux organismes étrangers pathogènes qui les entourent. En plus des barrières naturelles comme la peau et les muqueuses, le développement du système immunitaire inné puis adaptatif correspondant à la différenciation de différentes populations sanguines, conduisent à la mise en place d'une immunité durable et protectrice.

1) Rappel sur le développement du système immunitaire : l'hématopoïèse

L'hématopoïèse, processus de formation des cellules sanguines à partir des souches hématopoïétiques (CSH) est largement conservé au cours de l'évolution. L'hématopoïèse se subdivise en plusieurs étapes au cours du développement embryonnaire et à l'âge adulte. Durant l'hématopoïèse embryonnaire, deux vagues hématopoïétiques se succèdent : la vague primitive et la vague définitive.

Chez les mammifères, la **vague primitive** se produit dans le sac vitellin et génère des cellules des lignées érythroïdes, macrophagique et mégacaryocytaires (Palis et al., 1999). Au cours de la **vague définitive**, les CSH émergent du plancher de l'aorte dorsale par une transition endothélio-hématopoïétique, dans une région appelée aorte-gonade-mesonephros (AGM) (Medvinsky et Dzierzak 1996, Gritz et Hirschi, 2016 ; Medvinsky et al. 2011 ; Mikkola and Orkin, 2006 ; Tavian et al. 2010).

Chez l'homme à l'âge adulte, la moelle osseuse est le siège de l'hématopoïèse. Chaque jour des milliards de cellules sanguines y sont produites. On y retrouve des **cellules souches hématopoïétiques indifférenciées totipotentes** quiescentes qui ont la particularité de pouvoir donner tous les types de cellules présentes dans le sang (Yokota et al., 2012). Les CSH sont maintenues à l'état de cellules souches pluripotentes en réponse à de nombreux signaux extracellulaires tels que l'angiopoiétine, la thrombopoiétine, le SCF (Stem Cell Factor) et le CXCL12 (Wang and Wagers 2011) qui régulent la transcription de facteurs comme Ikaros et

E2A, régulant eux-mêmes l'initiation de la différenciation (He et al. 2009). Les CSH se divisent de façon asymétrique, entrainant la production d'une nouvelle CSH (auto-renouvèlement) et d'une cellule entrant en différenciation. Sous l'effet de nombreuses molécules régulatrices appelées cytokines (lymphokines, monokines et facteur de croissance hématopoïétique), les CSH se différencient en différentes lignées cellulaires jusqu'à donner des cellules dites matures (Knoblich 2008). En s'engageant dans une lignée myéloïde ou lymphoïde, elles perdent ainsi progressivement leur capacité à produire les cellules de l'autre lignée (Rosenbauer et Tenen 2007). L'ensemble de ce processus complexe est présenté dans la figure 1.

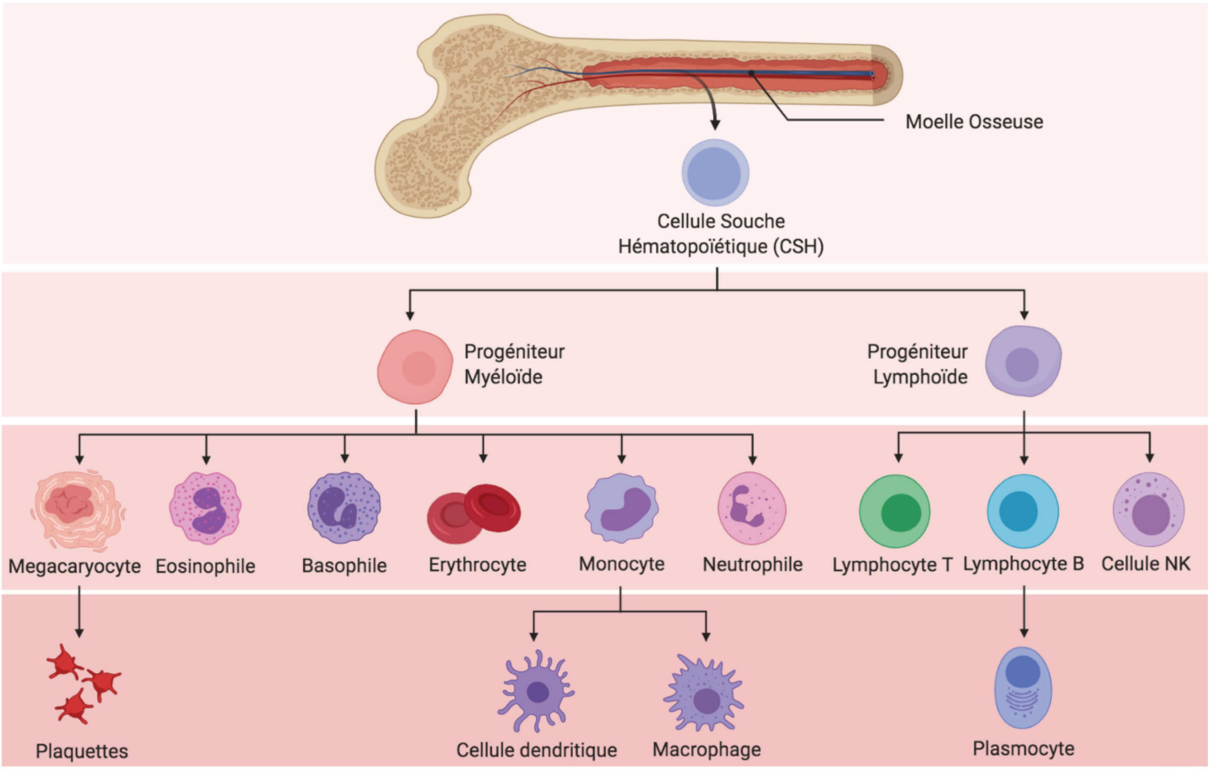


Figure 1 : Hématopoïèse

La **lignée myéloïde** conduit à la formation des globules rouges (érythrocytes), des plaquettes (thrombocytes), des polynucléaires (éosinophiles, basophiles et neutrophiles), des mastocytes ainsi que des monocytes qui donnent naissance aux cellules dendritiques ou se différencient en macrophages. **La lignée lymphoïde** conduit quant à elle à la formation des lymphocytes B, des lymphocytes T et des cellules NK (Natural Killer). L'ensemble de ces cellules constitue le socle de l'immunité et du système immunitaire inné et adaptatif.

2) *Macrophages*

Dans cette section nous aborderont la genèse des macrophages, leur plasticité via les différents sous-types de macrophages M1 et M2 couramment décrits dans la littérature. Leurs fonctions principales seront également détaillées.

i) Historique et ontogénie des macrophages.

Découverts pour la première fois à la fin du XIXème siècle, les macrophages sont des cellules immunitaires impliquées dans de nombreux processus physiologiques (Metchnikoff, 1892).

On distingue généralement deux types de macrophages au sein des tissus, les macrophages **résidents** déjà présents dans les tissus en condition physiologique et les macrophages **recrutés** après lésion tissulaire ou infection. Dans les années 1960, il a été proposé que tous les macrophages tissulaires provenaient de monocytes sanguins adultes circulants, ce qui a été le point de vue dominant au cours des cinquante dernières années malgré les preuves montrant que les macrophages tissulaires indépendants des monocytes circulants existaient (Van Furth et Cohn 1968 ; Volkman et al. 1983 ; Sawyer et al. 1982, Epelman et al. 2014). Cependant, une série de publications plus définitives ont radicalement changé notre compréhension de l'origine des macrophages en démontrant que de nombreux macrophages tissulaires résidents sont en fait établis au cours du développement embryonnaire et persistent à l'âge adulte indépendamment des monocytes sanguins circulants (Ginhoux et al. 2010 ; Schulz et al. 2012 ; Yona et al. 2013 ; Hashimoto et al. 2013 ; Epelman et al. 2014 ; Guilliams et al. 2013 ; Jakubzick et al. 2013).

Ainsi, au cours du développement, les macrophages émergent de deux vagues hématopoïétiques distinctes. **La première vague donne naissance aux macrophages primitifs** (également appelés macrophages dérivés du sac vitellin) qui jouent un rôle crucial au cours du développement précoce. Ils colonisent la plupart des tissus pour se différencier en **macrophages résidents** dans les tissus. Ces macrophages résidents portent des noms différents en fonction des tissus dans lesquels ils sont retrouvés (figure 2). Ainsi les macrophages résidents portent le nom de cellules de Kupffer dans le foie, de **microglie** dans le cerveau ou d'ostéoclastes dans le tissu osseux (Davies et al. 2013).

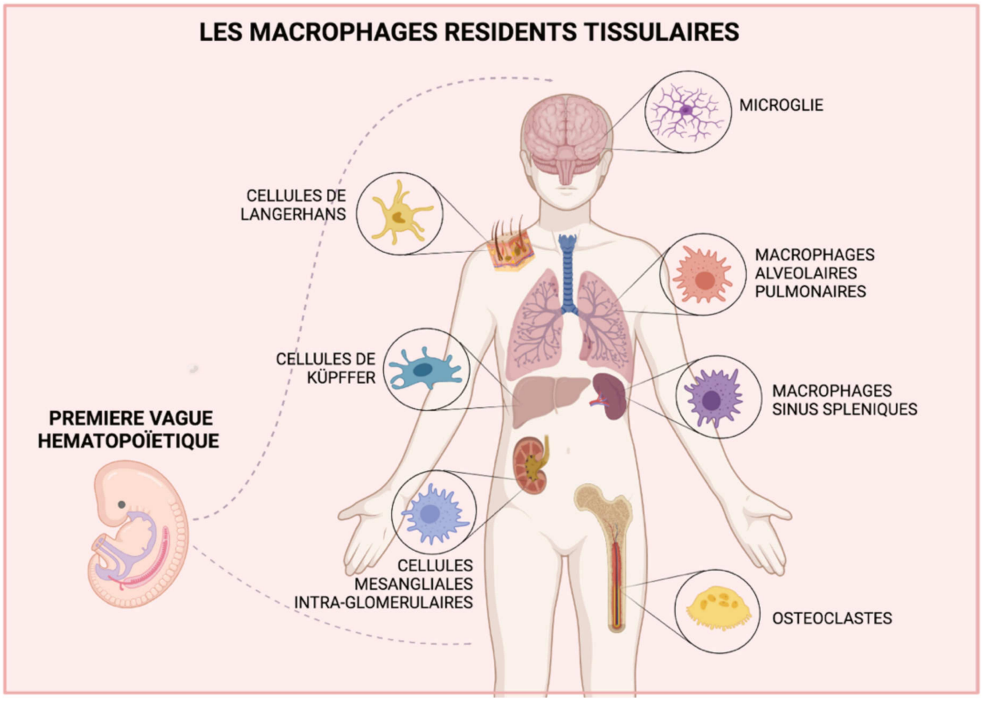


Figure 2 : Les macrophages résidents des tissus

Lors de la deuxième vague hématopoïétique, les cellules souches hématopoïétiques sont générées et peuvent se différencier en tous types de cellules sanguines. **Les macrophages définitifs appelés macrophages dérivés de la moelle osseuse** (BMDM) sont générés après plusieurs étapes de différenciation à partir des cellules souches hématopoïétiques. Les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) donnent d'abord naissance à des monocytes dans la circulation sanguine. Les monocytes présentent plusieurs marqueurs tels que le CD14, le CD11b, CD16 ainsi que des récepteurs des chimiokines comme le CCR2 (Wolf et al. 2019). A la suite d'une infection ou d'une lésion tissulaire, les monocytes circulants peuvent alors être recrutés suite à la libération de chimiokines chimioattractantes comme le CCL2 (Chemokine Ligand 2) aussi appelée Monocyte Chemoattractant protein 1 (MCP1). Les monocytes infiltrent alors activement les tissus cibles après extravasation. Selon l'environnement local, les monocytes achèvent leur différenciation sous l'effet des cytokines et du microenvironnement tissulaire spécifique et se polarisent en différents types de macrophages qui leur confèreront des fonctions distinctes (Gordon et Taylor, 2005 ; Yang et al. 2014).

ii) Fonctions générales des macrophages

Les macrophages participent à de nombreuses fonctions physiologiques et processus pathologiques. La première fonction décrite des macrophages est la **phagocytose**. Elle a d'ailleurs donné son nom aux macrophages (du grec makros = gros et phagein = manger). Ce processus cellulaire a pour objectif d'engloutir et de détruire les substances étrangères (toxines, bactéries), les débris et les cellules endommagées afin de protéger l'organisme des dangers internes et externes. La phagocytose passe par la formation d'un phagosome qui fusionne à un lysosome pour former un phagolysosome (figure 3). Le pH acide de ces vésicules permet de détruire le pathogène ou la cellule phagocytée (Hirayama et al. 2017).

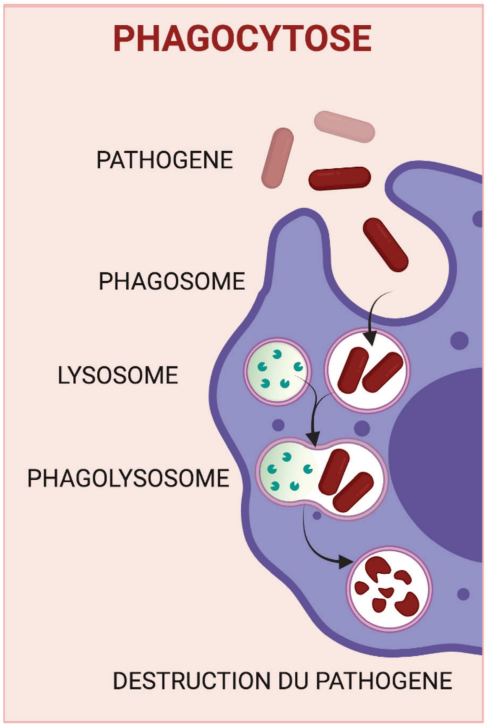


Figure 3 : Fonction principale des macrophages

Les macrophages sont également capables de sécréter de nombreuses **cytokines** pro-inflammatoires. Ils contribuent à l'élimination directe des agents pathogènes ou indirectement via l'attraction d'autres cellules immunitaires telles que les lymphocytes. C'est le cas du TNFa ou du NOS2 (Nitric Oxide Synthase 2) qui induisent la synthèse et la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote qui participent à la clairance des agents pathogènes. D'autres cytokines comme les interleukines, IL-1, IL-6 et IL-12 qui contribuent quant à elles à l'activation des lymphocytes. De plus, grâce à l'expression de marqueurs membranaires comme le CD80, le CD86 ainsi que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II, les macrophages jouent un rôle crucial dans la surveillance immunitaire en présentant des antigènes aux populations lymphocytaires (Jung et al, 2002). Ainsi, Les macrophages participent à la fois à la réponse immunitaire innée et adaptative grâce à la communication qu'ils entretiennent avec d'autres cellules immunitaires via les facteurs solubles secrétées ou les marqueurs membranaires qu'ils expriment.

En plus de la synthèse de cytokines, les macrophages produisent et sécrétent de **nombreux facteurs de croissance** comme le facteur de croissance epithélial (EGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) **et d'autres molécules de signalisation** telles que les prostaglandines, les leucotriènes, les protéases (MMP) ou le TGF-β (transforming growth factor b). En fonction du tissu, ils peuvent également sécréter des facteurs de croissance spécifiques,

comme c'est le cas de la microglie, macrophages résidents du système nerveux qui expriment notamment le facteur de croissance neuronale (NGF).

Ainsi, il a été démontré que les fonctions des macrophages dépassent largement leur simple capacité de phagocytose (figure 4). Ceux-ci sont impliqués dans l'inflammation aiguë et chronique et contribuent à de nombreux processus comme l'angiogenèse, le remodelage tissulaire, la régénération, la dégradation de la matrice extracellulaire, l'activation et la surveillance immunitaire et l'homéostasie générale des tissus (Zhang C et al. 2021; Gordon 2007, Pollard 2009 ; Wynn et al. 2013).

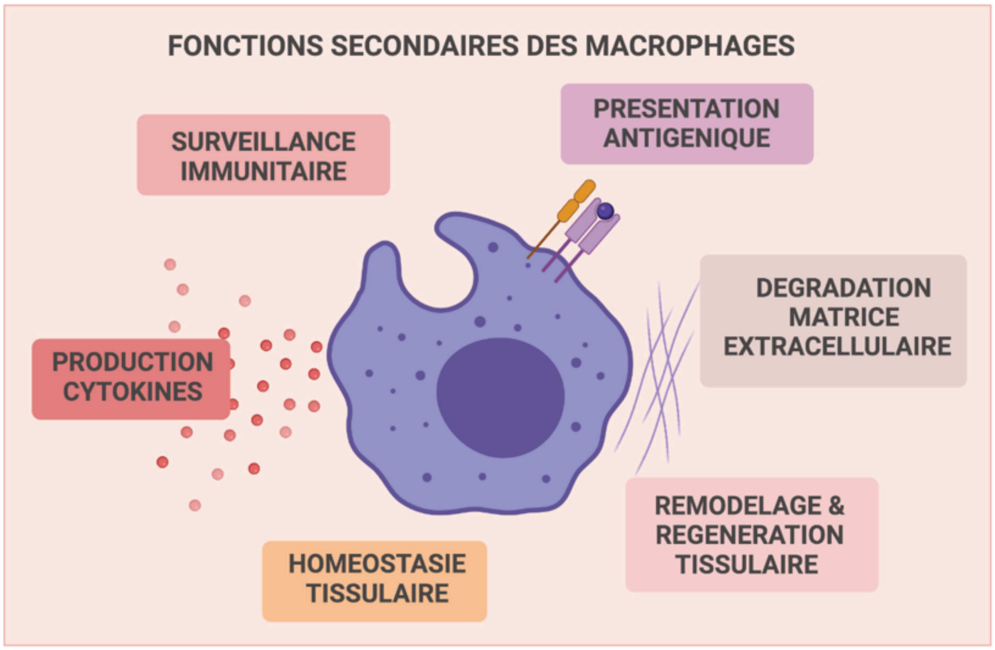


Figure 4 : Fonctions secondaires des macrophages

iii) Les différents sous-types de macrophages

Cette diversité de fonctions que nous venons de détailler repose sur la très grande **plasticité** des macrophages (Ebert et Florey, 1939). Ainsi, suite à leur infiltration au sein des tissus et sous l'influence du microenvironnement local, les macrophages peuvent se différencier en différents sous-types de macrophages. Généralement, les macrophages sont divisés en deux grands sous-types de macrophages. Les macrophages de type **M1 dits « classiques »** et les macrophages de types **M2 dits « alternatifs »**. En réponse à différents stimuli, les macrophages expriment des marqueurs membranaires spécifiques, libèrent des cytokines et chimiokines distinctes et présentent un métabolisme différent. Ces différences ont permis leur description et leur classification.

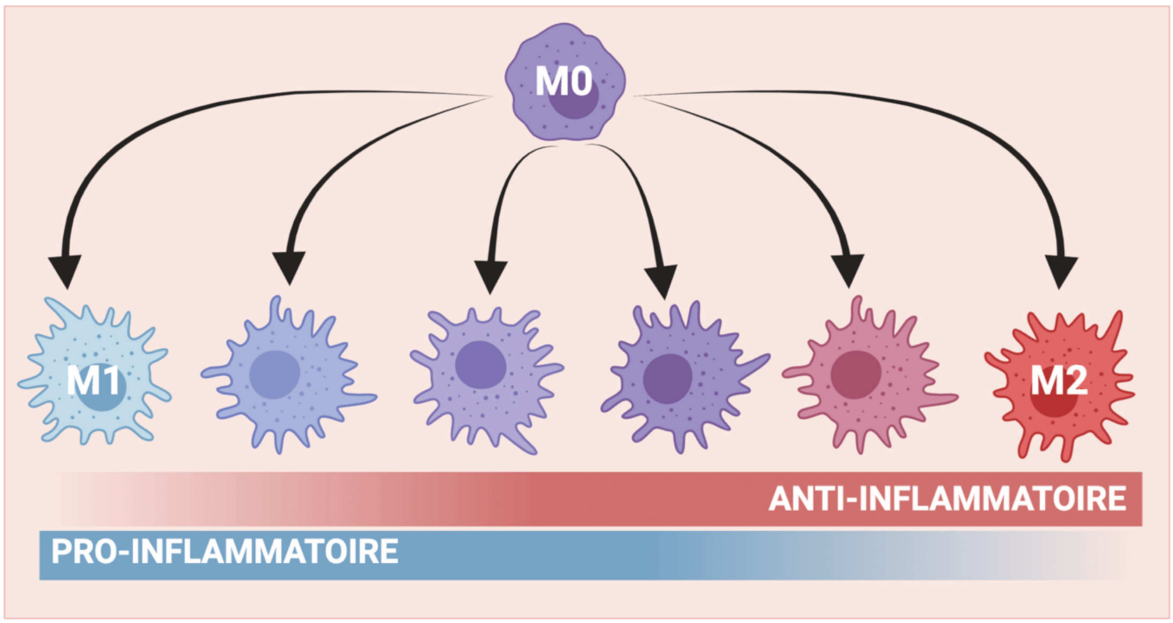


Figure 5 : Les différents sous-types de macrophages

Macrophages M1

Les **macrophages « classiques »** de type M1 sont induits par des cytokines telles que l'interféron-gamma, le TNF-alpha, l'IL-1β et le LPS (figure 6).

Ces macrophages sont définis comme étant **pro-inflammatoires** et sont caractérisés par l'expression de marqueurs de surface qui incluent le CD197/CCR7, CD80, CD86, TLR4, TLR2, CD11c. D'un point de vue sécrétoire, les macrophages M1 produisent et sécrètent de nombreuses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que le TNFa, l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-12, le CXCL9 et le CXCL10 (Sica and Mantovani et al. 2012 ; Murray et al. 2014, Mosser 2003).

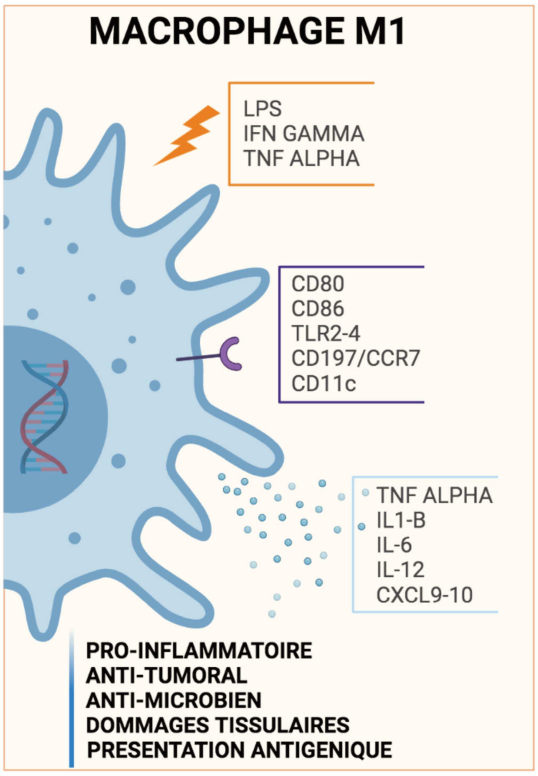


Figure 6 : Les macrophages M1

Ces macrophages sont également caractérisés par l'expression d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). En termes de métabolisme, les macrophages M1 expriment l'enzyme oxyde nitrique synthase, qui métabolise l'arginine en oxyde nitrique (NO) et en citrulline. Le NO peut être métabolisé en espèces azotées réactives en aval, tandis que la citrulline pourrait être réutilisée pour une synthèse efficace du NO via le cycle citrulline-NO (Rath, 2014).

D'un point de vue fonctionnel, les macrophages de type M1, pro-inflammatoires sont caractérisés par leurs fonctions anti-microbiennes et anti-tumorales en participant à l'élimination des pathogènes et des cellules cancéreuses (Sica et Mantovani 2012). Ce sous-type de macrophage est également fortement impliqué dans la présentation antigénique et induit des dommages tissulaires.

Macrophages M2

Les macrophages **« alternatifs »** de type M2, sont induits par différentes cytokines telles que l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 (figure 7). Alors que les macrophages M1 présentent une grande uniformité, les macrophages M2 présentent quant à eux une variabilité et une plasticité élevées à l'intérieur même de leur catégorie. C'est pour cette raison que certains travaux ont proposé un système de sous-catégorisation des macrophages M2 (en 4 sous-types appelés M2a, b, c et d) en fonction de leurs fonctions, de l'expression des marqueurs et des signaux inducteurs qui les activent (Mantovani et al, 2004 ; Gordon and Taylor, 2005 ; Martinez et al, 2008 ; Mosser and Edwards, 2008). Par exemple, les macrophages M2a sont polarisés en réponse à IL-4 et L'IL10 et jouent un rôle dans le contrôle immunitaire des parasites. Les macrophages M2b sont considérés comme des immunorégulateurs et expriment également des facteurs pro-inflammatoires de la même manière que les macrophages M1 tels que l'IL-1 β et IL-6. Les macrophages M2c sont impliqués dans la réparation et le remodelage des tissus et possèdent les caractéristiques qui ont été le plus souvent associées aux macrophages M2

historiquement. Enfin, la dernière sous-catégorie, M2d, regroupe les macrophages décrits et impliqués dans la progression tumorale, appelés macrophages associés aux tumeurs (TAM).

D'une manière plus générale, ces macrophages sont caractérisés comme étant **anti-inflammatoires**, pro-tumoraux et sont définis par l'expression de marqueurs de surface qui incluent le récepteur au mannose (aussi appelé CD206 ou MRC1), le CD209, CD200R, le CD163 (Mantovani et al. 2002 ; Stein et al, 1992). D'un point de vue sécrétoire, les macrophages M2 produisent et sécrètent de nombreuses cytokines et chimiokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10, l'IL1-Ra (l'antagoniste du récepteur à l'IL1-b), le TGF-β (Mosser and Edwards, 2008). En termes de métabolisme, les macrophages M2 sont caractérisés par l'expression de l'enzyme arginase, qui hydrolyse l'arginine en ornithine et en urée.

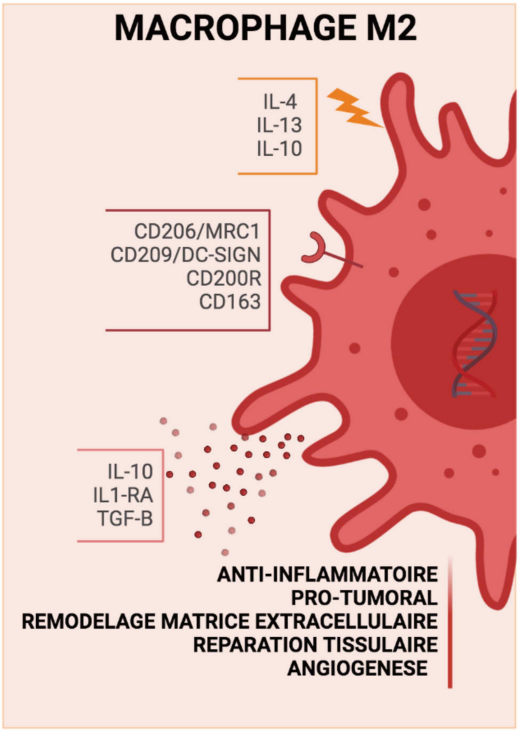


Figure 7: Les macrophages M2

D'un point de vue fonctionnel, contrairement aux macrophages M1 ces macrophages sont faiblement microbicides. Ces macrophages « alternatifs » produisent des protéines impliquées dans la synthèse de la matrice extracellulaire, dont la fibronectine, suggérant leur rôle dans le remodelage et la réparation tissulaire (Gratchev et al, 2001). Ces macrophages seraient également impliqués dans les processus angiogéniques (Jetten et al, 2014).

L'ensemble des marqueurs membranaires, des cytokines et des fonctions des macrophages de type M1 et M2 sont synthétisés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Comparaison entre macrophages M1 et M2

	M1	**M2**
Stimuli extérieurs	LPS, IFN gamma, TNFa, IL-1 β	IL4, IL13, IL10
Marqueurs membranaires	CD80, CD86, CD197, CD11c...	CD206, CD209, CD200R, CD163...
Cytokines / chemokines	IL-6, IL1-β , TNFa, IL-12, CXCL9, CXCL10, CXCL11, NOS2, CCL2, CCL5...	IL10, IL1RA, TGF- β, CCL18, CCL22, CCR2...
Métabolisme	NO	Arginase
Fonctions principales	Pro-inflammatoire Présentation antigénique Antimicrobienne Phagocytose Anti-tumoral	Anti-inflammatoire Réparation et remodelage tissulaire Angiogénèse Pro-tumoral

Versatilité et plasticité des macrophages

Il convient néanmoins de préciser que cette classification n'est qu'une vision simplifiée et relativement peu physiologique. En réalité, les macrophages M1 et M2 représentent davantage les deux extrêmes d'une même classification. Physiologiquement, un spectre continu existe entre ces deux phénotypes fonctionnels (Biswas and Mantovani, 2010 ; Edwards et al., 2006 ; Mantovani et al., 2005 ; Martinez and Gordon, 2014 ; Stout et al., 2005 ; Stout and Suttles, 2004, Mills et al. 2000).

De même, la polarisation des macrophages fait référence à un état d'activation d'un macrophage à un moment donné, mais en raison de la plasticité des macrophages et de leur versatilité, leur état de polarisation n'est pas figé et peut varier en fonction des signaux externes et du microenvironnement local qui les entourent (Kawane, 2001). Il a d'ailleurs été démontré que les macrophages de type M2 peuvent passer à un phénotype M1 ou vice versa (Porcheray et al, 2005). Les macrophages peuvent ainsi être, dans un premier temps, inflammatoires avant de participer à la résolution de l'inflammation (Chazaud et al. 2007).

3) Les acteurs du système immunitaire inné et adaptatif

Le système immunitaire se subdivise en deux grands systèmes : le système immunitaire inné et adaptatif.

i) Le système immunitaire inné

Le système immunitaire inné constitue la toute première ligne de défense de l'hôte. Elle assure chez tous les individus sains une barrière de protection indispensable contre les signaux de danger externes ou internes tels que les agents pathogènes (bactéries, virus, levures…) ou les cellules endommagées. Le système immunitaire inné permet de prévenir l'infection en initiant une réponse inflammatoire protectrice immédiate tout en garantissant le maintien de l'homéostasie tissulaire (Riora Romo, 2016).

Parmi les composants du système immunitaire inné, on retrouve les barrières physiques externes (telles que la peau) ainsi que des mécanismes cellulaires (tels que la phagocytose) et humoraux médiées par de nombreuses macromolécules (système du complément, cytokines, lysozyme…).

Les acteurs clés du système immunitaire inné

Les épithéliums constituent **la première stratégie de protection** contre les pathogènes. Ils constituent une triple barrière : physique, chimique et biologique afin de bloquer l'entrée et la propagation des pathogènes dans les tissus. Grâce à son architecture composée de couches épithéliales stratifiées à jonctions serrées et de protéines structurales qui fournissent une protection mécanique, la peau empêche la perte d'eau et l'infiltration des agents pathogènes.

En cas de passage à travers celle-ci, **une seconde ligne de défense** constituée de cellules et de facteurs solubles sont recrutés afin de contribuer à leur élimination. Parmi les facteurs solubles, on retrouve des cytokines pro-inflammatoires, les facteurs du complément, lysozyme ainsi que les peptides antimicrobiens (AMPs). Parmi les acteurs cellulaires on retrouve les cellules issues de la lignée myéloïde comme les macrophages que nous venons de détailler, les polynucléaires neutrophiles (PNN) ainsi que les polynucléaires basophiles, éosinophiles, les mastocytes, les cellules dendritiques et des cellules issues de la lignée lymphoïde comme les cellules « Natural killer » (NK) (figure 8).

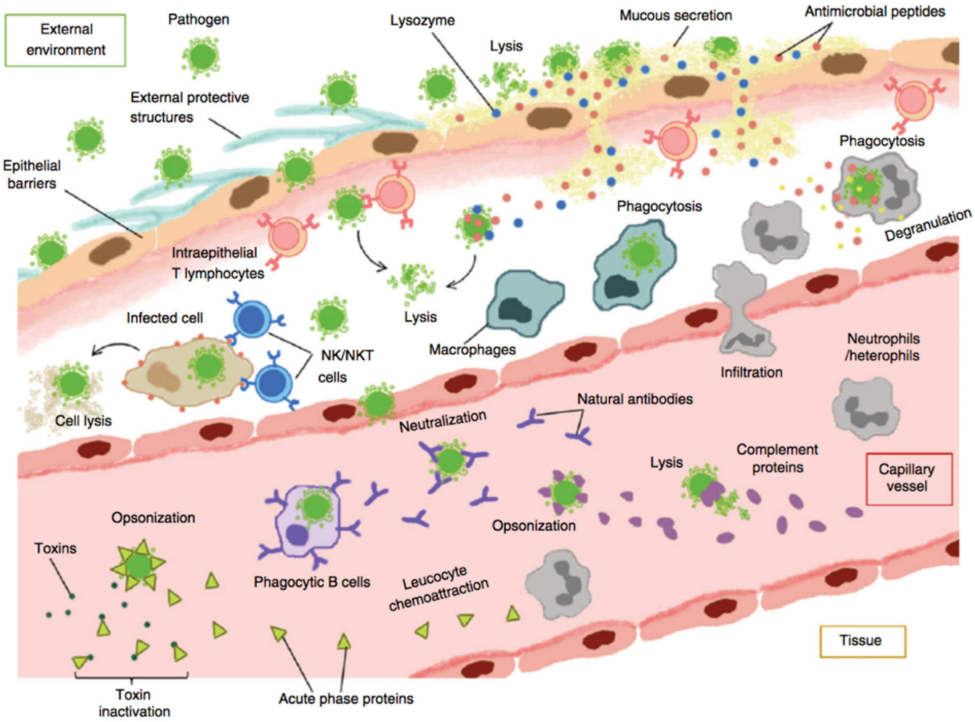


Figure 8 : Les acteurs de l'immunité innée (Riera Romo 2016)

Même si nous ne reviendrons pas en détail sur toutes ces populations cellulaire, il convient d'introduire brièvement les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques, tout comme les macrophages jouent un rôle majeur à la fois dans le système immunitaire inné et adaptatif. En effet, ces cellules reconnaissent et capturent les antigènes de pathogènes extérieurs et les présentent aux lymphocytes T naïfs via le complexe majeur d'histocompatibilité à la surface de leur membrane plasmique. A ce titre elles sont définies en tant que cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Morphologiquement, les cellules dendritiques sont caractérisées par une forme stellaire et la présences de dendrites (Guilliams et al. 2014)

Si l'on a longtemps opposé immunité innée et adaptative en qualifiant la première de non spécifique, la vision a évolué avec la découverte des récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) capables de reconnaitre spécifiquement de nombreux motifs moléculaires appelés signaux pathogéniques (PAMPs. : Pathogen associated Molecular pattern) et signaux de

danger (DAMPs : Danger Associated molecular pattern). On parle désormais de réponse « semi-spécifique » (Akira et al. 2001; Janeway and Medzhitov 2002).

Les récepteurs spécialisés de l'immunité innée

La reconnaissance des agents pathogènes microbiens et des cellules endommagées par le système immunitaire inné sont médiées par des récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition receptor). Comme mentionné précédemment, les PRR reconnaissent un signal pathogénique (PAMP) ou un signal de danger (DAMP) spécifique. Ces motifs respectifs sont reconnus par les cellules du système immunitaire résidant au sein des tissus (macrophages, cellules dendritiques…) qui expriment ses récepteurs de types PRR. Ces derniers peuvent être localisés à la membrane plasmique, mais aussi au sein d'endosomes ou dans le cytosol.

Chez les mammifères, les PRR peuvent être classés en au moins quatre groupes principaux : les récepteurs de type Toll (**TLR**), les récepteurs de type gène inductible à l'acide rétinoïque I (RIG-I) (**RLR**), Les récepteurs de lectine de type C (**CLR**), les récepteurs **NLR** (Nucleotid-binding Oligomerization Domain proteins Like-Receptor) (figure 9).

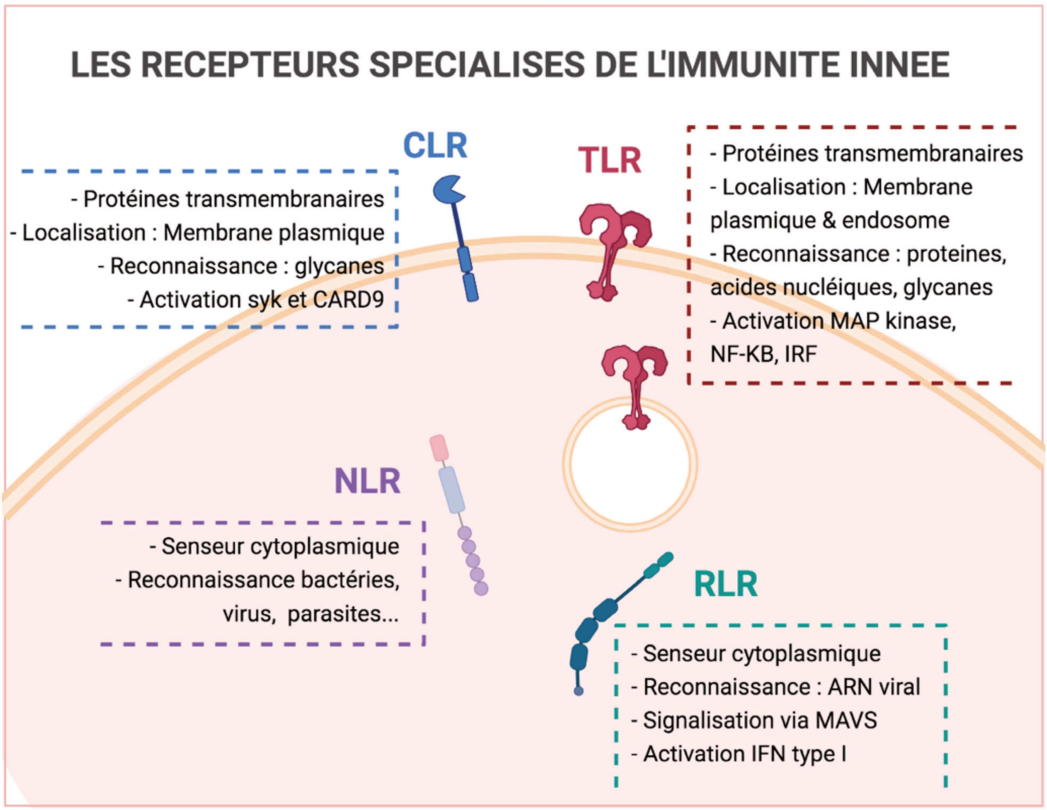


Figure 9 : Les principaux récepteurs spécialisés de l'immunité innée

Les récepteurs PRR récepteurs reconnaissent les motifs moléculaires **PAMPS** associés aux **agents pathogènes** tels que les acides nucléiques bactériens, le LPS, la flagelline ou l'ARN viral (Beutler, 2009, Iwasaki et Medzhitov, 2015). Ils peuvent également reconnaître les **signaux de danger DAMPs** issus de protéines ou d'autres molécules libérées par des cellules stressées,

endommagées ou cancéreuses. Une fois qu'un récepteur PRR reconnait un PAMP ou DAMP, de nombreuses molécules de signalisation sont activées déclenchant une cascade signalétique aboutissant à une réponse inflammatoire innée via la production de cytokines pro-inflammatoires, d'interféron de type I ou via l'activation du complexe multiprotéique de l'inflammasome. Ce dernier aboutit à l'activation spécifique d'une caspase inflammatoire, la caspase-1, qui déclenche la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine IL-1β et l'IL-18 (Kopitar-Jerala et al. 2017).

Enfin, l'immunité innée possède également un rôle critique dans l'activation et la régulation de l'immunité adaptative via la présentation antigénique grâce au complexe majeur d'histocompatibilité présent notamment à la surface des macrophages et des cellules dendritiques (M Riera Romo et al, 2016 ; Abbas AK, 2012.)

ii) Le système immunitaire adaptatif

La réponse immunitaire adaptative apparait plus tardivement et constitue **la troisième ligne de défense** contre les agents infectieux et pathogènes. Elle est le support de la mémoire immunologique et repose sur deux grands types cellulaire issus de la lignée lymphoïde : les lymphocytes B et T responsables respectivement de la réponse humorale et cellulaire.

Les lymphocytes B sont des cellules clés de la réponse immunitaire adaptative humorale. Le rôle principal des cellules B est double : produire des Immunoglobulines (Ig) de haute affinité contre un antigène étranger et présenter un antigène afin d'activer les lymphocytes T. Les lymphocytes T sont des cellules clés de l'immunité adaptative cellulaire. De manière générale on distingue principalement deux grands types de lymphocytes T : les lymphocytes T-CD4 (T helper ou auxiliaire) et les lymphocytes T-CD8 (cytotoxiques). Ces cellules sont ainsi capables de reconnaitre de manière directe et indirecte grâce à la coopération de cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, macrophages…) les cellules infectées et/ou tumorales qui seront ensuite éliminées.

4) Les différentes voies de reconnaissance des acides nucléiques cytosoliques

Parmi les PAMP précédemment cités, les acides nucléiques dérivés d'agents pathogènes peuvent être détectés par une vaste gamme de PRR tels que les TLR, les RLR ainsi que les senseurs d'ADN cytosoliques. L'ADN bactérien par exemple enrichi en îlots CpG non méthylés est détecté par le récepteur membranaire TLR9 (Toll-like receptor 9) au sein d'endosome. Les ARN viraux double brins cytosoliques peuvent quant à eux être reconnus par les hélicases de type RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1 protein), MDA5 (melanoma differentiation-

associated protein 5) (Bruns et al. 2015). La détection de ces motifs moléculaires provoque des réponses antivirales et inflammatoires médiées par les interférons de type I et/ou les cytokines pro-inflammatoires.

Chez les eucaryotes, l'ADN est normalement confiné dans le noyau de la cellule ou dans la mitochondrie. Cependant, il arrive que des acides nucléiques des cellules hôtes provenant d'un stress de réplication (Coquel et al, 2018), de dommages mitochondriaux (Rongvaux, 2014), ou lié à l'activation de rétro-élément endogènes (Bregnard et al, 2016) soient retrouvés dans le cytosol. Ces acides nucléiques cytosoliques considérés comme des DAMPs ont été identifiés comme des substrats des récepteurs PRR. En effet, leur présence dans le cytosol est considérée comme anormale et est détectés par des senseurs de l'ADN. Leur détection contribue à l'auto-immunité et à l'auto-inflammation (Kawasaki, 2011).

Avec la découverte de cGAS (Sun et al 2013) de nombreux autres senseurs impliqués dans la réponse interféron ont été décrits (figure 10) comme IFI16 (Unterholzner et al 2010), DAI (Takaoka et al, 2007), DDX41, AIM2 (Hornung et al 2009, Fernandes-Alnemri et al, 2009), Ku70 (Zhang et al. 2011), DNA-PK (Karpova et al. 2002, Ferguson et al. 2012) ou Mre11 (Kondo et al. 2013). Nous nous concentrerons dans la suite de la thèse sur la voie cGAS-STING.

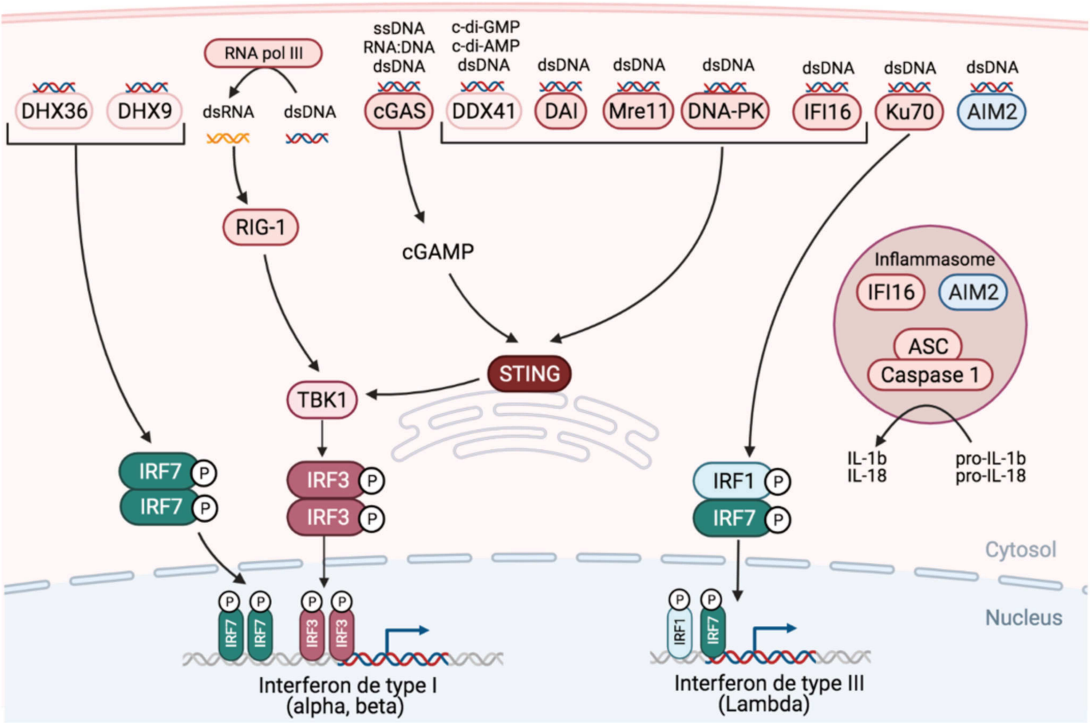


Figure 10 : Les différentes voies de reconnaissance des acides nucléiques cytosoliques (adapté d'après Pandey et al. 2014)

B) L'axe de signalisation cGAS-STING

1) Description générale de la voie cGAS-STING

La production d'interférons de type I, en présence d'acide nucléiques cytosoliques a été initialement décrite comme reposant principalement sur la voie de signalisation cGAS-STING chez les vertébrés. Il s'agit d'un axe de signalisation largement conservé entre les espèces. En effet, il est récemment devenu clair que les composants essentiels de la voie cGAS-STING ont évolué il y a plus de 600 millions d'années, avant même l'évolution des IFN de type I (Wu et al. 2014 ; Margolis et al. 2017).

cGAS

Chez l'homme, la GMP-AMP cyclique synthase (cGAS), également connu sous le nom de C6orf150 ou MAB21D1) est une protéine de 522 acides aminés (Yu et al. 2021). Le gène codant pour la protéine est situé sur le chromosome 6q13. Au niveau structural, la protéine cGAS est composée d'une extrémité N-terminale non structurée et peu conservée (résidus d'acides aminés 1 à 160) et d'une extrémité C-terminale hautement conservée (161 à 522). Le domaine C-terminal de cGAS contient deux motifs fortement conservés, un domaine central nucléotidyltransférase (NTase) indispensable pour l'activité de l'enzyme (Sun et al. 2013) et un domaine Mab21 vital pour la liaison à l'ADN, l'activité enzymatique et l'activation de la signalisation immunitaire innée en aval. Concernant sa localisation, la distribution subcellulaire de cGAS varie selon les types cellulaires et peut être retrouvé dans le cytosol, dans le noyau ainsi qu'à la membrane plasmique, (Sun et al. 2013, Barnett et al. 2019, Jiang et al. 2019, Gentili et al 2019, Okude 2021). Récemment, il a été montré que la stimulation de cGAS avec des acides nucléiques est capable d'induire sa translocation vers le cytosol via l'exportine CRM1(Sun et al, 2021).

STING

Le Stimulateur des gènes de l'interféron (STING) également connu sous le nom de MITA, ERIS, MPYS ou TMEM173) a été découvert par quatre groupes indépendents en 2008 qui avaient pour objectif de caractériser les mécanismes de reconnaissance de l'ADN aboutissant à la production de l'interféron de type I (IFN) (Pépin et. Gantier 2017). STING est une protéine membranaire de 379 acides aminés, localisée au sein du réticulum endoplasmique qui contient quatre hélices transmembranaires N-terminales et un domaine cytosplasmique C-terminal de liaison au ligand. Le domaine cytoplasmique de STING forme un dimère qui subit un changement de conformation lors de la liaison à cGAMP (Shang et al. 2019)

Les différentes sources d'ADN

Concernant les sources d'ADN capable d'activer la voie cGAS-STING, il a été démontré que cGAS était capable de détecter différents types d'acides nucléiques tels que les ADN double brins, simple brins ainsi que les hybrides ADN:ARN (Sun et al 2013, Kranzusch et al. 2013, Guerra 2020). Mécaniquement, cGAS reconnaît les doubles brins d'ADN cytosolique d'une manière dépendante de leur longueur mais indépendante de leur séquence. En effet seuls les doubles brins d'ADN longs (>20pb) sont capables d'induire l'activation de cGAS (Andreeva L et al. 2017 ; Li et al. 2013). cGAS peut également se lier aux simples brins d'ADN et aux doubles brins d'ARN bien que ces dernier ne parviennent pas à réorganiser la poche catalytique du cGAS nécessaire à son activation (Yu et al. 2021). De même, il a été montré que la liaison de l'ADN au cGAS induisait une séparation de phase et la formation de gouttelettes liquides dans lesquelles le cGAS était activé (Du et al. 2018).

cGAS reconnait des ADN cytosoliques viraux tel que HSV-1 (Sun et al., 2013), HIV (Gao et al., 2013a; Lahaye et al., 2013), HBV (Dansako et al., 2016) mais aussi bactériens comme *mycobacterium tuberculosis* (Collins et al., 2015; Wassermann et al., 2015; Watson et al., 2015). De plus, cGAS reconnaît les micronoyaux rompus jouant ainsi un rôle clé dans la surveillance des cellules cancéreuses potentielles (Dou et al., 2017; Harding et al., 2017; Mackenzie et al., 2017). La voie cGAS-STING joue donc un rôle important à la fois dans le développement des réponses immunitaires innées aux infections virales et bactériennes ainsi que dans la régulation de l'immunogénicité des tumeurs (Hartlova et al., 2015; Lam et al., 2014; Marcus et al., 2018; Ohkuri. et al., 2014; Woo et al., 2014; Xia et al., 2016).

L'activation de la voie de signalisation cGAS-STING

Après sa liaison avec l'ADN, le senseur cGAS subit un changement de conformation qui catalyse la production du second messager 2'3'di-GMP-AMP cyclique (2'3'-cGAMP) à partir d'ATP et de GTP (Sun et al., 2013 ; Wu et al., 2013). Le cGAMP se lie ensuite à la protéine adaptatrice STING (stimulator of interferon genes) inséré dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (Barber, 2011 ; Ishikawa and Barber, 2008; Ishikawa et al., 2009; Sun et al., 2009). La liaison de 2',3'-cGAMP induit un changement de conformation spatiale de STING d'une forme en V à une poche en forme de U et favorise l'oligomérisation de STING. En l'absence de cGAMP, STING est retenu sur la membrane du réticulum endoplasmique par son association avec la molécule STIM1. La liaison de cGAMP à STING réduit l'association entre STIM1 et STING et favorise sa translocation vers l'appareil de Golgi. Une fois dans l'appareil de Golgi, STING subit des modifications post-traductionnelles telles que la palmitoylation qui est primordiale pour l'activation de la réponse interféron de type I (Mukai et al. 2016). Cette cascade d'évènements induit ensuite le recrutement de TBK1 (TRAF family member associated NFkB activator binding kinase 1) et du complexe IKK (IKKa, IKKβ et NEMO). TBK1 va ensuite phosphoryler STING, ce qui induit le recrutement du facteur de transcription IRF3 (interferon

regulatory factor 3) (Gao et al., 2013b; Kato et al., 2017; Wu et al., 2013). La phosphorylation d'IRF3 par TBK1 permet la dimérisation et la translocation subséquente d'IRF3 vers le noyau pour induire l'expression génique et la production d'interféron de type I (Kato et al., 2017 ; Tanaka and Chen, 2012). Le recrutement et l'activation du complexe IKK va quant à lui induire la translocation de NF-KB vers le noyau qui conduit à son tour à la transcription d'un panel de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6 ou le TNFa (figure 11) (Okude et al. 2021).

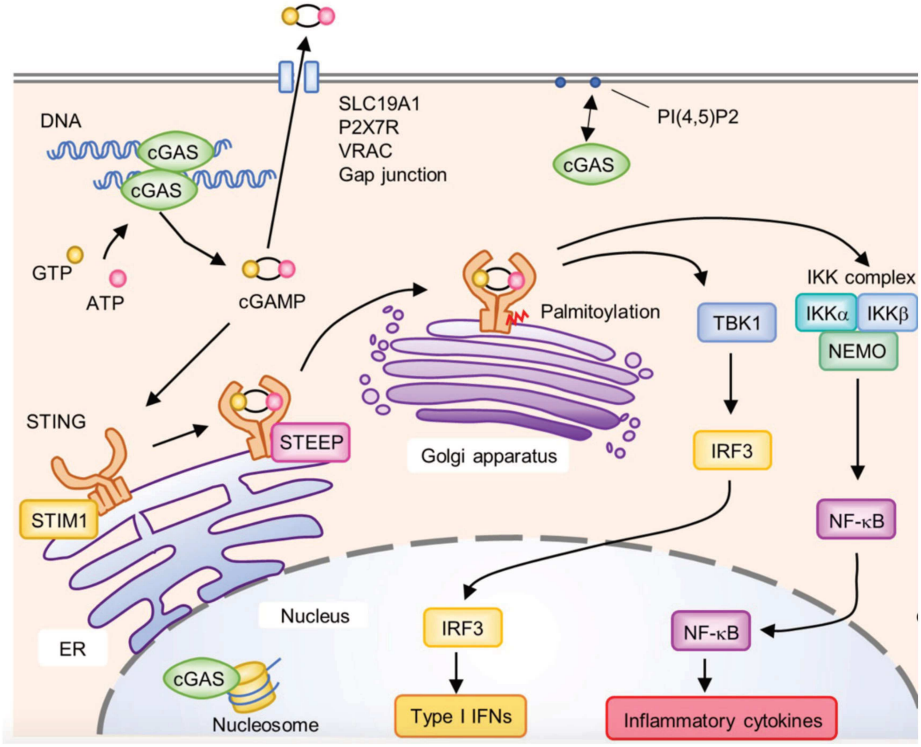


Figure 11 : La voie de signalisation cGAS-STING (2021 Okude, Ori and Kawai)

De la production d'interféron de type I aux ISGs

La principale signature de l'activation de la voie cGAS-STING passe par la production d'interféron de type I. Une fois sécrétés, l'IFN-a et l'IFNβ se lient à un récepteur transmembranaire hétérodimérique appelé récepteur des interférons de type I (IFNAR) composé de deux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 (figure 12) (Zanin et al. 2021). Dans la voie canonique de signalisation induite par l'IFN de type I, il a été démontré que l'engagement de l'IFNAR activait les protéines tyrosine kinases, Janus kinase 1 (JAK1) et tyrosine kinase 2 (TYK2) (Levy DE, 2002 ; Stark et al. 2012). Une fois activée, ces protéines kinase phosphorylent les facteurs de transcription cytoplasmiques STAT1 et STAT2 (signal transducer and activator of transcription) qui vont ensuite se dimériser et migrer vers le noyau, où ils s'assemblent avec le facteur 9 de régulation de l'IFN (IRF9) pour former un complexe appelé ISGF3 (IFN stimulated gene factor 3). L'ISGF3 se lie à des séquences d'éléments de réponse stimulés par l'IFN (ISRE) capable d'activer la transcription de plusieurs centaines de gènes stimulés par l'interféron

(ISGs) (Ivashkiv, 2014). Ces ISG comprennent notamment des facteurs antiviraux, mais également des chimiokines favorisant le recrutement de cellules immunitaires, afin d'orchestrer des réponses antivirales ou anti-tumorales (Schneider et al. 2014).

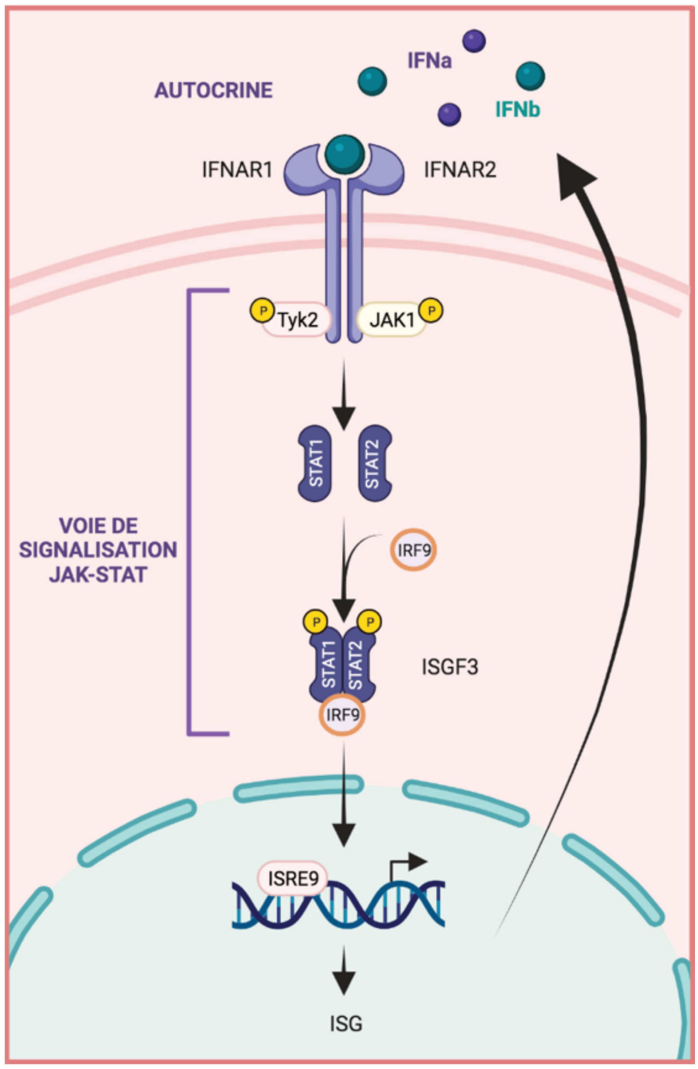


Figure 12 : Le récepteur IFNAR et la voie JAK1/STAT

Régulation de l'axe de signalisation cGAS-STING

L'axe de signalisation cGAS-STING est récemment apparu comme beaucoup plus complexe qu'initialement décrit. En effet, de multiples modifications post-traductionnelles peuvent moduler cGAS et STING (Hopfner et al. 2020 ; Abe et al, 2019, Saeed et al 2020) affectant respectivement leur stabilité ainsi que leur activation.

Parmi les modulateurs positifs de l'axe on retrouve par exemple la palmitoylation de STING décrite comme étant importante pour son activation (Mukai et al, 2016). De même, la SUMOylation peut également moduler la signalisation cGAS-STING en stabilisant ces protéines, soutenant ainsi la réponse immunitaire (Hu et al 2016). STING est également régulé par l'ubiquitination. Plusieurs ligases ubiquitine régulent positivement l'activité de STING, conduisant à la production d'interféron (Zhang et al 2012 ; Tshuchida et al 2010; Wang et al 2014 ; Abe et al. 2014). STING peut également être directement activé par des di-nucléotides cycliques bactériens (Ergun 2015, Burdette et al. 2011).

Concernant les régulateurs négatifs de l'axe, on retrouve par exemple, la SUMOylation de cGAS sur certains résidus Lysine qui inhibe ses activités de liaison à l'ADN et d'oligomérisation (Cui et al, 2017). De plus, afin de contrôler la sur-inflammation potentielle, suite à son activation, STING est dégradé soit par le système ubiquitin-protéasome, l'endolysosome ou les processus liés à l'autophagie (Zhong et al 2009 ; Konno et al, 2013; Pokatayev et al. 2020 ; Liu et al. 2019 ; Prabakaran et al, 2018). Il a également été démontré que d'autres protéines agissent comme des régulateurs négatifs de la voie cGAS / STING, soit en retenant la STING dans le reticulum endoplasmique (RE), soit en empêchant plus directement son interaction avec TBK1 (Zhang et

al, 2014 ; ; Guo et al, 2016 ; ; Li et al 2015). Enfin, plus récemment, il a été démontré que des di-nucléotides ainsi que des métabolites étaient capables de moduler l'activation de STING (Guerra et al. 2020, Vila et al. 2020).

2) Implication de la voie CGAS-STING dans le cancer

Après avoir vu les mécanismes d'activation et de modulation de la voie cGAS-STING intéressons-nous maintenant à l'implication de celle-ci dans le cancer. De nombreuses études rapportent les fonctions anti-tumorales de la voie notamment grâce au rôle de cGAS dans l'immuno-surveillance des cellules cancéreuses. Cependant, d'autres études récentes nuancent ces propos et montrent que la voie pourrait également avoir un rôle pro-tumoral par action directe sur la tumorigénèse.

i) Rôle anti-tumoral de la voie cGAS-STING

Rôle de cGAS dans l'immuno-surveillance des cellules cancéreuses

Contrairement aux cellules saines, les cellules cancéreuses accumulent de nombreux doubles brins d'ADN dans leur cytosol. Cet ADN peut être dérivé de plusieurs sources et avoir une origine génomique, mitochondriale ou exogène. En effet, ces acides nucléiques peuvent être générés par instabilité chromosomique, ainsi qu'après traitement avec des agents génotoxiques (Ahn, 2014 ; Shen, 2015) ou indirectement via réactivation des rétro-éléments endogènes (Bregnard, 2016). Ces ADN tumoraux sont ensuite libérés via des vésicules membranaires appelées exosomes contenant des acides nucléiques et des protéines issus des cellules cancéreuses (Whiteside et al. 2016). Ces vésicules peuvent signaler de manière « autocrine » et être transférés aux cellules stromales afin de déclencher des signaux inflammatoires (Srikrishna, 2009 ; Grivennikov, 2010). Il a par ailleurs été démontré que la capture d'ADN tumoraux mitochondriaux (mtDNA) par des cellules présentatrices d'antigène (CPA), comme les cellules dendritiques (DC) pouvaient activer la voie cGAS-STING. En effet de par la fonction intrinsèque de ces cellules, une fraction de l'ADN tumoral des celllules cancéreuses peut se retrouver dans le cytoplasme des cellules dendritiques après phagocytose (Woo, 2014 ; Corrales 2016).

Rôle de cGAS-STING dans la sénescence des cellules cancéreuses

La voie cGAS-STING a également été fortement liée à l'induction de la sénescence des cellules cancéreuses (Dou et al. 2017) médiant ainsi les effets oncosuppresseurs. La capacité de la signalisation cGAS-STING à favoriser la sénescence dépend de la sécrétion des chimiokines, des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance et des protéases, qui sont des composants du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) (Dou et al. 2017 ; Yang

et al. 2017). Ces facteurs immunostimulants peuvent soit contribuer au contrôle tumoral de manière autonome par les cellules tumorales, soit éveiller des cellules immunitaires contre les tumeurs comme les lymphocytes (Dou et al. 2017 ; Gluck et al. 2017 ; Ranoa et al. 2019,).

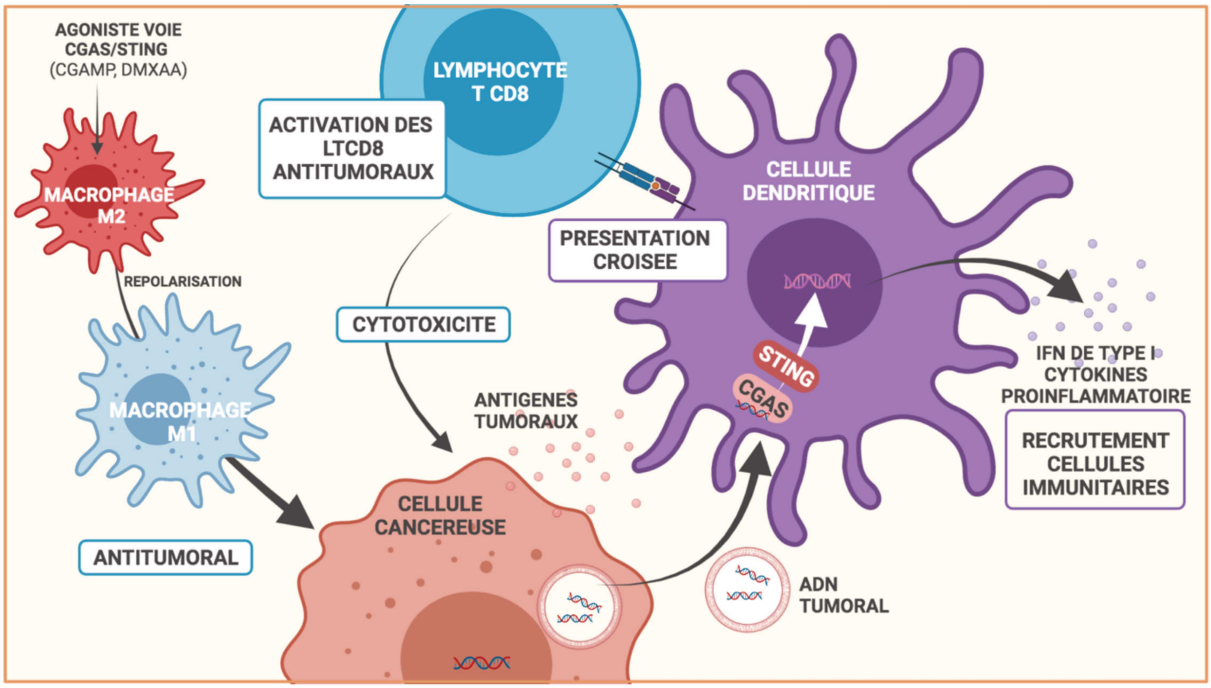


Figure 13: Rôle antitumoral de la voie cGAS-STING

D'autre part, l'activation de la voie cGAS-STING induit l'expression de molécules de co-stimulation, telles que le CD80 (ou B7.1) et CD86 nécessaires à l'activation des lymphocytes T-CD8. Il a d'ailleurs été démontré que cet effet était perdu chez des souris n'exprimant pas STING, suggérant l'implication de STING dans l'immunité anti-tumorale (Deng et al. 2014 ; Wang et al 2017 ; Chanut et al. 2019). Ensemble, ces deux processus complémentaires favorisent **la clairance des cellules cancéreuses** et soulignent le rôle prépondérant de CGAS et de STING dans l'immunité anti-tumorale (figure 13).

Dans cette optique, l'activation de la voie de signalisation via l'utilisation d'**agonistes** est apparue très vite comme une stratégie prometteuse dans la lutte anti-cancéreuse. Sur des modèles murins, il a notamment été démontré que le traitement par **cGAMP** ou un ligand synthétique de STING, **stimulait l'immunité anti-tumorale et réduisait la croissance de la tumeur** (Deng, 2014 ; Wang et al. 2017 ; Li et al. 2016) en induisant une **immunité adaptative mémoire** (Corrales et al. 2015). Dans l'une de ces études, les souris de type sauvage (Wild Type), exprimant cGAS, ont présenté une croissance plus lente des mélanomes (B16) en réponse à un traitement par anticorps anti-PD-L1 (Programmed Death Ligand 1). L'administration intramusculaire de cGAMP a inhibé la croissance du mélanome et prolongé la survie des souris présentant des tumeurs. De plus, la **combinaison de cGAMP et d'anticorps PD-L1** a potentialisé

les effets anti-tumoraux des deux traitements utilisés en monothérapie. Le traitement par cGAMP a **activé les cellules dendritiques et amélioré la présentation croisée des antigènes conduisant** au recrutement et à l'infiltration des cellules T-CD8 au site tumoral (Padovan et al. 2002 ; Ohkuri et al. 2017). De même l'utilisation d'agonistes de la voie comme le DMXAA ou les di-nucléotides c-di-GMP ou le cGAMP ont également démontré leur efficacité pour repolariser les macrophages associés aux tumeurs vers un phénotype pro-inflammatoire M1 anti-tumoral (Downey et al. 2014 ; Ohkuri et al. 2014, Ohkuri et al. 2017 ; Cheng 2018).

Parallèlement, des études ont montré que dans un modèle murin de mélanome, l'inactivation génétique de la voie cGAS-STING diminuait drastiquement l'efficacité de la radiothérapie et de l'immunothérapie, se traduisant par un recrutement inefficace des lymphocytes T cytotoxiques dans les tumeurs (Deng et al. 2014 ; Woo et al, 2014 ; Liu et al. 2015 ; Corrales et al. 2015 ; Demaria et al. 2015 ; Wang et al. 2017 ; Harding et al. 2017).

D'autre part, plusieurs rapports soulignent l'intérêt de l'activation de l'axe cGAS-STING dans la **promotion du rejet de la tumeur** (Corrales, 2016 ; Foote, 2017 ; Francica, 2018). Il est important de noter que la voie cGAS-STING potentialise la réponse à la radiothérapie et à la chimiothérapie et crée une synergie avec les inhibiteurs des points de contrôle (Ager, 2017 ; Harding, 2017). Ainsi, l'activation de l'axe cGAS-STING en association avec une chimiothérapie et / ou une immunothérapie apparaît comme une stratégie thérapeutique intéressante.

L'ensemble de ces études indiquent que l'activation de la voie cGAS-STING est importante pour l'immunité antitumorale (figure 13) et que des agonistes de la voie pourraient être exploités dans la thérapie contre le cancer.

ii) Rôle pro-tumoral de la voie cGAS-STING

Bien que la voie cGAS-STING présente des effets anti-tumoraux évidents, plusieurs études sont venues nuancer ces effets en démontrant que la voie cGAS-STING pouvait également avoir des effets pro-tumoraux (figure 14). En particulier dans les tumeurs hautement agressives et instables qui peuvent paradoxalement coopter la signalisation cGAS-STING afin de stimuler la carcinogenèse.

Ainsi, différents travaux ont également montré le rôle de la voie cGAS-STING **dans l'initiation de la tumorigenèse**. En 2018, Liu et al. ont montré que cGAS pouvait initier la tumorigenèse en interagissant avec PARP1 dans le noyau. Cette interaction est capable d'inhiber la recombinaison homologue dans les modèles murins et humains, bloquant ainsi une voie cruciale de réparation des dommages à l'ADN (Liu et al. 2018).

Contrairement à la stimulation aiguë de la voie, l'activation chronique de cGAS-STING provoque des effets pro-tumorigéniques. En effet, il a été montré que la voie était impliquée **dans l'initiation et le maintien de l'inflammation chronique** associée au cancer. *Ahn et al.* ont rapporté que l'exposition chronique au DMBA (7,12-diméthylbenz (a) anthracène), composé génotoxique connu pour induire des tumeurs cutanées, favorisait la croissance tumorale de manière dépendante de STING, suggérant un rôle de cette voie dans la carcinogenèse cutanée (Ahn et al. 2014).

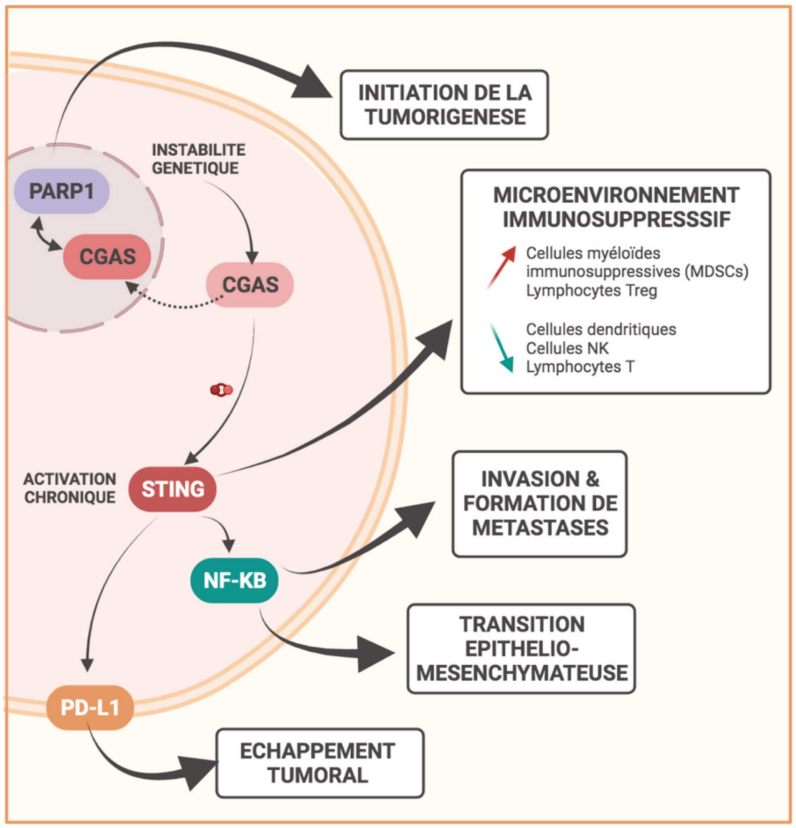


Figure 14 : Rôle pro-tumoral de la voie cGAS-STING

De plus, l'activation chronique de STING peut dans certains cas créer un **microenvironnement tumoral immunosuppressif**. Cette activation continue favorise l'infiltration des MDSCs (Myeloid derived suppressor cells), des lymphocytes T régulateurs et diminue l'infiltration des Natural Killers, des cellules dendritiques et plus largement des lymphocytes T. (An. et al. 2019). De plus, la stimulation de STING peut altérer les réponses des lymphocytes T spécifiques de la tumeur, empêchant l'établissement d'une immunité durable et la clairance efficace des cellules tumorales. En effet, en plus des effets pro-apoptotiques de STING sur les cellules T, l'activation de la voie pourrait également bloquer leur prolifération (Cerboni et al. 2017 ; Gulen et al. 2017)

D'autres études montrent que l'activation de STING pouvait favoriser **la transition épithélio-mésenchymateuse** (EMT) des cellules cancéreuses via l'activation de NF-KB (Zeng et al. 2020). STING peut également favoriser **l'échappement tumoral** par régulation positive de PD-L1 et induction de l'autophagie (Fu et al. 2015 ; Kwon et Bakhoum 2020).

D'autres études suggèrent que l'activation de STING est impliquée dans la progression tumorale en contribuant à la **formation de métastases**. L'instabilité chromosomique et notamment la formation de micronoyaux et l'accumulation d'acides nucléiques cytosoliques engage la voie cGAS-STING activant d'un même coup la voie non canonique de NF-KB

impliquée dans l'invasion et la formation de métastases cérébrales, mammaires et ganglionnaires (Bakhoum et al. 2018). Des effets paracrines néfastes de cGAS ont également été rapportés. Par le biais des jonctions communicantes, les cellules cancéreuses mammaires ou pulmonaires peuvent libérer le cGAMP qu'elles produisent aux astrocytes où il activera directement STING qui induira la production des cytokines inflammatoires, telles que l'IFN-a et le facteur de nécrose tumorale TNFa. Ces signaux paracrines activeront ensuite les voies STAT1 et NF-κB dans les cellules cancéreuses métastatiques cérébrales, favorisant ainsi la croissance tumorale. Cette activation directe via le second messager soutient ainsi la sécrétion de facteurs de survie pour les cellules métastatiques et l'établissement rapide de métastases (Chen et al. 2016, Lemos et aal. 2016) ainsi que la chimiorésistance (Liang et al. 2017 ; Sharma et al. 2017).

L'ensemble de ces études ont révélé les effets **dichotomiques** de la voie cGAS-STING en oncologie. Ses fonctions anti-tumorales et pro-tumorales restent à l'heure actuelle largement débattues et demeurent un important sujet d'étude.

3) Agonistes de la voie cGAS-STING et expression de cGAS et de STING dans différents types de cancers

Agonistes de la voie cGAS-STING

Comme mentionné précédemment, le ciblage de la voie de signalisation cGAS-STING par le biais d'agonistes est rapidement devenue une approche prometteuse en oncologie. Dans cette optique de nombreux agonistes de la voie ont été développés et sont actuellement en cours d'études précliniques et cliniques (Figure 15) (Amouzegar et al. 2021).

Un des premiers agonistes de STING à avoir été évalué est le DMXAA (également nommé ASA404). Bien que des études précliniques sur le modèle murin ont montré une puissante réponse immunitaire anti-tumorale (Corrales et al. 2015, Kanwar et al. 2001) les essais cliniques chez l'homme en phase III, n'ont pas atteint l'efficacité escompté. En effet, aucune différence n'a été observée sur la survie globale et la survie sans progression entre les groupes traités par DMXAA et le groupe placebo. Des études ultérieures ont montré plus tard que, bien que le DMXAA soit un ligand direct du STING murin celui-ci échoue à se lier au STING humain (Lara PN et al. 2011). Les efforts ultérieurs ont été orienté vers le développement d'agonistes synthétiques avec une stabilité améliorée et une sensibilité plus faible à la dégradation enzymatique.

Parmi les agonistes de STING développés on retrouve entre autres des di-nucléotides cycliques (CDN), des vecteurs bactériens, des inhibiteurs de l'ENPP1 (responsable de la dégradation de cGAMP), des nano-vaccins, des anticorps conjugués et d'autres molécules (figure 15). Actuellement, de nombreux essais cliniques sont en cours pour évaluer l'effet des agonistes seuls ou en combinaison avec d'autres traitements (Amouzegar et al. 2021, Pu et al. 2021). Malgré cela, il reste des barrières importantes pour le ciblage clinique de la voie cGAS-STING. La première barrière concerne la voie d'administration. En effet, les agonistes CDN de STING de première génération à entrer dans les tests cliniques ont été administrés par voie intra-tumorale. Cela présente des défis car l'approche limite l'utilisation des agonistes STING aux seules tumeurs accessibles (Amouzegar et al. 2021).

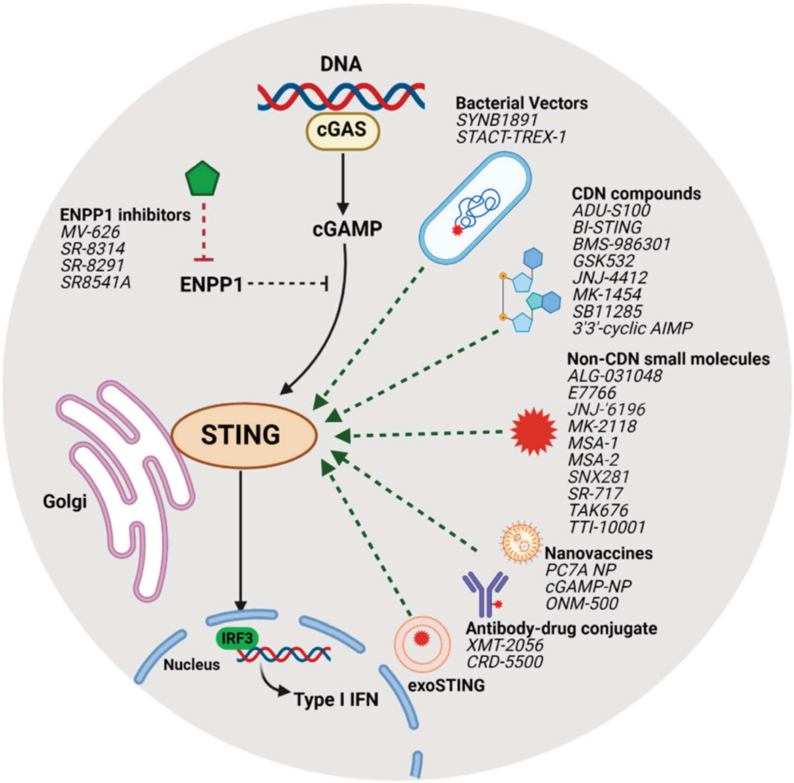


Figure 15 : Agonistes de la voie cGAS-STING (Amouzegar et al. 2021)

De nombreux efforts sont en cours d'investigation pour développer des composés plus stables par voie systémique. Une préoccupation soulevée concerne également l'administration systémique d'agonistes de STING puisqu'on ignore si ces composés induisent un état inflammatoire pathologique, lié à la sur-activation de STING. De plus, l'effet de l'activation de STING sur d'autres cellules immunitaires telles que les cellules T effectrices pourrait être un autre sujet de préoccupation. En effet, des études *in vitro* montrent que l'activation de STING a été associée au stress cellulaire et à l'apoptose dans les cellules T (Larkin et al. 2017). La question est de savoir si cela atténuerait les réponses médiées par les cellules T dans le cadre clinique. Dans ce contexte, l'étude de l'effet de ces agonistes de STING sur le microenvironnement tumoral demeure une question importante à considérer et peu explorée. Enfin, des études ont suggéré que l'activation de la voie cGAS-STING, pourrait potentiellement conduire à une résistance au traitement. Une augmentation rapide de l'expression de la protéiinne Programmed death ligand 1 (PD-L1) dans le microenvironnement tumoral a été observée après injection intra-tumorale d'un agoniste de STING (Lemos et al. 2020). De plus, on ignore encore si l'activation de la voie cGAS-STING pourrait provoquer des boucles de

rétroaction négatives qui atténueraient l'effet des agonistes STING et donc à terme rendre le traitement inefficace.

Expression de cGAS-STING dans différents types de cancers

Avant d'envisager l'utilisation de ces molécules, il est primordial de connaître le niveau expression de cGAS et de STING au sein de la tumeur et de son microenvironnement. En effet, il arrive que les cellules tumorales échappent à cette voie de signalisation et que le niveau d'expression basale de cGAS et/ou de STING soit diminué.

Il a par exemple été montré chez l'homme que dans des adénocarcinomes du côlon, et mélanomes, l'expression de cGAS ou de STING était fortement diminuée par hyperméthylation de leurs promoteurs (Konno et al. 2018). De plus, de nombreuses lignées cancéreuses ont perdu l'expression de cGAS, de STING ou des deux (Bhatelia et al.2014 ; Chen et al. 2017 ; Sun et al.2013 ; Wu et al.2013 ; Xia et al. 2016a, b). Plus récemment, Schadt et al. en 2019 ont observé que chez tous les patients les tissus sains adjacents à la tumeur exprimaient cGAS dans les cellules épithéliales et stromales, alors que l'expression de cGAS était rare dans les cellules de carcinome. Cela suggère que la perte de cGAS est un mécanisme d'échappement immunitaire et va dans le sens de l'observation selon laquelle la perte d'expression de cGAS est corrélée à la progression du cancer (Xia et al., 2016 ; Yang et al., 2017). De même, les tumeurs fortement hypoxiques répriment cGAS par l'induction de microARN régulateurs (Wu et al. 2017). Pour les cancers viro-induits, la protéine E6 du papillomavirus humain et la protéine E1A des adénovirus inhibent cGAS, bloquant ainsi la réponse antivirale et tout en favorisant l'oncogenèse virale (Lau et al. 2015). Cette perte d'expression de cGAS et de STING rend difficile le ciblage de la voie par des agonistes.

De plus, il a été montré que la faible expression de cGAS et de STING peut être corrélée à une diminution de la survie des patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire et à un mauvais pronostic des patients atteints de cancer gastrique et de carcinome hépatocellulaire (Song et al. 2017, Yang et al. 2017). A contrario, d'autres études révèlent que des niveaux élevés de ces protéines sont corrélées à un mauvais pronostic {An, 2019, Yang et al. 2017 ; Wu et al. 2017 ; Hoong 2020). Pour le moment, il n'y a pas d'explications claires quant à la raison pour laquelle de telles divergences sont observées dans différents modèles de tumorigenèse, soulignant la compréhension limitée de ces voies au sein des cellules tumorales.

Bien que les immunothérapies ciblant le STING aient connu un énorme intérêt biomédical ces dernières années, l'étude de l'impact de l'activation du STING sur la tumorigenèse a révélé une relation extrêmement complexe avec le devenir de la tumeur. Avant toute utilisation d'agonistes en clinique, il apparait comme primordial de procéder à une évaluation approfondie de la voie et des niveaux d'expression de cGAS et de STING dans les tissus cibles et le microenvironnement.

De plus bien que l'activation aiguë de la voie cGAS-STING induise principalement des réponses immunitaires anti-tumorales, les fonctions pro-tumorales de la voie doivent être prises en compte lors de la conception de protocoles thérapeutiques visant à activer la voie cGAS-STING. L'évaluation du stade du cancer, de la dose, de la fréquence et de la durée sont nécessaires pour optimiser l'effet anti-tumoral des voies cGAS-STING tout en minimisant l'inflammation chronique et l'immunosuppression.

Chapitre 2 : Le glioblastome & son microenvironnement

A) Présentation générale du glioblastome

1) Épidémiologie

Les tumeurs cérébrales primitives appartiennent à un groupe hétérogène de tumeurs bénignes et malignes provenant de différentes populations cellulaires du système nerveux central (SNC). Le type malin le plus fréquent est le gliome, qui représente à lui seul près de 75% des tumeurs cérébrales primitives malignes de l'adulte (Ostrom et al. 2017). Parmi celles-ci, plus de la moitié de ces tumeurs sont des glioblastomes (GBM), la forme de gliome la plus fréquente et la plus agressive (Gusyatiner et Hegi, 2018). L'incidence annuelle du glioblastome varie de 0,59 à 3,69 pour 100 000 personnes selon les pays (Thakkar et al. 2014 ; Dobes et al. 2011 ; 2010, Tamimi et al. 2017). Celle-ci varie également en fonction de l'âge, du sexe et de l'origine ethnique.

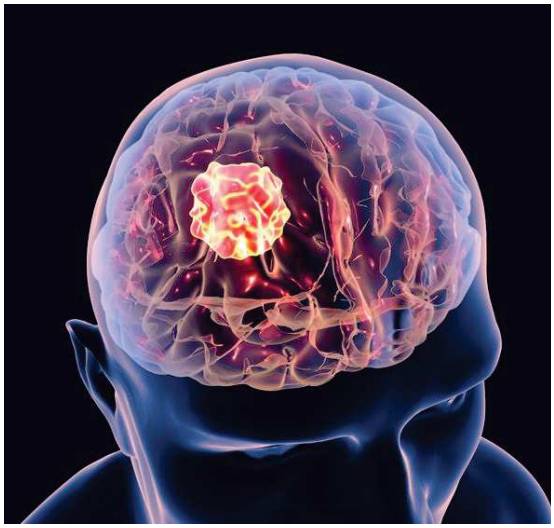


Figure 16 : Illustration du glioblastome

Age, genre & origine ethnique

Le glioblastome touche principalement des personnes âgées. En effet, le diagnostic survient à un âge médian de 65 ans (Ostrom et al. 2020 ; Chakrabarti et al. 2005). L'incidence augmente avec l'âge avec un pic maximal entre 75 et 84 ans (Lapointe et al. 2018). Le glioblastome touche préférentiellement les hommes avec une incidence 1,6 fois plus élevée chez les individus de sexe masculin (Ostrom et al. 2020). Concernant l'origine ethnique, les individus de type caucasien sont les plus touchés en comparaison aux personnes d'origine africaine ou afro-américaine (Tamimi et Juweid 2017).

Localisation

Le glioblastome est plus fréquemment localisé au niveau de la région supratentorielle (frontale, temporale, pariétale et occipitale) avec une incidence maximale au niveau du lobe frontal. Cependant la localisation du glioblastome peut varier en fonction de l'âge des patients et de l'origine ethnique. Il a par exemple été démontré que chez les patients relativement jeunes (50-56 ans), la localisation la plus fréquente se trouvait au niveau du cervelet (Babu et. Al. 2013).

Facteurs de risque

Il existe peu de facteurs de risque validés pour le développement du glioblastome. Le facteur de risque le plus établi est l'exposition aux rayonnements ionisants (Ostrom et al. 2018). Cependant, ce facteur de risque n'est corrélé qu'à une faible part de tous les cas de gliome. Un risque accru de développer des gliomes est également associé à différentes altérations génétiques, parmi lesquelles on trouve les mutations IDH, du promoteur TERT, TP53 et EGFR. Des études d'association ont d'ailleurs identifié des polymorphismes mono-nucléotidiques (SNP) comme facteur de risque de développement de gliomes (Shete et al. 2009). Parmi eux, on peut retrouver des SNP dans le gène TP53 (tumor protein p53), dans le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et dans l'inhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A (CDKN2A). La prédisposition génétique familiale représente moins de 1 % de tous les gliomes (Weller et al. 2015). Enfin, une association inverse entre le glioblastome et des antécédents d'atopie, d'allergies et d'autres affections liées au système immunitaire a également été identifiée bien que les raisons biologiques sous-jacentes n'aient pour l'heure pas été élucidées (Scheurer ME et al. 2010).

Survie & mortalité

En dépit des traitements incluant la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, la survie médiane pour les patients atteints de glioblastome est de 15 mois (Stupp et al. 2005, Thakkar et al. 2014). Le pronostic pour les patients est très faible avec un taux de survie à 3 ans de 14% et à 5 ans de 5% (Gramatzki et al 2016 ; Ostrom et al 2014), Sans traitement, les patients atteints de GBM ont une espérance de vie ne dépassant pas les 4 mois (Bleeker FE, 2012).

Ces chiffres peuvent s'expliquer par la nature intrinsèque de ces tumeurs. En effet les glioblastomes malins sont hautement agressifs. De plus, l'efficacité de la résection chirurgicale de la tumeur primaire est limitée. En effet, ces tumeurs prolifèrent rapidement et migrent dans les tissus cérébraux environnants grâce à une très forte vascularisation (Furnari et al. 2007, Adamson et al 2009, Van Meir et al 2010).

2) Origine & classification

Origine

D'un point de vue histologique et génétique les glioblastomes sont très hétérogènes ce qui contribue à la complexité de la biologie de ce type de cancers. Même si les origines cellulaires des gliomes restent largement débattues, des études ont montré que les gliomes peuvent avoir pour origine une grande variété de cellules du SNC telle que les cellules gliales comprenant les astrocytes et les oligodendrocytes (Zong, Parada & Baker 2015) et les cellules souches neuronales.

Classification

Le gliome définit un groupe hétérogène de cancers du SNC qui sont morphologiquement et moléculairement différents (Crocetti et al., 2012, Ho et al., 2014). De nos jours, la combinaison de tests moléculaires et d'analyses histologiques est fondamentale dans la classification clinique des tumeurs du SNC (Louis et al., 2014, Louis et al., 2016). Ces connaissances moléculaires ont conduit à affiner et élargir la classification précédente de 2007 de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) des tumeurs du SNC (Louis et al., 2014, Louis et al., 2016). A la différence de la précédente, la nouvelle classification de 2016, ne se base plus uniquement sur des critères morphologiques, mais inclue également des paramètres moléculaires aboutissant à un « diagnostic intégré ». Son objectif est de définir des groupes tumoraux homogènes en termes de pronostic et de réponse au traitement (Reuss DE et al. 2015).

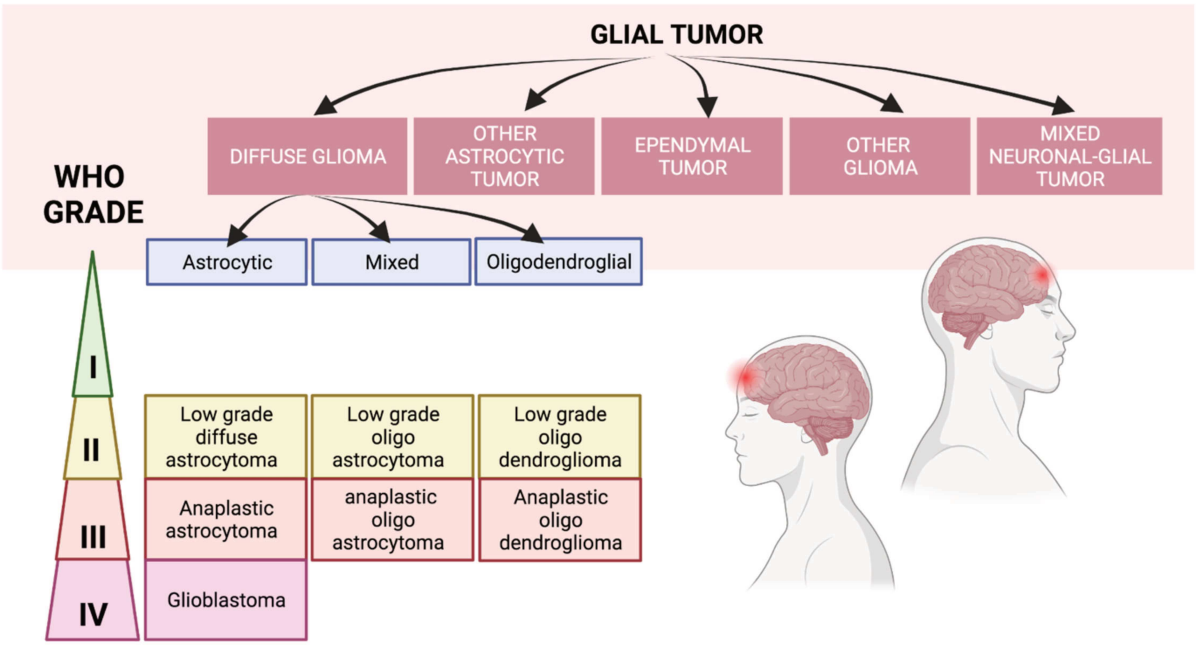


Figure 17 : Différents types de gliomes (Adapté d'après Perry et al. 2016)

Sur la base de la classification de l'OMS de 2016, les gliomes sont divisés en tumeurs diffuses astrocytaires ou oligodendrogliales (astrocytome, glioblastome, oligodendrogliome, oligoastrocytomes) et en autres tumeurs astrocytaires (astrocytome pilocytique, astrocytome pilomyxoïde, astrocytome à cellules géantes épendymaires et xanthoastrocytomes pléomorphes). Les tumeurs épendymaires et celles glioneuronales sont également reclassées.

L'OMS classe également les gliomes selon un grade de malignité allant de I à IV (figure 17). Les gliomes de grade I sont des masses circonscrites, la plupart bénignes de bon pronostic ; Les gliomes de grade II-IV sont les plus agressifs. Cependant, la classification histologique et morphologique ne suffit pas à classifier des gliomes. Le profilage moléculaire est alors réalisé afin d'explorer plusieurs types de mutations génétiques comme la mutation IDH ou du

promoteur TERT. Cette classification supplémentaire améliore la précision diagnostique et pronostique (Lapointe et al. 2018).

Finalement, chaque tumeur ainsi caractérisée devrait être classée dans l'une des catégories définies par la classification. Cette classification aura des implications importantes pour le patient au niveau thérapeutique (Back et al., 2018, Louis et al., 2016). Dans le cas où une tumeur testée ne rentre pas dans l'une des catégories bien définies, des catégories diagnostiques dites « NOS » (not otherwise specified) persistent dans la classification.
Selon la classification de 2016 de l'OMS, le glioblastome est classé dans la catégorie des gliomes de grade IV.

3) Prise en charge & résistances

i) Traitements conventionnels

La prise en charge du glioblastome repose sur une approche multimodale comprenant chirurgie, radiothérapie et traitement médicamenteux (figure 18) (Carlsson et al. 2014, Davis 2016).

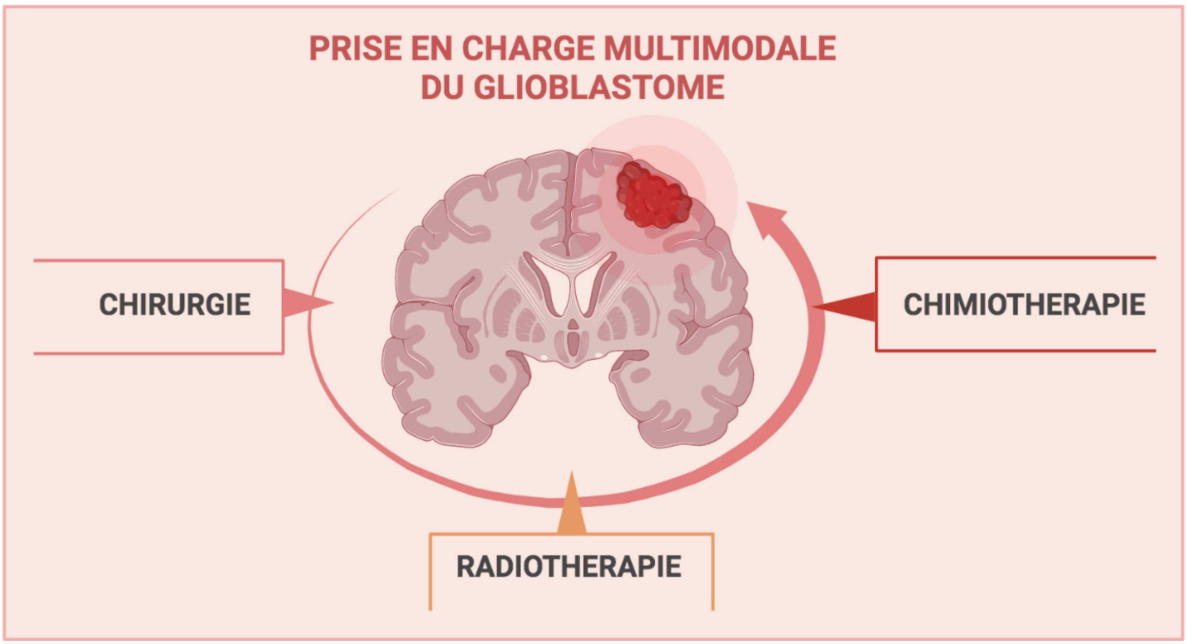


Figure 18 : Approche multimodale dans la prise en charge du glioblastome

Chirurgie

Après le diagnostic, la chirurgie est réalisée en première intention afin de permettre la résection maximale réalisable de la masse tumorale. Bien qu'il n'y ait pas d'essais cliniques randomisés pour déterminer l'étendue de la chirurgie, une résection totale brute est généralement recommandée si cela est possible. Des analyses rétrospectives ont indiqué que la résection totale brute peut améliorer la survie, même chez les patients âgés (Noorbakhsh et

al. 2014. ; Chaichana et al. 2014 ; Brown et al. 2016). Afin de faciliter la résection tout en minimisant la morbidité chirurgicale, il existe de nombreux accessoires chirurgicaux pré et peropératoires disponibles telle que l'IRM fonctionnelle ou la chirurgie peropératoire guidée par fluorescence avec le 5-ALA.

En revanche, quand la chirurgie ou la résection chirurgicale n'est pas possible, à cause d'une contre-indication médicale ou du refus du patient, d'autres options sont envisageables comme la biopsie stéréotaxique ou la biopsie ouverte. En effet, il est primordial de pouvoir réaliser un diagnostic histologique et moléculaires précis afin de déterminer quel traitement ultérieur sera le plus adapté au patient.

Radiothérapie

La radiothérapie est utilisée depuis longtemps dans le traitement du glioblastome pour améliorer à la fois le contrôle local et la survie des patients. Actuellement, la radiothérapie conventionnelle après chirurgie délivre 60 Gy en fractions de 2 Gy sur 6 semaines en association avec le témozolomide (Stupp et al. 2005). D'autres schémas thérapeutiques ont été étudiés mais aucun bénéfice clair n'a pu être établi. De nouvelles techniques pour délivrer les rayonnements ont également été étudiées mais pour l'heure aucune n'a pu démontrer une efficacité supérieure à la radiothérapie standard fractionnée.

En cas de récidive, la ré-irradiation est une option appropriée dans certaines circonstances. En règle générale, cela est réservé aux patients plus jeunes (Cabrera et al. 2016).

Chimiothérapies

La chimiothérapie standard de première intention pour le traitement du glioblastome repose sur l'utilisation du témozolomide (75 mg/m² par jour) en association avec la radiothérapie suivi de 6 cycles supplémentaires de témozolomide en monothérapie (150-200 mg/m² une fois par jour pendant 5 jours suivi de 23 jours sans traitement) (Vidal ; Stupp et al. 2005).

Témozolomide (TMZ)

Le témozolomide est un agent alkylant qui subit une hydrolyse rapide à pH physiologique en son métabolite actif le 3-méthyl-(triazen-1-yl)imidazole-4-carboxamide (MTIC) (figure 19). Le mécanisme d'action par lequel le TMZ induit la mort cellulaire est la méthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN), entrainant des cassures doubles brins (DSB) et l'apoptose des cellules cancéreuses. Cette cytotoxicité est due principalement à

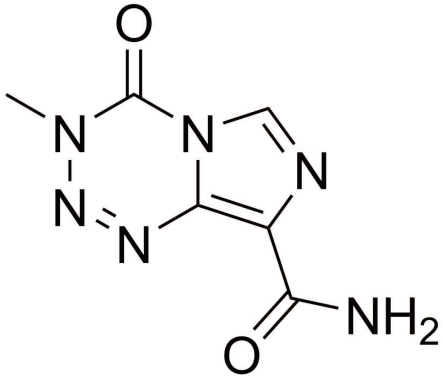


Figure 19 : Formule chimique du témozolomide

une alkylation de la guanine en position O^6, et à une alkylation supplémentaire en position N^7. Les lésions cytotoxiques engendrées entraînent une réparation aberrante de l'ADN méthylé. Les effets secondaires du témozolomide comprennent les nausées et la myélosuppression, en particulier la thrombocytopénie et la neutropénie. Une attention toute particulière sera apportée aux patients via des examens sanguins mensuels permettant de suivre ces populations sanguines.

En cas de rechute ou de récidive, les options de traitement sont moins bien définies et peu de preuves sont disponibles concernant la prolongation de la survie globale. Il n'y a pas de traitement systémique standardisé dans le cadre de la deuxième ligne. Les autres options thérapeutiques comprennent une résection chirurgicale supplémentaire, une ré-irradiation, des thérapies systémiques telles que le bevacizumab, des approches combinées ou des soins de soutien seuls.

Autres thérapies

De nombreux autres traitements ont également été testés et s'annonçaient prometteurs comme les inhibiteurs de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Malheureusement l'efficacité des premières générations (gefitinib et erlotinib) et de secondes générations (afatinib) d'inhibiteurs se sont révélés décevantes, en partie à cause de leur faible passage à travers la barrière hématoencéphalique (Liu et al. 2019).

De même, des thérapies anti-angiogéniques ont également pu être étudiées et seront détaillées dans la suite de la thèse. Cependant, ces molécules n'ont pas répondu aux attentes initiales et à ce jour, seul le bevacizumab, l'anticorps anti-VEGF-A, a pu démontrer une efficacité significative sur la survie sans progression au cours d'essais cliniques.

Enfin, de nouvelles thérapies sont également en cours d'étude dans le glioblastome comme les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (anti PD1/PD-L1, CTLA4), les virus oncolytiques, les thérapies ciblant les macrophages ou les CAR-T cells (Wang et al. 2021).

Pourtant, malgré les avancées progressives dans la prise en charge du glioblastome, le taux de survie à 5 ans reste très faible ce qui démontre un besoin urgent d'améliorer les stratégies thérapeutiques actuelles. Même si des efforts colossaux ont été déployés pour explorer de nouvelles approches dans des domaines tels que l'immunothérapie et la médecine de précision, le développement de nouvelles molécules passe aussi par une meilleure compréhension de la biologie du glioblastome et de son interaction avec le microenvironnement tumoral. De même, de nombreux facteurs biologiques tels que la barrière hémato-encéphalique représentent des défis importants à relever pour aboutir au développement de thérapies plus efficaces (Tan et al. 2020).

ii) Récurrence et Résistances associées

La résistance aux traitements peut généralement être qualifiée d'acquise ou d'intrinsèque. On parle de résistance acquise lorsqu'une tumeur qui a initialement répondu au traitement n'est plus sensible à l'agent anticancéreux. La résistance intrinsèque aux médicaments fait référence à une tumeur qui présente une réponse insuffisante à la thérapie dès le début du traitement. Les principaux mécanismes de résistance étayés dans la littérature comprennent : les pompes à efflux, l'hypoxie, les cellules souches cancéreuses, la réparation des dommages à l'ADN et les micro-ARNs (figure 20).

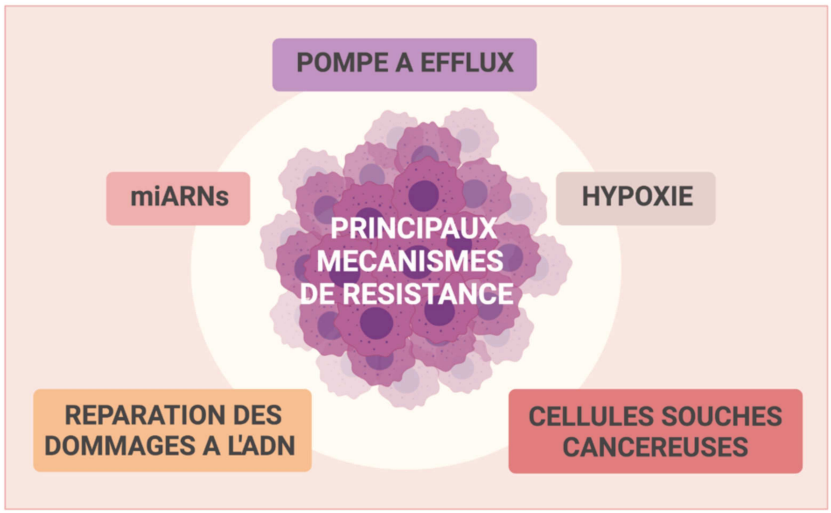


Figure 20 : Mécanismes de résistance

En général, les glioblastomes répondent bien dans les premiers cycles de traitement au témozolomide.
Cependant, l'émergence de résistance aux traitements diminuent les effets cytotoxiques du témozolomide dans les cycles suivants, jusqu'à ce que le traitement ne soit plus efficace (Stupp et al 2005, Weller et al 2014). Il a été suggéré que la récurrence des gliomes est inévitable et que près de 90% des patients ont une récurrence tumorale dans les 9 mois suivant le traitement initial (Ammirati et al. 1987 ; Choucair et al. 1986).

Comment expliquer cette récurrence tumorale ?

Plusieurs raisons peuvent expliquer cette récurrence. D'une part par la **nature infiltrante** des cellules cancéreuses de glioblastome qui rend difficile l'élimination de la tumeur primaire malgré la résection chirurgicale. En effet, des études ont montré que la récidive du GBM se produit le plus souvent sous la forme d'une croissance locale à moins de 2 à 3 cm du bord de la lésion d'origine (Gaspar LE et al. 1992 ; Halperin et al. 1988). De plus, ces tumeurs secondaires formées par les cellules invasives sont souvent très résistantes à la radiothérapie et aux chimiothérapies (Drappatz et al. 2009).

D'autre part, cette récurrence peut également s'expliquer par la très grande **hétérogénéité génétique** tumorale (Reifenberger 2004). En effet, au sein d'une même tumeur, il existe un très grand nombre de sous-clones cellulaires ce qui diminue l'efficacité d'un traitement unique et favorise la probabilité de voir émerger un clone résistant (figure 21).

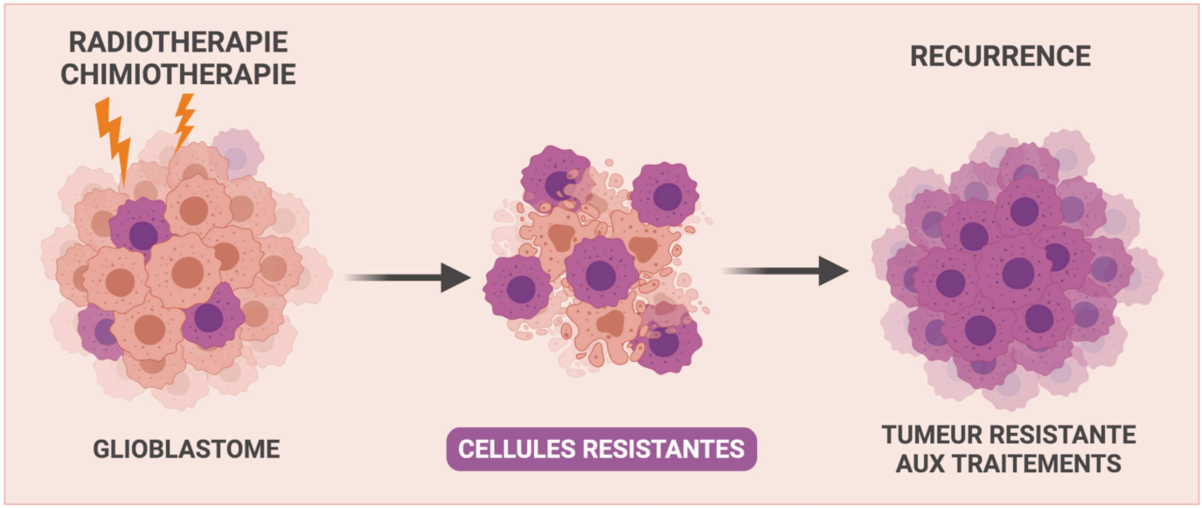


Figure 21 : Mécanisme de récurrence du glioblastome

Enfin, la présence de cellules souches cancéreuses hautement résistantes aux traitements peut expliquer cette récurrence. En effet, il existe de plus en plus de preuves soutenant le fait que les gliomes sont soutenus par une sous-population de cellules présentant des caractéristiques semblables à celles des cellules souches connues pour leurs capacités d'auto-renouvèlement et de différenciation (Pollard et al., 2009, Hemmati et al., 2003, Fleurence et al., 2019). Malheureusement, ces dernières sont hautement résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie ce qui conduit à une forte récurrence des glioblastome (Fleurence et al., 2020). De même, elles contribuent également à la croissance tumorale via l'angiogenèse en exprimant des niveaux élevés de VEGF et de SDF-1 (Haar et al. 2012).

B) Pourquoi étudier le microenvironnement tumoral ?

Pendant de nombreuses décennies, le cancer a été seulement considéré comme un agrégat chaotique de cellules capables de proliférer de manière incontrôlée et anarchique. Les chimiothérapies et les traitements avaient alors pour objectif principal de cibler les cellules cancéreuses afin de les détruire. Ainsi, les interactions complexes entre les cellules tumorales et leur environnement ont longtemps été négligées. Mais, avec la découverte du rôle clé du microenvironnement tumoral un changement de paradigme s'est opéré. L'objectif est maintenant de définir les interactions cellulaires qui existent entre le glioblastome et les cellules qui l'entourent, afin de comprendre la manière dont ces dernières peuvent influer sur la prolifération et la dissémination métastatique. Les nouvelles thérapies ciblées vont d'ailleurs dans ce sens. L'objectif n'est plus de cibler uniquement les cellules cancéreuses mais de prendre aussi en considération les cellules immunitaires environnantes afin de les « rééduquer » pour s'attaquer à la tumeur. Dans cette sous partie nous aborderons la composition du microenvironnement tumoral et en particulier de la population macrophagique et des cellules endothéliales vasculaires qui jouent un rôle clé dans le devenir du glioblastome. Nous verrons aussi en quoi ces populations sont devenues au fil des ans des cibles thérapeutiques pertinentes pour lutter contre le glioblastome.

5) Différents types cellulaires associés au microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral associe des cellules malignes et non malignes. Parmi les cellules non malignes on retrouve les cellules stromales, les cellules endothéliales vasculaires, les péricytes, les fibroblastes ainsi que les cellules immunitaires résidentes ou infiltrantes (figure 22).

Les cellules immunitaires jouent un rôle clé dans le microenvironnement (Glass R et al. 2014). On retrouve parmi les cellules immunes les macrophages périphériques recrutés, la microglie, les lymphocytes, les cellules dendritiques ainsi que les cellules NK (Burger et al. 2019, Pombo Antunes 2020). Tous ces différents acteurs cellulaires peuvent

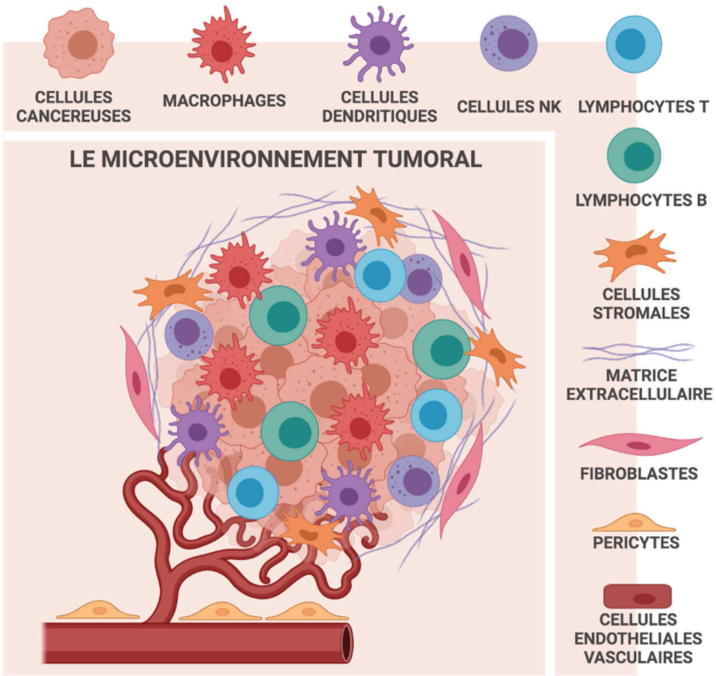


Figure 22 : Le microenvironnement tumoral

interagir entre eux entourés par la matrice extracellulaire et participer à leur niveau à l'évolution de la tumeur (De Vleeschouwer S. 2017).

De plus, Le glioblastome est intégré dans un microenvironnement tumoral hétérogène compartimenté en régions anatomiquement différentes, appelées niches tumorales (figure 23). Ces niches peuvent être composées de multiples constituants cellulaires dont la morphologie peut varier de l'une à l'autre (De Vleeschouwer S. 2017).

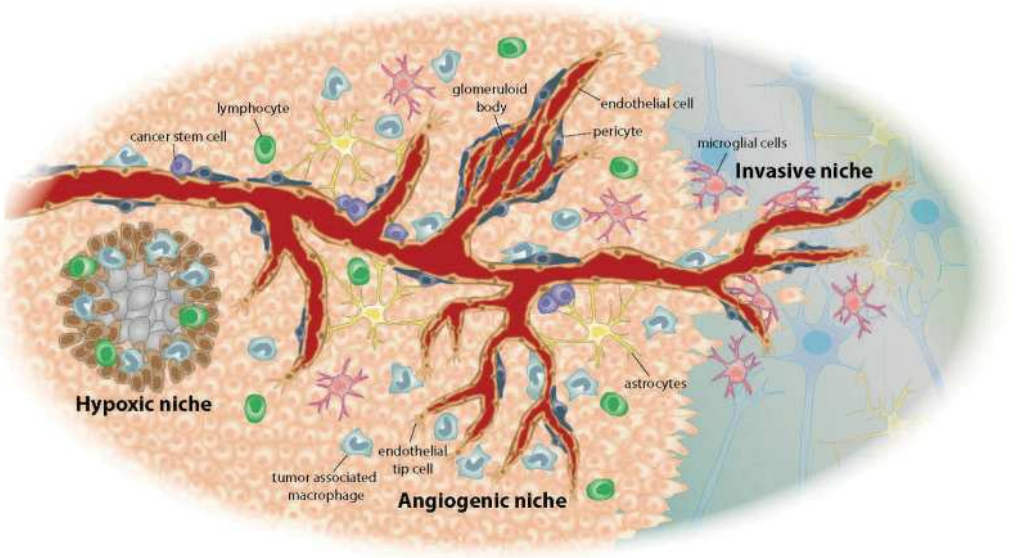


Figure 23 : Les niches tumorales associées au glioblastome (De Vleeschouwer 2017)

Ces niches régulent les besoins métaboliques, la surveillance immunitaire, la survie, l'invasion, ainsi que la survie des cellules souches du glioblastome. Dans la niche tumorale angiogénique les cellules souches tumorales se nichent en juxtaposition étroite avec le système vasculaire anormal, tandis que dans la niche tumorale invasive, les cellules tumorales cooptent les vaisseaux sanguins normaux afin de migrer profondément dans le parenchyme cérébral. Enfin, dans la niche tumorale hypoxique, il existe des zones nécrotiques entourées d'une rangée de cellules tumorales hypoxiques (De Vleeschouwer S. 2017).

En plus du rôle clé du microenvironnement cellulaire, de nombreux facteurs solubles, cytokines sont sécrétés par les cellules tumorales ou stromales. Ces molécules sont retrouvées dans le liquide interstitiel dans lequel baignent les cellules et la matrice extracellulaire. Il a par exemple été montré que des métabolites comme le lactate et l'adénosine s'accumulaient dans les zones hypoxiques et impactaient les cellules tumorales et les cellules immunitaires (Liberti MV et al. 2016). Ces facteurs solubles, malgré leur abondance dans le microenvironnement tumoral sont inégalement répartis dans tout le tissu, contribuant ainsi à l'hétérogénéité intra-tumorale des glioblastomes. Ces variations de concentrations de facteurs solubles provoquent des changements dynamiques et induisent des gradients chimiotactiques qui remodèlent constamment la composition cellulaire de la plupart des zones tumorales. De nombreuses cytokines connues pour leurs propriétés immunosuppressives ont d'ailleurs été

documentées dans le microenvironnement du glioblastome comme le facteur de croissance TGF-β et l'interleukine-10 (Fontana et al. 1991 ; Dix AR et al. 1999).

L'ensemble de ces cytokines sécrétées par les cellules tumorales, la microglie et les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) participent à maintenir un état d'immunosuppression chronique favorable à la tumeur (Locarno CV et al. 2020 ; Abels ER et al. 2020 ; Fanelli GN et al. 2021).

6) *Microglie & TAMs*

i) Origine & fonction de la microglie

Dans le cerveau, les macrophages résidents sont appelés microglie. Chez l'adulte, la microglie est directement dérivée de cellules issues du sac vitellin au stade embryonnaire (Ginhoux et al. 2013) contrairement aux macrophages qui peuvent être recrutés localement et qui dérivent eux des cellules souches hématopoïétiques (figure 24).

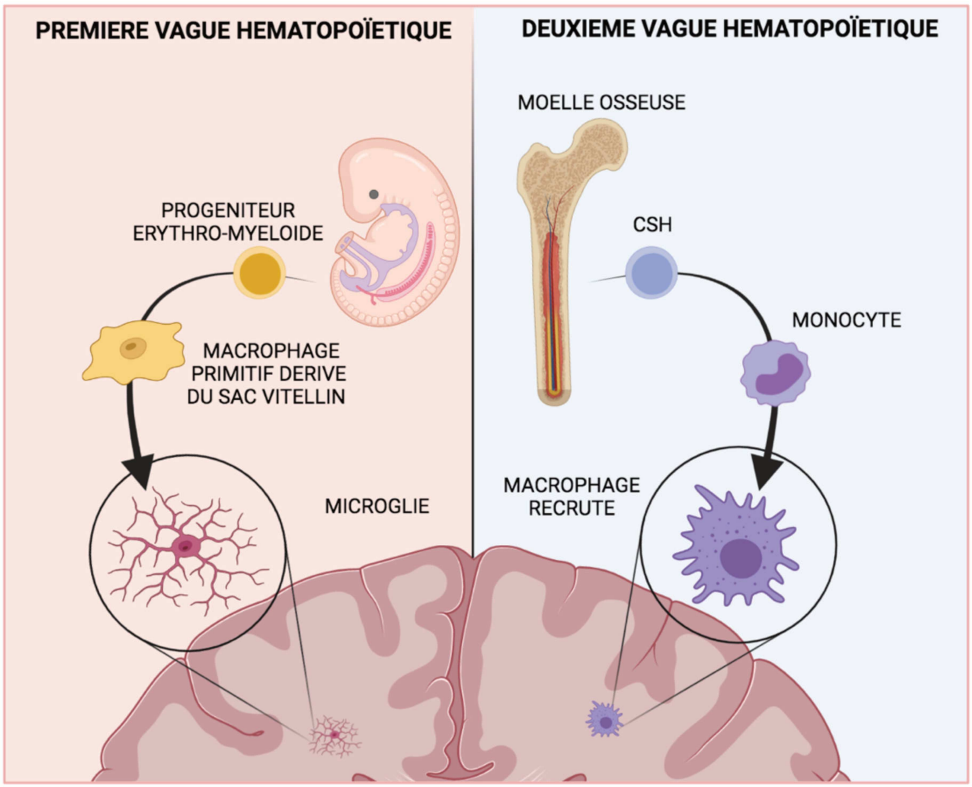


Figure 24 : Microglie et macrophages recrutés, deux origines hématopoïétiques

La microglie est une population cellulaire très mobile. Ces macrophages résidents balaient activement leur environnement en étendant et en rétractant leurs processus ramifiés sans déplacer leurs corps cellulaires principaux (Nimmerjahn et al., 2005). La microglie passe de l'état de surveillance à l'état activé en réponse à des stimuli comme une inflammation. L'activation de la microglie entraine un changement phénotypique en plus d'un changement

morphologique (Nimmerjahn et al., 2005). Ainsi, à l'état activé, la microglie passe d'une forme ramifiée à une morphologie amoeboïde caractéristique (Kettenmann et al. 2011) et devient morphologiquement indiscernable des autres macrophages périphériques recrutés (Prionisti et al., 2019) (figure 25). La plasticité fonctionnelle et la réponse rapide aux stimuli externes font de la microglie un type cellulaire très polyvalent qui a la capacité de s'adapter à son environnement.

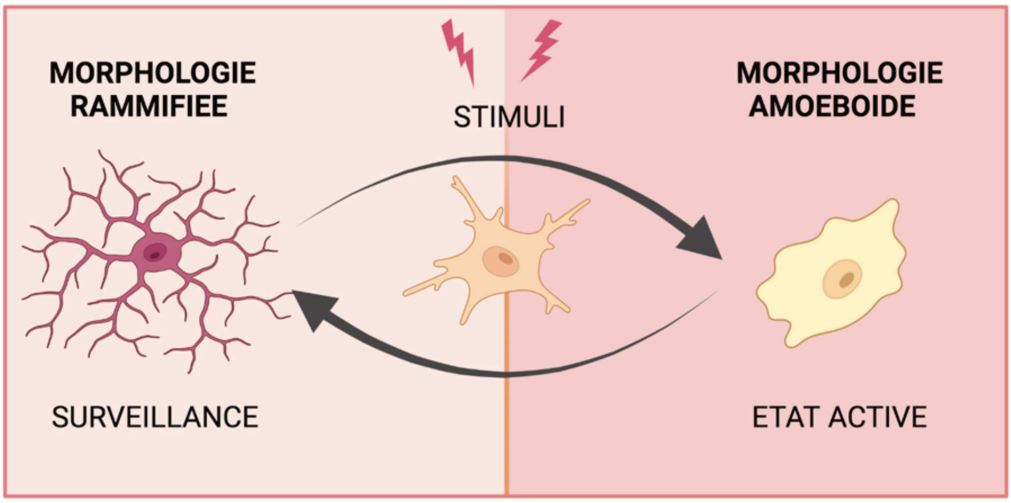


Figure 25 : Évolution morphologique de la microglie sous l'effet de stimuli

Comme décrit dans le chapitre 1, les macrophages présentent de nombreuses fonctions. Concernant la microglie, en plus des rôles précédemment décrits, d'autres fonctions spécifiques ont été identifiées comme la phagocytose des neurones apoptotiques et le raffinement synaptique des neurones (Casano et Peri, 2015).

ii) Macrophages et microglie associés au Glioblastome (GAMM) & fonctions associées

Depuis 1863, date à laquelle Virchow et al. ont révélé l'existence de globules blancs infiltrant les tumeurs, la relation entre la croissance tumorale et les macrophages a été largement étudiée.

Dans le glioblastome, les macrophages aussi appelés GAMs (Macrophages associés au glioblastome) représentent la population cellulaire majoritaire et peuvent atteindre jusqu'à la moitié des cellules de la masse tumorale (Hambardzumyan et al. 2016). Parmi ces macrophages, les macrophages et monocytes dérivés de la moelle osseuse représentent jusqu'à 85 % du total des GAM, tandis que la microglie résidente représentent les 15 % restants (Chen et al.2017 ; Ma et al. 2021). La présence des macrophages périphériques au niveau de la tumeur peut s'expliquer par l'altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE) permettant leurs recrutements accrus.

Il a ainsi pu être démontré que les GAM jouaient un rôle clé dans l'évolution du glioblastome via leurs nombreuses fonctions pro-tumorales. La relation entre le nombre de

macrophages associés à la tumeur et le pronostic des patients a été minutieusement étudié (Hirayama et al. 2018). De nombreux rapports ont ainsi pu identifier qu'il existait une corrélation entre la densité d'infiltration des TAM et le pronostic des patients. Une forte infiltration de macrophages est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers comme le glioblastome, le cancer du sein, le cancer du pancréas ou le mélanome (Takeya et al. 2016, Bingle et al. 2002 ; Li et Graeber 2012).

Le recrutement des macrophages et de la microglie

Le recrutement de macrophages et de la microglie dans le microenvironnement tumoral est médié par chimiotactisme via la sécrétion de nombreux facteurs produits par les cellules cancéreuses (figure 26). Parmi celles-ci on retrouve, le CC chimiokine ligand 2 (CCL2), le facteur soluble de stimulation des colonies (CSF-1) mais aussi le CX3CL1, SDF-1, MCP-3, le GM-CSF et le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF) (Roesch et al. 2018 ; Conti et Rollins, 2004, Noy et Pollard, 2014, Hambardzumayan et al. 2016). Ce recrutement dirigé de monocytes et de la microglie se produit par l'établissement de gradients de chimiokines qui attirent ces populations vers la niche tumorale. Ainsi, bloquer le recrutement des macrophages et des monocytes est apparue comme une stratégie thérapeutique prometteuse. L'inhibition de CCL2/CCR2 a d'ailleurs permis de prolonger la survie de souris dans un modèle de glioblastome (Z Chen et al., 2017).

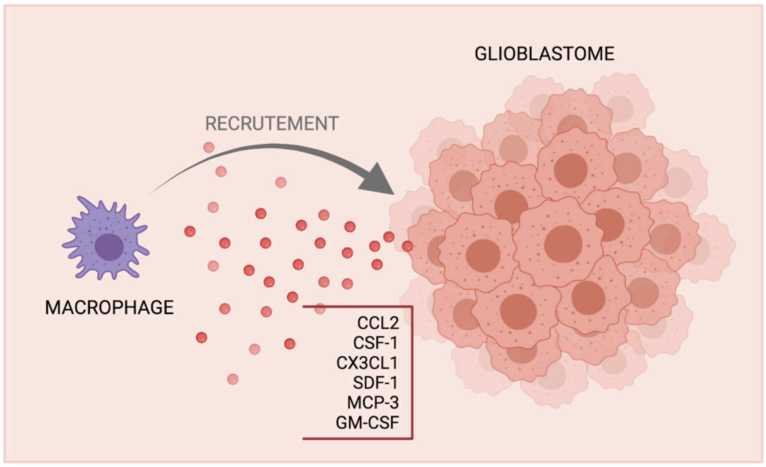


Figure 26: Recrutement des macrophages

Évolution du phénotype des TAM au cours de la tumorigenèse

D'une manière intéressante, il a été démontré que le phénotype des macrophages évoluait au cours de la tumorigenèse. Ainsi, dans les tumeurs précoces, les TAM ont un phénotype M1 dit « classique » inflammatoire et tumoricide. Les macrophages sont cytotoxiques et phagocytaires. Ils favorisent la présentation antigénique et limitent la croissance tumorale (Biswas et al. 2008 ; Mantovani et al. 2013) en produisant des cytokines de type Th1 qui activent les cellules NK et les lymphocytes T (Gabrilovich et al. 2012).

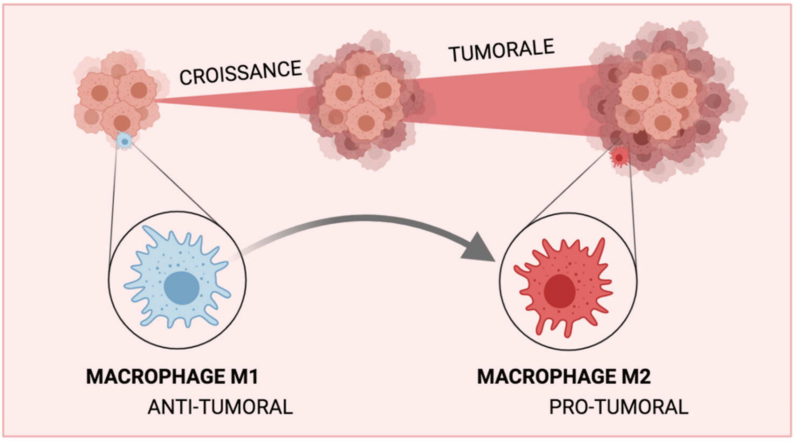


Figure 27 : Évolution du phénotype des TAM

Cependant, à mesure que la tumeur progresse et devient plus établie, les macrophages s'orientent vers un phénotype M2 dit « alternatif » favorisant un microenvironnement immunosuppressif délétère (figure 27). Cela peut s'expliquer par la présence massive du TGF-β, une cytokine immunosuppressive surexprimée dans les tumeurs qui participe au maintien d'un milieu immunosuppressif dans le microenvironnement tumoral (Zhang et al., 2016). Ces macrophages associés à la tumeur M2 présentent un phénotype pro-tumoral qui favorise l'angiogenèse et inhibent l'activation des lymphocytes T (Gabrilovich et al. 2012).

Les fonctions pro-tumorales des macrophages associés au glioblastome

Les GBM ont développé des mécanismes qui exploitent la plasticité fonctionnelle intrinsèque des macrophages et de la microglie pour faciliter la croissance tumorale (Hambardzumyan et al., 2016, Prionisti et al., 2019) et échapper à la surveillance immunitaire (figure 28).

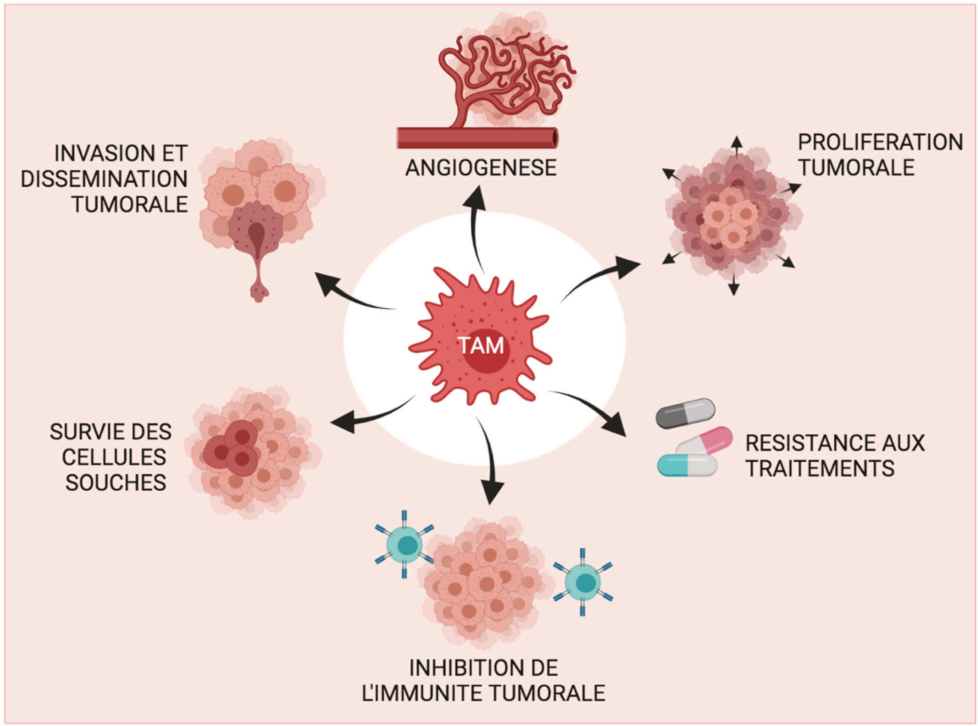


Figure 28 : Fonctions pro-tumorales des TAM

Ainsi, dans les tissus tumoraux, le CSF-1 ou l'IL-10 sécrétés par les cellules cancéreuses induisent la différenciation des macrophages en macrophages M2 (Pollard et al. 2004 ; Noy et Pollard, 2014, Quail et Joyce, 2017, van Dalen et al., 2018). Ces macrophages M2 contribuent à la progression du GBM, en favorisant la survie, l'invasion, la réorganisation de la matrice extracellulaire, la résistance à la chimiothérapie et l'angiogenèse (Prionisti et al., 2019, Hambardzumyan et al., 2016, Coniglio et al., 2012, Zhai et al. al., 2011, Hamilton et al., 2016 ; Qian and. Pollard 2010 ; Zhang et al. 2016).

Angiogénèse et la vascularisation de la tumeur

Il a été observé dans les tissus tumoraux, une augmentation drastique de la densité vasculaire. Cette observation a été corrélée à la présence massive de macrophages. En effet, une fois installé au sein du microenvironnement tumoral local, les TAM vont sécréter des facteurs proangiogéniques comme la métalloprotéinase matricielle MMP9 permettant la dégradation de la matrice extracellulaire et le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) qui favorisent ensemble l'angiogenèse (Huang et al., 2002 ; Lin et al., 2006 ; Du et al., 2008). D'autres facteurs sécrétés par les TAM ont également été décrits comme favorisant l'angiogenèse notamment le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et l'adrénomédulline (Boutilier et al. 2021), De nombreuses études récentes ont d'ailleurs démontré que les TAM étaient les principaux producteurs de facteurs pro-angiogéniques dans les tumeurs malignes. Ce processus d'angiogenèse est une étape importante dans la progression du cancer. En effet, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins est essentielle pour que les cellules tumorales à croissance rapide reçoivent des nutriments et de l'oxygène (Boutilier 2021).

Prolifération tumorale via la libération des facteurs de croissance

Les macrophages M2 associés aux tumeurs expriment des molécules pouvant affecter directement la prolifération des cellules cancéreuses. Il a notamment été démontré que des membres de la famille des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance transformant bêta (TGF-β) et le facteur de croissance épidermique (EGF) (Allavena P. 2012 ; Obermajer 2011) jouaient sur la croissance tumorale. En effet, l'EGF est une tyrosine kinase qui provoque l'activation en aval de molécules qui permettent d'éviter l'apoptose et promeuvent la prolifération et l'invasion (Riabov. 2014, Boutilier. 2021).

Invasion & dissémination tumorale

De nombreuses études rapportent le rôle des macrophages associés à la tumeur dans l'invasion des cellules cancéreuses. Il a par exemple été montré que la microglie synthétise et libère la protéine 1 inductible par le stress (STI1), un ligand qui augmente la prolifération et la migration des glioblastomes *in vitro* et *in vivo* (Carvalho da Fonseca AC et al. 2014).

De même il a été démontré que les TAM produisent également le facteur de croissance épidermique (EGF) et le TGF-β qui augmentent l'invasion tumorale (Coniglio et al., 2012 ; Hambardzumyan D et al. 2016). En effet le TGF-β, provoque la production de métalloprotéinase matricielle 9 qui altère la matrice extracellulaire et augmente ainsi l'invasion des cellules souches cancéreuses (Ye XZ et al. 2012).

Les TAMs de type M2 sont également impliqués dans l'invasion tumorale en agissant sur la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) (Cortés et al. 2017). L'EMT est un processus au cours duquel les cellules tumorales épithéliales perdent leurs caractéristiques épithéliales et acquièrent une fonction mésenchymateuse (Zhang J. et al. 2016). Cette transition contribue à la métastase globale en augmentant le pouvoir invasif et la motilité des cellules cancéreuses elles-mêmes (Diepenbruck et al. 2016). Ce processus EMT permet aux cellules cancéreuses de quitter le site primaire pour coloniser des tissus environnants et former des métastases secondaires. Ainsi, les macrophages de type M2 sont capables d'induire l'EMT par diverses voies de signalisation telles que les voies TLR4 et IL-10 (Zhu L. et al. 2017), la voie TGF-β/Smad2 (Zhu L. et al. 2017) et les voies de signalisation miR-30a/NF-κB/Snail (Zhang Q. et al. 2019).

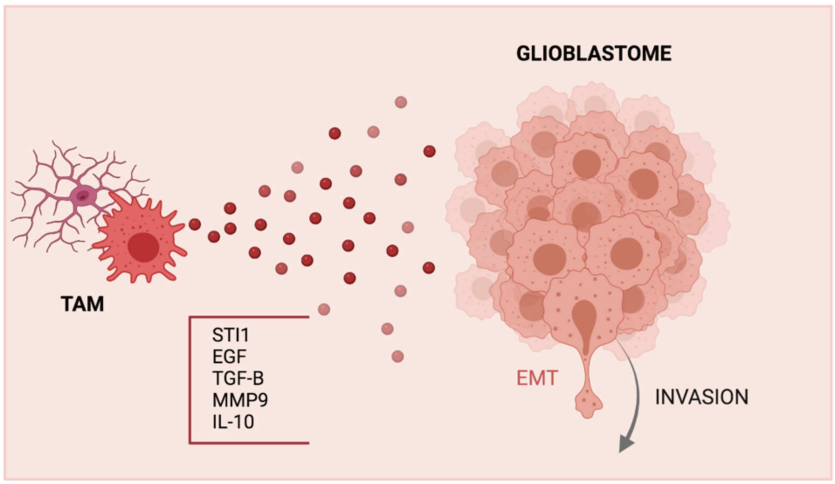


Figure 29 : Rôle des TAM dans l'invasion tumorale

Inhibition de l'immunité anti-tumorale

En plus de favoriser directement la prolifération et l'invasion tumorale, les TAM de type M2 sont capables d'inhiber d'autres cellules immunitaires. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les macrophages recrutés produisent des facteurs immunosuppresseurs comme l'interleukine l'IL-10 et l'IL-13 capables d'inhiber la prolifération et l'activation des lymphocytes T (Zhang et al., 2016). Cette inhibition des lymphocytes T via les macrophages peut également se faire via les points de contrôle immunitaire que sont l'antigène 4 cytotoxique associé aux lymphocytes T (CTLA-4), la protéine programmée 1 de mort cellulaire (PD-1), le récepteur Fas et l'immunoglobuline T contenant le domaine mucine protéine 3 (TIM3) (Pardoll et al. 2012). Les points de contrôle immunitaires sont des voies de régulation qui fonctionnent pour inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T, maintenant ainsi l'auto-tolérance tout en contrôlant la réponse immunitaire. Des études ont ainsi montré que les molécules co-stimulatrices CD80/CD86, exprimées par les TAM, interagissent avec CTLA-4, provoquant une activation réduite des lymphocytes T (Fecci et al. 2007 ; Badie et al. 2001). De

même, le récepteur Fas, exprimé sur les cellules CD8+T, se lie au ligand Fas exprimé par les TAM, et leur interaction induit l'apoptose lymphocytaire (Walker DG et al. 2006). Enfin, les cellules T CD8+ expriment également TIM3, dont le ligand est la galectine 9 exprimée par les TAM qui entraînent l'inhibition de la réponse anti-tumorale des cellules T helper 1 (Zhu C. et al. 2005).

Survie des cellules souches cancéreuses

Récemment, une corrélation positive entre la densité des cellules souches de glioblastome (GSC) et des TAM a été établie, indiquant que les cellules souches peuvent recruter des TAM plus efficacement que leurs homologues néoplasiques plus différenciés (Yi. L et al. 2011). Une étude plus récente a montré que les GSC libèrent de la périostine, qui s'accumule dans la niche périvasculaire. La périostine agit par chimiotactisme pour recruter les TAM (Zhou et al. 2015).

Une fois recruté, il a été démontré que les macrophages associés aux tumeurs affectaient également les propriétés des cellules souches du glioblastome dans la mesure où le TGF-β libéré par les TAM induit l'expression de la MMP-9 et augmente le pouvoir invasif des cellules souches. (Ye XZ et al. 2012 ; Hambardzumyan et al. 2016).

Résistance aux traitements

Les macrophages associés aux tumeurs ont également un rôle dans la résistance aux traitements notamment à la radiothérapie et chimiothérapie (Boutilier et al. 2021). La radiothérapie a par exemple montré des résultats controversés sur les TAM. En effet les macrophages M2 se sont avérés plus résistants à la radiothérapie que les macrophages M1, ce qui complexifie le traitement du cancer car la plupart des macrophages associés sont de phénotype M2 (Leblond et al. 2017). Ainsi, les tumeurs du glioblastome traitées par rayonnement X présentaient un rapport M2/M1 accru. A l'inverse d'autres études ont montré que de faibles doses de rayonnement pouvaient reprogrammer les macrophages vers un phénotype M1 (Dalton et al. 2017). Il a été proposé que la voie de signalisation hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) soit impliquée dans la résistance à la radiothérapie ; son expression radio-induite est responsable de l'activation de SDF-1 et de son récepteur apparenté CXCR4 (Ceradini et al. 2005), conduisant au recrutement de monocytes ainsi qu'à la récidive tumorale (Wang. SC et al. 2013). De plus, la radiothérapie augmente le recrutement des monocytes via CSF-1 (Stafford et al. 2016).

Bien que les macrophages dans les tumeurs traitées par chimiothérapie puissent parfois améliorer l'efficacité du traitement, ils contribuent plus généralement à la chimiorésistance via un recrutement accru de cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC), via l'inhibition des réponses immunitaires adaptatives anti-tumorales et via l'activation de programmes anti-apoptotiques dans les cellules cancéreuses (DeNardo et al. 2011 ; Boutilier et al. 2021). Enfin, il

a été montré que les TAM présentant un phénotype M2 contribuent également à la résistance aux thérapies anti-angiogéniques en augmentant la population de macrophages de type M2 dans le microenvironnement tumoral après l'utilisation de thérapies anti-angiogéniques (Castro et al. 2017).

Ainsi, la compréhension des mécanismes de résistance des macrophages à la thérapie est fondamentale pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques sans risque de récidive. L'hétérogénéité complexe des TAM dans le microenvironnement tumoral nécessite une étude approfondie. Comprendre le rôle et les mécanismes moléculaires et cellulaires des TAM M2 dans le microenvironnement tumoral est essentiel pour le développement de nouvelles thérapies (Boutilier et al. 2021).

iii) De nouveaux traitements ciblant les macrophages associés aux tumeurs ?

Au vu de leurs rôles pro-tumoraux largement établis, les macrophages sont rapidement devenus une cible prometteuse en oncologie et en particulier dans le glioblastome. Pour cela trois approches principales ont été proposées : la première vise à bloquer le recrutement et l'infiltration des macrophages au niveau du site tumoral, la deuxième vise à éliminer les macrophages associés à la tumeur, la troisième a pour objectif de reprogrammer les macrophages M2 en macrophages M1 anti-tumoraux (figure 30).

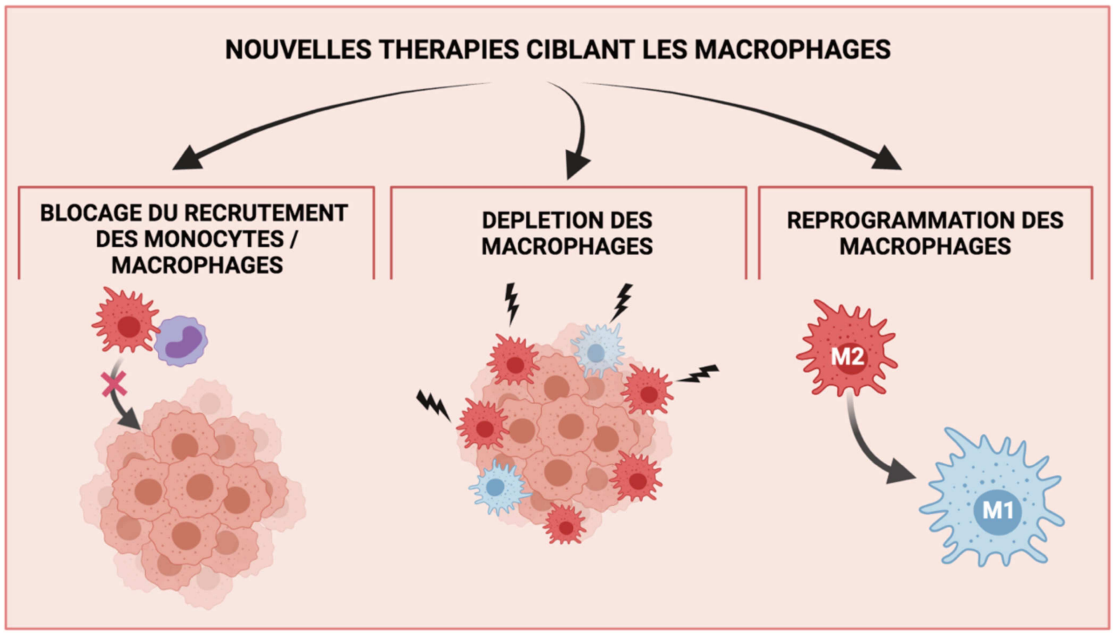


Figure 30 : Nouvelles thérapies ciblant les macrophages

Blocage du recrutement et de l'infiltration des macrophages *(Figure 31)*

Parmi les principaux facteurs dérivés de tumeurs conduisant au recrutement des monocytes et des macrophages on retrouve le CSF-1, CCL2 et SDF-1. Ainsi, les stratégies consistant à bloquer l'axe CSF1/CSF1R, CCL2/CCR2 et SDF1/CXCR4 sont apparues comme des approches pertinentes pour inhiber le recrutement des monocytes et des macrophages.

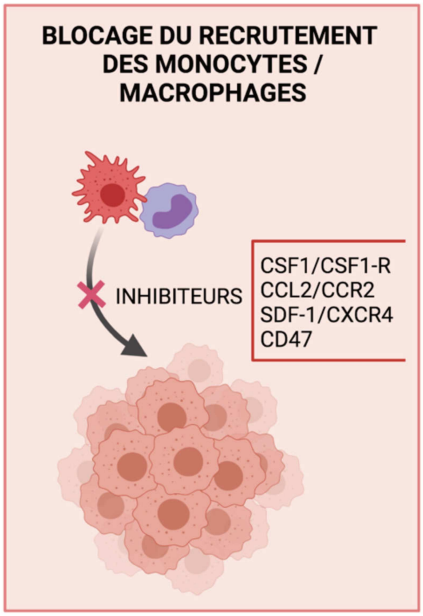


Figure 31: Thérapies bloquant le recrutement des TAM

Des études récentes ont montré qu'un anticorps monoclonal, l'emactuzumab, ciblant le **CSF-1R** pouvait diminuer le nombre de TAM tout en augmentant le rapport cellules T CD8+/CD4+ dans le TME dans un modèle murin préclinique (Boimel et al. 2012). De même, le blocage de l'axe via l'utilisation de molécules telles que le PLX3397 a également été développés et a montré une augmentation de l'infiltration des lymphocytes T CD8+ et une meilleure réponse thérapeutique dans des modèles murins pour plusieurs types de cancers (Ries et al. 2014). Cependant, bien que le ciblage de la voie CSF-1/CSF-1R semble être une cible attrayante, certaines études ont montré qu'une inhibition à long terme de CSF-1R pouvait conduire à une résistance acquise et à une récidive tumorale par activation de la voie PI3K (Boutilier et al. 2021).

Concernant l'axe CCL2/CCR2, les thérapies de blocage du **CCR2** ont été efficaces pour supprimer le recrutement de TAM (Klug et al. 2013). Les inhibiteurs de CCR2 et les anticorps monoclonaux anti-CCL2 utilisés dans des modèles murins ont montré une efficacité à la fois seuls et en combinaison avec d'autres thérapies anticancéreuses (Canè et al. 2019 ; Argyle et al. 2018 ; Boutilier et al. 2021). Malheureusement bien que cela se soit révélé prometteur, dans les modèles murins de cancer du sein, un effet rebond a été montré après l'arrêt du traitement anti-CCL2, augmentant l'infiltration des monocytes de la moelle osseuse dans la tumeur et accélérant les métastases pulmonaires (Brana et al. 2015). Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours utilisant des antagonistes du CCL2 et du CCR2 pour traiter les tumeurs solides (Gschwandtner et al. 2019, Buonfiglioli et al. 2021).

Une autre voie clé dans le recrutement et la différenciation des monocytes en TAM est l'interaction **SDF-1/CXCR4.** L'inhibition de CXCR4 avec l'AMD3100 a réduit la formation de métastases (Hughes et al. 2015). Plusieurs antagonistes CXCR4, tels que le peptide R ou le LY2510924, se sont avérés bénéfiques dans les modèles murins de glioblastome (Peng et. al. 2015 ; Mercurio et al. 2016). Une étude de phase I/II chez des patients atteints de GBM après radiothérapie et témozolomide (NCT01977677) a suggéré que l'inhibiteur du CXCR4, le

Plerixafor en perfusion était bien toléré en tant qu'adjuvant de la radio-chimiothérapie chez les patients GBM nouvellement diagnostiqués et améliorait le contrôle local de la récidive tumorale (Thomas et al. 2019).

Enfin une autre approche pour bloquer le recrutement de TAM consiste à cibler le **CD47**. Deux récents essais de phase I sont en cours pour tester l'efficacité de deux anticorps monoclonaux, IBI 188 (NCT03763149) et SRF-231 (NCT03512340) utilisés en monothérapie chez les patients atteints de tumeurs malignes avancées et de lymphomes (Buonfiglioli et al. 2021)

Déplétion des macrophages *(Figure 32)*

CSF1 est également impliqué dans la prolifération des monocytes/macrophages. Par conséquent, des inhibiteurs de l'axe CSF1/CSF1-R seul ou en combinaison avec d'autres thérapies ont été testés au cours d'études précliniques et cliniques. Dans les modèles animaux, l'emactuzumab ciblant le CSF-1R, a entraîné une diminution du nombre de TAM dans la tumeur (Ries et al. 2014). L'évaluation de ce même anticorps en association avec le paclitaxel chez les patients atteints de tumeurs solides avancées a révélé une réduction importante des TAM dans le TME et un bon profil de sécurité, bien que jusqu'à présent, aucune amélioration cliniquement pertinente n'a pu être observée (Gomez-Roca 2019 ; Wesolowski et al. 2019). De manière similaire, l'inhibition de CSF-1R à l'aide de la molécule PLX3397 a été efficace pour dépléter les TAM et pour restaurer la migration des cellules T dans le microenvironnement tumoral dans un modèle murin de cancer du sein (Peranzoni 2018).

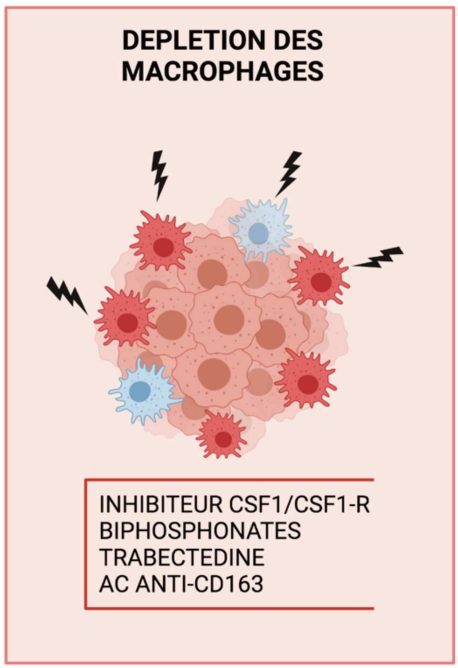


Figure 32 : Thérapies entrainant la déplétion des TAM

D'autres molécules plus anciennes ayant une toxicité préférentielle vis-à-vis des monocytes/macrophages ont été également été utilisés pour réduire leur nombre dans les tumeurs comme les biphosphonates et la trabectédine. Les bisphosphonates sont généralement utilisés pour le traitement de l'ostéoporose. Après administration, ces composés inorganiques sont sélectivement adsorbés dans le tissu osseux et métabolisés par les ostéoclastes (Anfray et al. 2019). En plus des ostéoclastes, il a été rapporté que les macrophages tissulaires, y compris les TAM, sont affectés par les bisphosphonates, seuls ou en association avec une chimiothérapie. Plusieurs nanoparticules (NP) ont été utilisées pour améliorer l'administration de bisphosphonates aux TAM, les plus populaires étant les formulations liposomales de clodronate qui ont montré une efficacité anti-tumorale dans plusieurs modèles murins incluant les gliomes (Mantovani. 2017 ; Anfray et al. 2019). Les

liposomes clodronates sont couramment utilisés dans la recherche biomédicale pour dépléter les macrophages afin de comprendre leur fonction *in vivo*. Malheureusement la toxicité élevée de cette approche limite la pertinence translationnelle de ces études puisque toutes les populations macrophagiques sont touchées (Piaggio. 2016 ; Zhu. S 2013).

Concernant la trabectédine, il s'agit d'un médicament antinéoplasique qui, en plus de cibler les cellules tumorales, peut dépléter partiellement les monocytes circulants et les TAM par une voie d'apoptose dépendante de TRAIL (Germano et al. 2013).

D'autres approches plus sélectives ont également vu le jour afin de dépléter non pas la totalité des macrophages mais seulement une sous-population de macrophages M2 pro-tumoraux exprimant le marqueur membranaire CD163. En effet, dépléter durablement la totalité des macrophages peut avoir un effet délétère car les macrophages participent également à la défense de l'hôte et à l'homéostasie tissulaire. Pour cibler cette sous-population M2, un anticorps anti-CD163 conjugué avec des nanoparticules lipidiques de doxorubicine a été développé. Etzerodt et al. ont montré dans un modèle de mélanome de souris que l'épuisement sélectif des macrophages CD163+ rééduque le TME par le biais d'un recrutement accru de cellules T et de monocytes qui contribuent tous deux à la régression tumorale (Etzerodt et al. 2019).

Dans l'ensemble, le manque de sélectivité envers les sous-ensembles myéloïdes pro-tumoraux, et les problèmes associés à la déplétion des macrophages dans d'autres organes pendant une période prolongée, ont limité l'utilisation de ces stratégies en clinique. De plus, des études récentes indiquent que la reprogrammation des macrophages, plutôt que la déplétion des TAM, pourrait être plus bénéfique pour déclencher une réponse immunitaire anti-tumorale efficace (Anfray et al. 2019)

Reprogrammation des macrophages M2 en M1

Alors que la majorité des études soutiennent le rôle pro-tumoral des macrophages dans les tumeurs, des travaux ont cependant montré que les macrophages conservent leurs capacités tumoricides. La repolarisation des macrophages M2 associés aux tumeurs vers un phénotype M1 anti-tumoral est possible. Dans ce sens, de nombreuses molécules et approches ont été testées que ce soit par le biais d'agonistes des récepteurs de type Toll (TLR), d'activateurs de la voie cGAS-STING, d'acides nucléiques (c'est-à-dire miARN ou siARN), d'anticorps monoclonaux ou de virus oncolytiques (Figure 33).

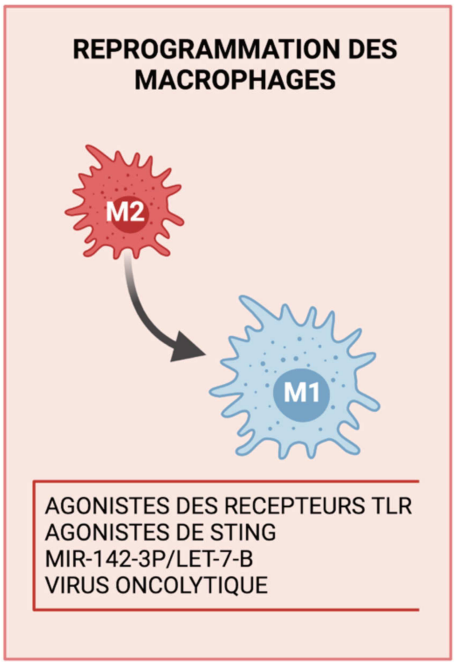


Figure 33: Thérapies reprogrammant les TAM-M2 en M1

Les récepteurs Toll-like sont des acteurs clés de la programmation M1. Lors de la liaison d'un ligand à ces

récepteurs, les macrophages s'orientent vers phénotype pro-inflammatoire M1. Les ciblages de TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 ont tous été évalué au cours des dernières années, mais actuellement un agoniste de TLR7, l'imiquimod, est le seul traitement approuvé par la FDA pour les carcinomes épidermoïdes et basocellulaires (Papadavid et al. 2007). D'autres études sont en cours comme la stimulation du TLR3 avec poly I:C qui s'est avérée plus efficace que l'imiquimod pour reprogrammer les TAM M2 vers un phénotype M1 (Maeda et al. 2019).

L'utilisation d'agonistes du gène stimulateur de l'interféron (STING) comme le DMXAA ou les di-nucléotides c-di-GMP ou le cGAMP ont également été explorés. Il a ainsi été démontré que ces molécules pouvaient rééduquer les macrophages associés aux tumeurs vers un phénotype pro-inflammatoire M1 anti-tumoral (Downey et al. 2014 ; Ohkuri et al. 2014, Ohkuri et al. 2017 ; Cheng 2018). En revanche, l'effet des doubles brins d'ADN, pourtant en amont de la voie cGAS-STING sur la repolarisation des macrophages demeure très peu exploré.

Des travaux récents ont également étudié le rôle des microARN, comme miR-142-3p, qui cible le TGF-β, ou let-7b, qui active le TLR7 dans les TAM, entraînant une réduction de la croissance des gliomes (Xu S et al. 2014 ; Buonfiglioli et al. 2019). De plus, il a été démontré que l'utilisation d'inhibiteurs du CSF1R, tels que le BLZ945, diminue la progression du gliome en polarisant les TAM en un phénotype anti-tumoral dans un modèle murin de glioblastome (Pyonteck 2013). Cependant, d'autres essais précliniques étudiant l'administration à long terme de BLZ945 ont montré que les tumeurs réapparaissaient rapidement après une phase de dormance de plusieurs semaines (Quail et al. 2016).

Enfin, des virothérapies oncolytiques ont été proposées pour cibler et reprogrammer les TAM en plus de tuer directement les cellules tumorales (Van den Bossche et al. 2018). Des études récentes ont démontré que l'administration de nanoparticules chargées en IL-12 chez des souris porteuses de tumeurs est bénéfique pour la survie et la rééducation du TAM vers un phénotype anti-tumoral (Wang et al. 2017). Cela a abouti à un essai de phase I en cours chez des patients atteints de GBM récurrents et évolutifs avec un adénovirus qui induit la production d'IL-12 (NCT03636477) (Buonfiglioli et al. 2021).

Nous avons vu dans cette partie que les macrophages sont des cellules clés dans le microenvironnement tumoral puisqu'elles impactent directement et indirectement le devenir de la tumeur. Compte tenu de tous ces aspects, les futures recherches devraient tenter d'exploiter le potentiel des TAM pour le développement de traitements ciblés contre les tumeurs cérébrales, et en particulier dans le glioblastome.

7) *Le microenvironnement vasculaire dans le glioblastome*

Au même titre que les macrophages, les cellules endothéliales vasculaires jouent un rôle clé dans le microenvironnement associé au glioblastome. Dans cette partie, nous verrons les caractéristiques du système vasculaire et les processus de néovascularisation impliqués dans cette pathologie. Nous détaillerons également les différents traitements explorés à ce jour.

i) Caractéristique du système vasculaire cérébral : physiologie vs pathologie

En condition physiologique, le système vasculaire cérébral est composé d'unités fonctionnelles multicellulaires bien organisées qui assurent une irrigation et un drainage efficace du système nerveux central. Les cellules endothéliales s'organisent en monocouche et sont connectées entre elles via des molécules jonctionnelles. Les cellules endothéliales sont enveloppées de péricytes et entourées d'une lame basale spécialisée partagée avec les péricytes et les extrémités astrocytaires et interconnecté avec les terminaisons neuronales et la microglie (Agarwal et al. 2021). La barrière hémato-encéphalique (BHE) est composée de cellules endothéliales, de péricytes et d'astrocytes, formant une unité neurovasculaire protective qui régule étroitement le transfert d'ions et de molécules entre le sang et le cerveau (Seano et al. 2020 ; Garcia-Gomez et al 2020 ; Rosinska et Gavard 2021).

Dans le glioblastome le microenvironnement tumoral affecte considérablement cette vascularisation qui présente des vaisseaux tortueux, désorganisés et dilatés qui échappent à une régulation et une architecture contrôlée (Azzi S. 2013). Ces vaisseaux tumoraux présentent

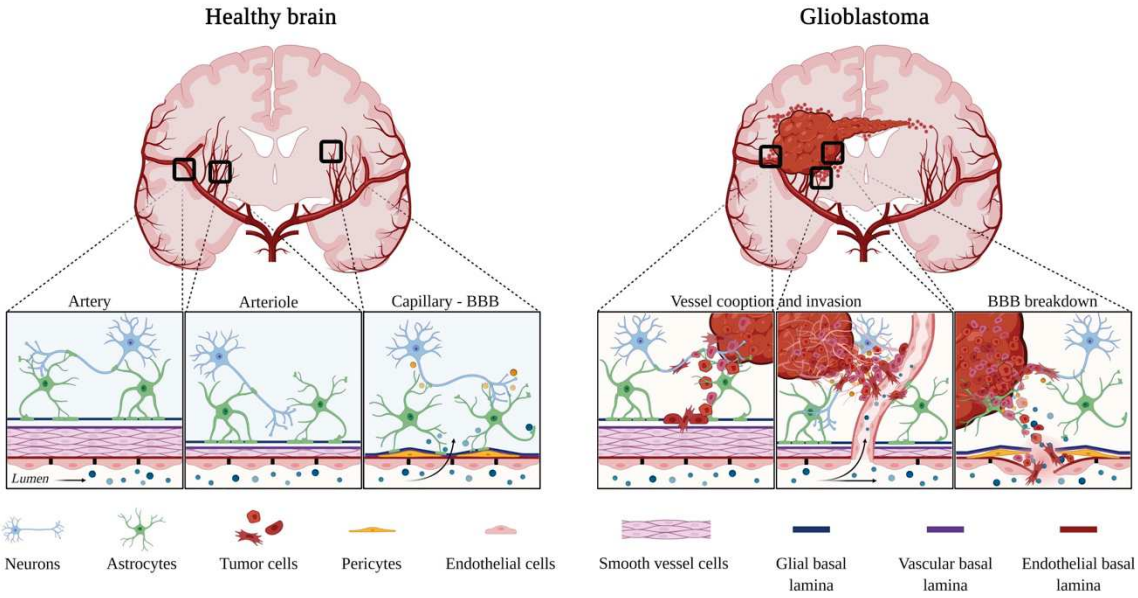


Figure 34 : Le système vasculaire cérébral physiologique et pathologique (2021 Guyon, Chapouly, Andrique, Bikfalvi and Daubon)

des zones avec des diamètres plus grands et des membranes basales plus denses, tandis que la paroi endothéliale et la couverture péricytaire est anormale.

Mais quelles sont les conséquences de ces changements vasculaires ?

Dans les gliomes, la présence de divers facteurs angiogéniques et de chimiokines exprimés par des cellules tumorales ou des cellules immunitaires infiltrantes comme les macrophages a été rapportée. Ces anomalies vasculaires sont cependant principalement attribuées aux niveaux élevés de facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) qui provoquent par la suite la rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'altération des propriétés de la BHE induit une perméabilité des vaisseaux avec une fuite de plasma et de fluide dans le tissu tumoral responsable d'un œdème cérébral et de l'augmentation de la pression interstitielle. Ces changements compromettent également la fonction vasculaire et conduisent à un flux sanguin lent et à une distribution d'oxygène insuffisante dans le glioblastome ce qui contribue à l'apparition de zones hypoxiques. À leur tour, ces zones hypoxiques locales se développent et peuvent évoluer vers la nécrose pseudopalissadique. Ces conditions attirent d'autant les macrophages M2 pro-angiogéniques immunosuppressifs qui participent à étendre la vascularisation tumorale à ces zones hypoxiques ou nécrosées (Rosinska et Gavard 2021 ; Guyon et al. 2021 ; Schaffenrath et al. 2021).

Mais ces zones hypoxiques ne sont pas les seules conséquences de l'altération du système vasculaire. En effet, la nature hétérogène des vaisseaux affecte également l'adhésion cellulaire et la diapédèse des cellules immunitaires. À cet égard, il est important de noter que l'élévation du VEGF, en plus de générer une vascularisation anormale et angiogénique, inhibe également l'extravasation des lymphocytes T. En effet, le VEGF réduit les molécules d'adhésion ICAM1 et VCAM1 dans les vaisseaux et empêche ainsi l'infiltration des cellules effectrices T immunitaires dans la tumeur ; il inhibe également directement la maturation des cellules dendritiques et active les cellules T régulatrices spécifiques de l'antigène (Treg) (De Vleeschouwer et al. 2017). Enfin, il est à noter que l'altération du système vasculaire tumoral et sa perte de fonctionnalité limite grandement l'administration et l'efficacité de la chimiothérapie (Carmeliet et al. 2011).

Ainsi, l'ensemble du microenvironnement tumoral s'adapte et s'éduque en permanence afin de former de nouveaux vaisseaux destinés à favoriser la prolifération et l'invasion de la tumeur.

ii) Les processus de néovascularisation dans le glioblastome

Quatre mécanismes principaux de néovascularisation ont été identifiés dans le glioblastome. Ils regroupent, la cooptation vasculaire, l'angiogenèse, la vasculogenèse et le mimétisme vasculaire (Figure 35) (Rosinska et Gavard 2021).

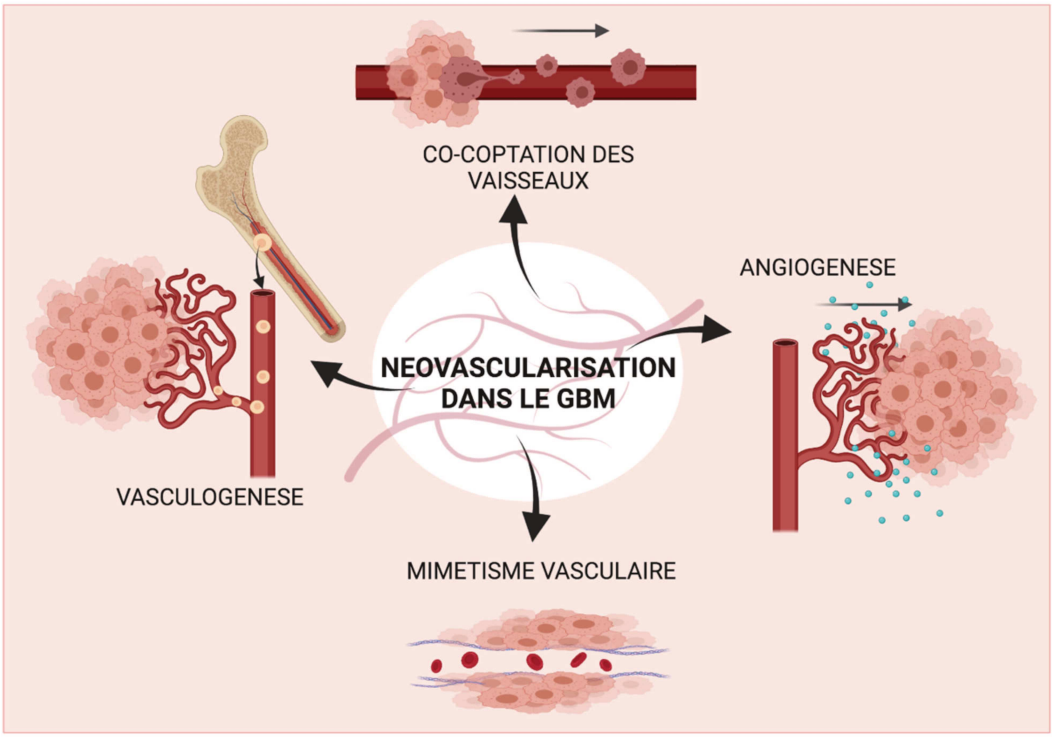


Figure 35: Mécanismes principaux de néovascularisation dans le glioblastome

La co-optation vasculaire

La cooptation des vaisseaux, également appelée « angiotropisme » ou « migration périvasculaire/extravasculaire » est un processus non angiogénique par lequel les cellules tumorales utilisent les vaisseaux sanguins préexistants pour soutenir la croissance tumorale, la survie et les métastases. Pour cela, les cellules cancéreuses peuvent migrer le long de la surface abluminale des vaisseaux et/ou infiltrer l'espace stromal entre les vaisseaux, conduisant finalement à l'incorporation de vaisseaux préexistants dans la tumeur (Seano et al. 2020). Cela se produit en cooptant la vascularisation cérébrale normale dans les premiers stades du développement du gliome afin d'augmenter le flux sanguin et le tonus vasculaire avant que les processus suivants ne soient capables d'adapter le microenvironnement vasculaire tumoral.

Il est important de noter que les cellules de glioblastome sont capables de s'associer avec des vaisseaux sanguins de tous types et de tous calibres. Afin de se déplacer le long des vaisseaux, les cellules tumorales cooptées subissent des modifications morphologiques et moléculaires. Les cellules GBM étendent leurs capacités invasives et migratoires avec l'émergence d'un phénotype de type mésenchymateux. Cette imitation de processus de

transition épithéliale à mésenchymateuse (EMT) peut être qualifié de « EMT-like » ou « transition gliale-mésenchymateuse » (GMT) (Iser et al. 2019 ; Fedele et al. 2019).

En migrant ces dernières peuvent également déplacer les extrémités des astrocytes du système vasculaire afin d'être en contact direct avec les cellules endothéliales. Ce comportement entraîne donc une perte de couplage astrocyte-vaisseau et peut engendrer une rupture de la BHE (Watkins et al. 2014).

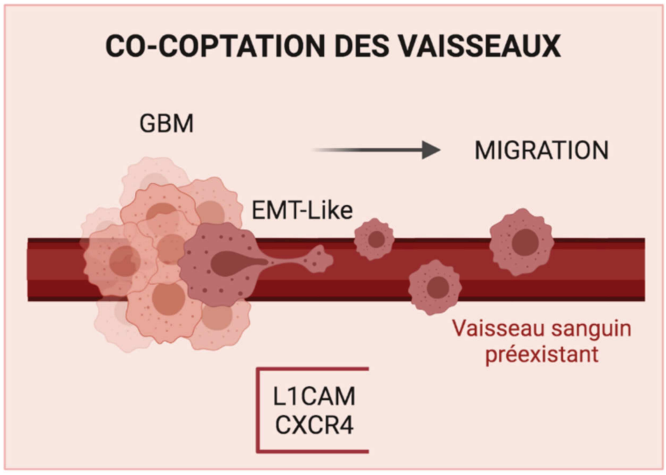


Figure 36 : Phénomène de co-optation des vaisseaux

Des études *in vivo* ont également révélé que les cellules du glioblastome pouvaient se lier aux péricytes en formant des protubérances riches en actine et en modifiant leur contractilité (Caspani et al. 2014). Cependant, ce contact indésirable des péricytes avec les cellules tumorales altère leurs fonctions et affecte l'intégrité de la BHE. De plus, des études *in vivo* ont révélé que la cooptation des vaisseaux par les cellules tumorales comprimait les vaisseaux hôtes réduisant le débit sanguin et provoquant ainsi une hypoxie locale (Jain et al. 2015). Au niveau moléculaire, de nombreuses molécules d'adhésion et de récepteurs membranaires sont impliqués dans ce processus. On peut citer par exemple l'intégrine L1CAM, les récepteurs des chimiokines CXC (CXCR) comme le CXCR4 ou le récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR) (Figure 36) (Kulahin et al. 2008 ; Donier et al. 2012).

Fait intéressant, ce processus semble être indépendant de VEGF. En effet, dans ces conditions, les inhibiteurs du VEGF ne parviennent pas à freiner la progression et l'invasion des cellules tumorales, comme rapporté dans les modèles murins orthotopiques de glioblastome (Baker et al. 2014).

L'angiogenèse

L'angiogenèse est le développement de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants en condition physiologique ou pathologique. Dans le cas du glioblastome, l'angiogenèse a pour objectif d'augmenter l'apport d'oxygène et de nutriments à la masse tumorale en croissance. L'angiogenèse est un processus complexe et étroitement régulé qui implique

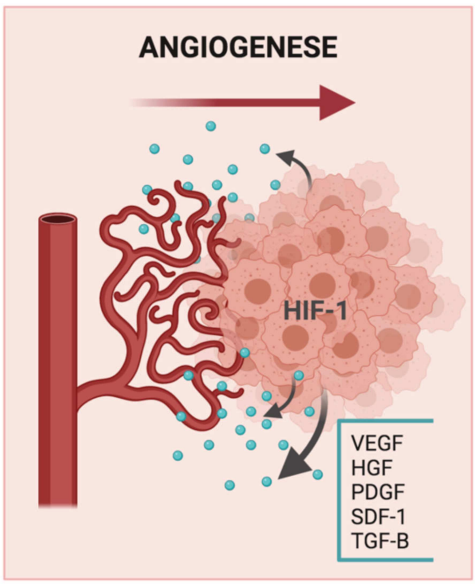


Figure 37 : Phénomène d'angiogenèse

la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales vasculaires (Rosinska et Gavard. 2021 ; Kane et al. 2019).

L'angiogenèse fait suite à une cooptation vasculaire. La « cellule de pointe » est attirée vers la masse tumorale et prend la tête du nouveau vaisseau émergent. De nombreux facteurs pro-angiogéniques et inhibiteurs régulent ce processus. Parmi le large éventail de stimuli angiogéniques, le manque d'oxygène est l'un des plus puissants déclencheurs, qui fonctionne principalement via l'activation du facteur inductible par l'hypoxie (HIF-1) facteur de transcription qui régule l'expression du VEGF (Masoud et al. 2015). D'autres facteur angiogéniques sont également impliqués comme le facteur de croissance dérivé des hépatocytes (HGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur dérivé du stroma (SDF-1) et le facteur de croissance transformant (TGF-b) (figure 37). Des études ont également suggéré que les cellules souches de glioblastome favorisent ce processus de manière à promouvoir la progression tumorale (Folkins et al. 2009).

La vasculogénèse

La vasculogenèse est le mécanisme alternatif conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ce processus repose sur la différenciation des cellules progénitrices endothéliales (EPC) par laquelle les cellules circulantes dérivées de la moelle osseuse se différencient en cellules endothéliales (Kane et al. 2019). Cela est rendu possible grâce au taux circulants particulièrement élevé de cellules progénitrices endothéliales dans le cancer y compris chez les patients atteints de GBM (Moschetta et al. 2014 ; Döme et al. 2007 ; Huizer et al. 2019). Des modèles murins ont également permis de démontrer que seules les tumeurs avancées recrutent et incorporent des EPC dérivés de la moelle osseuse dans les néovaisseaux, via un processus régulé par une large gamme de cytokines et de chimiokines sécrétées par les cellules tumorales dont le SDF-1 (Rosinska et Gavard 2021) (Figure 38).

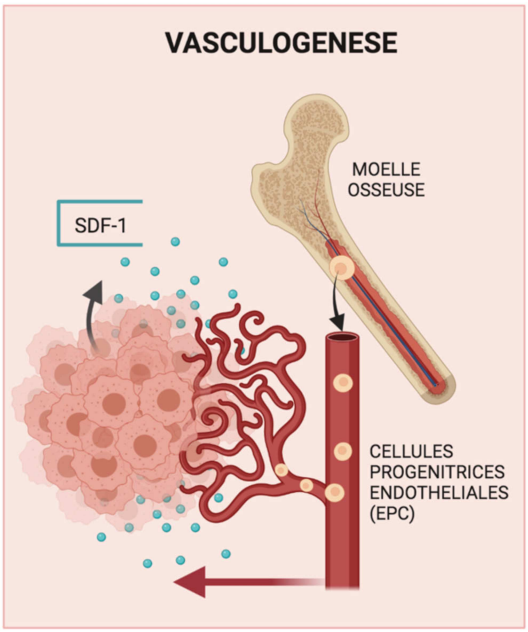


Figure 38 : Phénomène de vasculogénèse

De plus, le recrutement des EPC est plus prononcé dans les tumeurs enrichies en cellules souches de glioblastome que dans les autres tumeurs (Folkins et al. 2009).

Enfin, bien qu'il semble que la vasculogenèse ait une contribution modeste à la vascularisation tumorale, le recrutement des EPC est amélioré lorsque l'angiogenèse est tenu en échec par un traitement anti-angiogénique ou une radiothérapie (Brown et al. 2014).

Le mimétisme vasculaire

Le mimétisme vasculaire est l'un des modes de vascularisation des tumeurs cérébrales les plus intéressants et de plus en plus étudié (Figure 39). Dans ce processus, les cellules tumorales forment elles-mêmes des réseaux fonctionnels ressemblant à des vaisseaux dans un mécanisme alternatif pour soutenir la croissance tumorale et leur survie indépendamment du facteur VEGF. Pour cela, les cellules cancéreuses ou les cellules souches contribuent à la formation de structures fonctionnelles de type tubulaire. La capacité des cellules souches cancéreuses à se transdifférencier vers des cellules de type péricytes ou de cellules endothéliales est l'un des éléments clés du mimétisme vasculaire (Rosinska et. Gavard 2021).

Fait intéressant, les tumeurs avec des signes de mimétisme vasculaire présentent un grade, une agressivité plus élevée et une résistance marquée à la radiothérapie. En conséquence, les patients avec des tumeurs qui mettent en évidence un mimétisme vasculaire présentent une survie globale réduite par rapport à ceux qui ont des tumeurs qui ne facilitent pas ce processus. Pourtant, ces tumeurs possèdent une densité microvasculaire inférieure aux autres, ce qui suggère que ce processus fournit un mécanisme alternatif ou complémentaire aux modes traditionnels de néovascularisation (Liu et al. 2011 ; Kane et al. 2019)

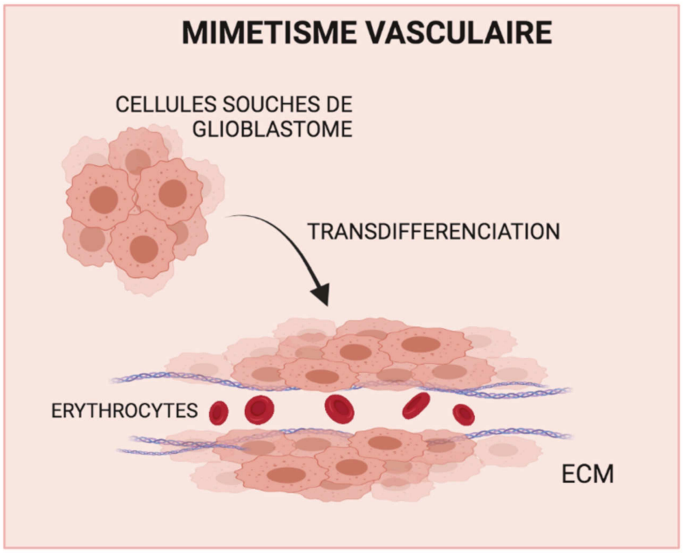


Figure 39 : Phénomène de mimétisme vasculaire

iii) Thérapies ciblant les vaisseaux sanguins

Après avoir détaillé les agents thérapeutiques ciblant les cellules tumorales et les macrophages, une autre approche a été de cibler les vaisseaux sanguins qui soutiennent directement la croissance tumorale et participent à l'invasion et à la dissémination des cellules cancéreuses. Cela est d'autant plus pertinent que le glioblastome est un des cancers les plus fortement vascularisés.

La première stratégie anti-angiogénique proposée consiste à inhiber la croissance des vaisseaux tumoraux en bloquant la signalisation VEGF/VEGF-R dans le glioblastome. Parmi l'arsenal thérapeutique on retrouve l'anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF-A, le Bevacizumab, commercialisé sous le nom d'Avastin® (Cohen et al. 2009). L'anticorps a d'ailleurs été approuvé aux États-Unis par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement du glioblastome. En revanche, l'Agence Européenne du médicament (EMA) a

refusé à plusieurs reprise cette demande. Malgré tout, le bevacizumab reste utilisé dans de nombreux pays européens en particulier dans les stades avancés de la maladie (Winkler et al. 2018). Généralement administré dans les GBM récidivants, il a pu être démontré que le Bevacizumab améliorait la survie sans progression (SSP) et la qualité de vie des patients atteints de GBM. Malheureusement ce traitement échoue à prolonger la survie globale des patients (Rosinska et al. 2021). En réalité, il est intéressant de noter que le traitement n'a bénéficié qu'à un sous-ensemble de patients atteints de GBM. En effet, des essais récents ont confirmé que les effets de la thérapie anti-VEGF peuvent dépendre du sous-type de glioblastome et des mutations génétiques associées.

Afin de comprendre les améliorations transitoires de cette thérapie, il est important de noter l'incapacité d'ajuster finement la thérapie anti-VEGF/VEGFR. En effet, le traitement entraine une augmentation des zones hypoxiques et donc des mécanismes de résistance dépendants de l'hypoxie qui conduisent finalement à une rechute du GBM (Rivera et al. 2015, De Vleeschouwer et al. 2017). De plus, des études chez la souris tendent à montrer que le schéma thérapeutique anti-VEGF semble favoriser la transition mésenchymateuse des cellules de gliome, qui présentent une migration plus élevée, ainsi qu'une infiltration et une inflammation élevée dans la masse tumorale (Piao et al. 2013). La résistance observée pourrait également provenir de la plasticité cellulaire élevée des cellules souches, comme en témoignent leurs capacités de transdifférenciation en cellules endothéliales et péricytes, un processus qui ne repose pas sur la signalisation VEGF.

Cela complexifie davantage le développement de thérapies anti-angiogéniques car comme nous l'avons vu précédemment certains processus de néovascularisation dans le glioblastome tels que la co-option des vaisseaux et la vasculogenèse sont largement indépendants du VEGF et donc insensibles au Bevacizumab.

D'autres inhibiteurs et anticorps ciblant le VEGF et le VEGFR sont cependant toujours à l'étude et font actuellement l'objet d'essais cliniques (Ahir et al. 2020 ; Rosisnka et al. 2021)

Chapitre 3 : Les modèles *in vitro* et *in vivo* utilisés pour l'étude du glioblastome et de son microenvironnement

Afin d'étudier le glioblastome de nombreux modèles ont été mis au point et sont utilisés par la communauté scientifique. Parmi les modèles disponibles, on compte les modèles in vitro et les modèles in vivo. En fonction de la question biologique posée, certains seront plus adaptés que d'autres. Ces modèles complémentaires seront tour à tour détaillés dans ce troisième chapitre. L'accent sera mis en particulier sur le modèle du poisson zèbre utilisé au cours de la thèse.

A) Modèles *in vitro* & *in vivo*

1) Modèles *in vitro*

i) Modèles 2D & 3D

Parmi les modèles disponibles pour étudier le glioblastome, les modèles *in vitro 2D et 3D* restent largement utilisés. Ces modèles reposent principalement sur l'utilisation de cellules cancéreuses **primaires** (directement issues de patients) ou **immortalisées**.

Les cellules primaires dérivées de patients peuvent être maintenues soit en suspension, soit en culture adhérente sur laminine (Galli et al., 2004 ; Hemmati et al., 2003 ; Pollard et al., 2009 ; Singh et al. al., 2003). Celles-ci conservent la génétique et l'état transcriptionnel de la tumeur parentale, contrairement aux lignées cellulaires « classiques » cultivées dans du sérum (Lee et al., 2006).

Même si elles sont moins physiologiques que les lignées primaires, **les lignées immortalisées** constituent le matériel de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le cancer. Parmi les lignées humaines les plus utilisées *in vitro*, on retrouve les lignées U87, T98G, U251 (Robertson et al. 2019). Ces lignées commerciales présentent de nombreux avantages. D'une part, leur faible coût et leur facilité d'utilisation en font un modèle facile à manipuler. De plus, ces lignées ne posent aucun problème éthique et sont très facilement disponibles contrairement aux tissus humains plus précieux. De plus, ces lignées sont idéales afin d'étudier l'effet de certaines voies de signalisations intracellulaires ou de protéines d'intérêts et peuvent être cultivées en modèle 2D ou 3D. Les cellules en monocouches adhérentes (ou culture 2D) présentent plusieurs avantages notamment un degré accru d'homogénéité, une facilité d'analyse par imagerie et la possibilité de développer une sous-population clonale (Figure 40).

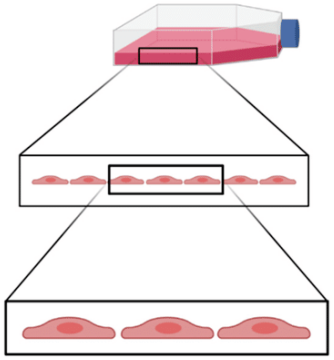


Figure 40 : Culture 2D (Saydé et al.2021)

Cependant, bien que les lignées cellulaires de gliome représentent actuellement un outil de référence pour la recherche sur les tumeurs cérébrales, ce modèle présente plusieurs inconvénients. Le risque principal en travaillant avec des cellules immortalisées en culture est qu'elles peuvent dériver génétiquement ou épigénétiquement au point d'être complètement différentes de la lignée originale (Robertson et al. 2019). De plus, ces lignées ont tendance à présenter des mutations qui ne sont pas retrouvées en clinique chez les patients (Desland et Hormigo 2020). Un examen attentif et des contrôles doivent donc être mis en place pour garantir la pertinence de toute nouvelle découverte. Cela peut passer par l'utilisation de plusieurs lignées de glioblastome simultanément, Enfin, les conditions de cultures (milieu, densité cellulaire, support) ont un impact non négligeable sur les cellules, ces conditions peuvent différer considérablement d'une étude à l'autre, rendant la comparaison des travaux plus difficile (Paolillo et al. 2021).

Progressivement, des **modèles 3D** ont fait leur apparition et ont été proposés (Figure 41). Plus physiologiques, ces modèles sphéroïdes sont formés de cellules agrégées qui n'adhèrent pas à une surface solide permettant aux cellules de proliférer librement en formant des amas cellulaires flottants. Ces modèles miniaturisent la tumeur *in vitro* en conservant l'architecture et l'organisation des cellules cancéreuses entre elles qui s'associent pour former une masse tumorale. Ce modèle *in vitro* présente de nombreux avantages par rapport aux cultures 2D. En effet, l'expression génique des cellules formant des sphéroïdes est presque identiques à la tumeur d'origine dont ils dérivent. De plus, l'interaction entre cellules cancéreuses est favorisée puisque les cellules s'agglomèrent entre elles. De même, de par la conservation de l'architecture, on retrouve au centre de la masse tumorale des régions hypoxiques et nécrotiques comme celles retrouvées en clinique. Enfin, grâce à ce modèle, l'effet de gradient est également préservé. Les cellules au centre du sphéroïde ne seront pas exposées à la même concentration de nutriments/traitement que celles situées en périphérie ce qui est aussi le cas *in vivo* (Hubert et al. 2016). Malheureusement, ces modèles *in vitro* qu'ils soient 2D ou 3D, ne prennent pas ou peu en compte l'importance du microenvironnement tumoral et en particulier des cellules non tumorales pourtant clés dans le devenir tumoral.

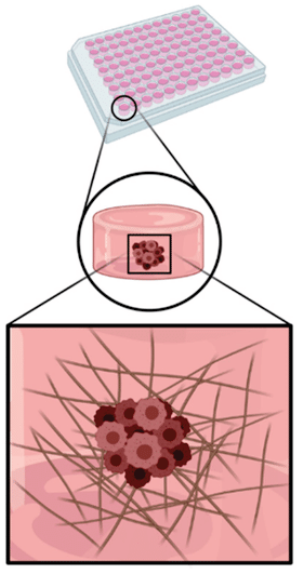


Figure 41: Culture 3D (Saydé et al. 2021)

C'est pour répondre à cette problématique que des modèles de **co-cultures** ont été développés. Pour cela, différents types cellulaires sont d'abord cultivées individuellement puis assemblés au sein de dispositifs micro-fluidiques, d'hydrogels ou de matrices solides

compatibles. Il est par exemple possible d'étudier les interactions entre macrophages/microglie et les cellules de glioblastome. Pour cela, des lignées humaines immortalisées existent telles que les HMO6 (Nagai et al. 2001), les THP-1 (Tsuchiya et al. 1980) et sont utilisées pour modéliser respectivement la microglie et les macrophages (Carson et al., 2008). D'autres études préconisent de se diriger vers des modèles organoïdes à partir de cellules souches pluripotentes humaines (hPSCs), de culture organotypique à partir de coupes de cerveau ou de xénogreffes (Lancaster et al., 2013).

En résumé, les cellules de glioblastome peuvent être cultivées à partir de cellules primaires ou immortalisés sous forme de cultures adhérentes, en suspension ou sous la forme d'organoïdes pour recréer des modèles 3D plus complexes. Le choix entre la culture de cellules en monocouche adhérente, en suspension sous forme de sphères ou d'organoïdes dépend des questions biologiques posées. Ces modèles sont relativement simples d'utilisation, peu couteux et permettent de limiter l'utilisation d'animaux. Cependant, même s'il existe des modèles 3D et de co-culture permettant d'étudier les interactions entre plusieurs populations cellulaires, ceux-ci sont limités et complexes à mettre en place. De plus, les modèles de culture cellulaire *in vitro* ne reflètent pas fidèlement les interactions hautement complexes de tous les composants du microenvironnement tumoral. De même, les interactions entre les cellules tumorales et non tumorales peuvent être considérées comme forcées et artificielles. Enfin dans ces différents modèles *in vitro*, l'importance de la barrière hémato-encéphalique n'est pas prise en compte alors qu'elle apparait comme déterminante dans le glioblastome. Par conséquent, les modèles *in vivo,* qui intègrent le glioblastome au sein d'un organisme entier, apparaissent comme essentiels pour faire avancer la recherche sur le glioblastome.

2) *Modèles in vivo utilisés pour l'étude du glioblastome*

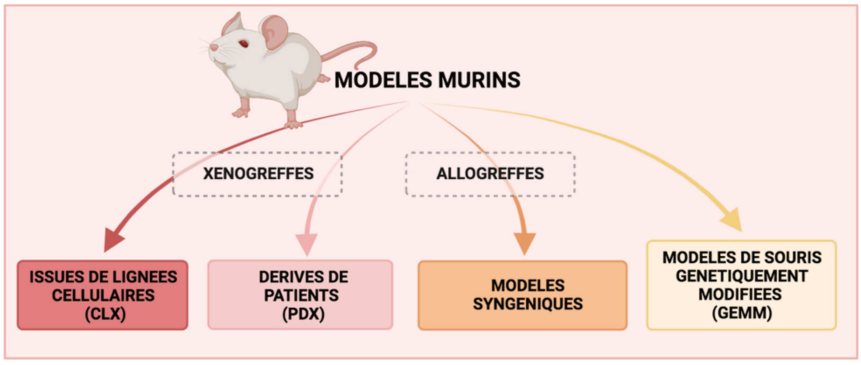


Figure 42 : Différents modèles murins

Comme nous l'avons vu précédemment les modèles *in vitro* de glioblastome présentent de nombreuses limites. En particulier quand il s'agit d'étudier les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules issues du microenvironnement tumoral comme la microglie ou les macrophages. Dans ce contexte, les modèles *in vivo* sont devenus essentiels. Parmi les modèles animaux utilisés en cancérologie, les modèles murins restent très utilisés. Généralement, ils peuvent être classés en 4 catégories : les xénogreffes issues de lignées cellulaires (CLX), les xénogreffes dérivées de patient (PDX), les modèles syngéniques et les modèles de souris génétiquement modifiées (GEMM) (Figure 42).

Les modèles de xénogreffes : CLX & PDX

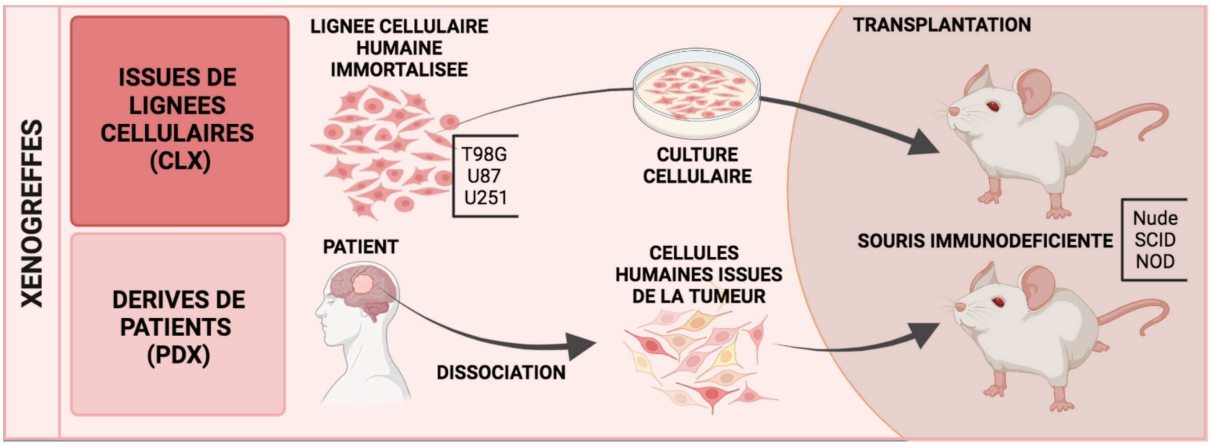


Figure 43: Xénogreffes CLX et PDX

Historiquement, les modèles de xénogreffe de gliome orthotopiques ont été créés avec des lignées cellulaires dérivées de patients ou des lignées cellulaires établies. Dans les modèles de xénogreffe de lignées cellulaires (CLX), les cellules de gliomes immortalisées les plus couramment utilisées pour l'implantation sont les mêmes que celles utilisées *in vitro*, à savoir les U87, U251, T98G et les A172 (Akter et al. 2021 ; Brighi et al. 2020)(Figure 43). Les xénogreffes de lignées cellulaires représentent une stratégie rapide et reproductible pour l'étude du glioblastome bien qu'elles se traduisent souvent par des tumeurs bien circonscrites et peu

hétérogènes (Akter et al. 2021 ; Brighi et al. 2020). Les modèles de xénogreffes dérivées de patients (PDX) impliquent la xénotransplantation de cellules issues de biopsie humaine (Figure 43). Ainsi, les cellules issues de patients ont l'avantage d'avoir été peu exposées à la culture *in vitro*, ce qui préserve les caractéristiques hétérogènes de la tumeur d'origine et évite l'adaptation des cellules à des conditions non physiologiques. De même, des travaux ont démontré que les modèles PDX récapitulent mieux les caractéristiques vasculaires et la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique des patients atteints de glioblastome par rapport aux tumeurs CLX dérivées de lignées cellulaires U87 (Hicks et Birds 2021). Ils sont également mieux adaptés pour restituer les interactions et le caractère invasif des tumeurs parentales que leurs homologues CLX.

Dans un cas comme dans l'autre, les cellules humaines doivent être implantées dans un hôte immuno-déficient (Souris Nude, NOD, SCID) afin d'éviter tout rejet de greffe. Ces souris ne présentent donc pas de lymphocytes T. Les populations macrophagiques et NK sont en revanche présentent dans les souris Nude.

Les modèles syngéniques

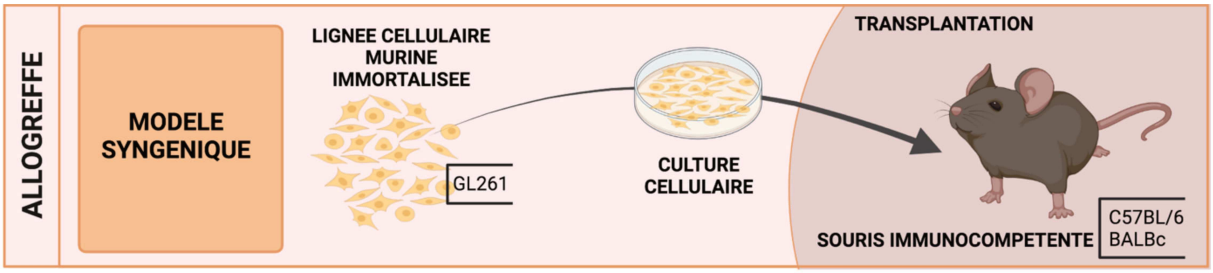


Figure 44 : Modèle syngénique

Historiquement, les modèles syngéniques ou allogreffes de gliome sont basées sur l'implantation de cellules murines de gliome dans des souris immunocompétentes. Les cellules de gliomes immortalisées murines les plus couramment utilisées pour l'implantation sont les GL261. Elles peuvent être introduites dans un organisme de la même espèce C57BL/6, BALBc et FVB/N qui sont les espèces de souris les plus couramment utilisées dans les modèles syngéniques (Maes et Van Gool, 2011) (Figure 44).

Les modèles de souris génétiquement modifiées (GEMM).

Les modèles de souris génétiquement modifiées (GEMM) reposent sur la manipulation du génome de la souris pour induire la formation de tumeurs spontanées (Richmond et al. 2008) (Figure 45). Ils sont fréquemment conçus avec des cellules souches de souris similaires à celles utilisées dans les modèles syngéniques (C57BL/6 ; BALB/C ; FVB/N). Grâce aux outils génétiques disponibles, il est ainsi possible de contrôler précisément les événements

moléculaires conduisant à la formation de la tumeurs grâce à l'activation d'oncogènes spécifiques.

Ainsi, les GEMM possèdent de nombreux avantages comparés aux autres modèles murins disponible. Premièrement ils permettent d'étudier la physiopathologie de certains sous-types de GBM. De plus, certains modèles transgéniques disponibles expriment le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) mutant dans les cellules gliales sur un fond génétique déficient en suppresseur de tumeur (Holland et al., 1998). Deuxièmement, contrairement aux xénogreffes, les souris utilisées peuvent être immunocompétentes. De ce fait, la présence du système immunitaire intact (lymphocytes T, B) et le maintien de l'architecture tumorale native permet d'étudier le microenvironnement tumoral dans sa globalité.

En revanche, le modèle possède certains inconvénients qui limitent son utilisation. D'une part, les altérations génétiques nécessaires pour générer spontanément des tumeurs peuvent interférer avec la lymphopoïèse et l'expansion clonale, processus nécessaires à la fonction immunitaire de l'hôte (Sughrue et al., 2009). D'autre part, un grand nombre d'animaux sont nécessaires pour générer suffisamment de tumeurs pour l'expérimentation (Oh et al., 2014). Enfin, l'incapacité de récapituler l'hétérogénéité intra-tumorale des gliomes a rendu difficile l'utilisation des GEMM pour la modélisation *in vivo* des gliomes. Ainsi, bien que les tumeurs spontanées chez les hôtes immunocompétents soient plus physiologiques que certains autres modèles murins (Oh et al., 2014), le modèle est rarement utilisé seul.

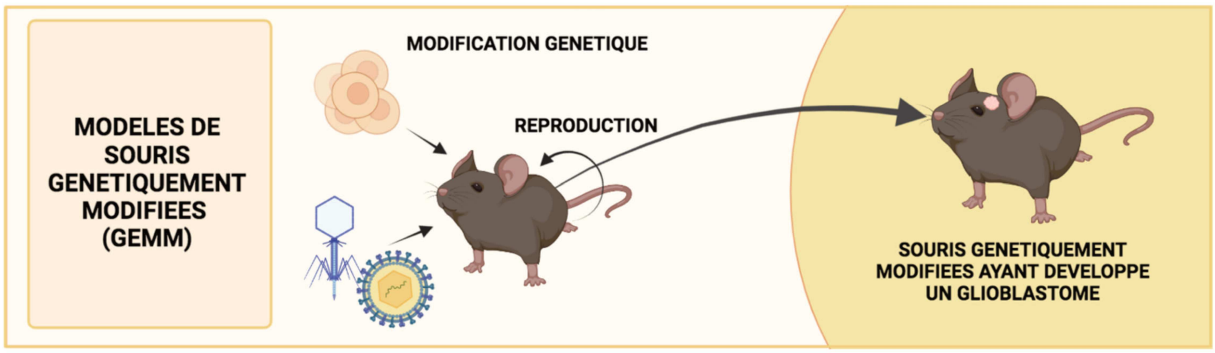


Figure 45: Modèle de souris génétiquement modifiées (GEMM)

En conclusion, les modèles murins de gliome offrent des avantages substantiels par rapport aux modèles *in vitro* basés sur la culture cellulaire 2D et 3D. Leurs caractéristiques génétiques, morphologiques et immunologiques les rapprochent des tumeurs humaines observées en clinique. Cependant, ces modèles sont complexes, longs et coûteux à mettre en place. C'est pour répondre à cette problématique que le modèle du poisson-zèbre s'est largement développé en cancérologie.

B) Le modèle zebrafish : un outil pertinent pour l'étude du glioblastome et son microenvironnement tumoral en temps réel

1) Présentation générale du modèle

i) Avantages du modèle

Le poisson zèbre (*Danio rerio* en latin) est un vertébré qui appartient à la famille des Cyprinidés. Il s'agit d'un petit poisson d'eau douce mesurant 2 à 3 centimètres à l'âge adulte, originaire d'Asie qui tient son nom de ses rayures horizontales qui recouvrent son corps. S'il est autant utilisé en recherche, c'est grâce à ces caractéristiques uniques qui en font un animal de laboratoire idéal (Hason et Bartůněk 2019) (Figure 46).

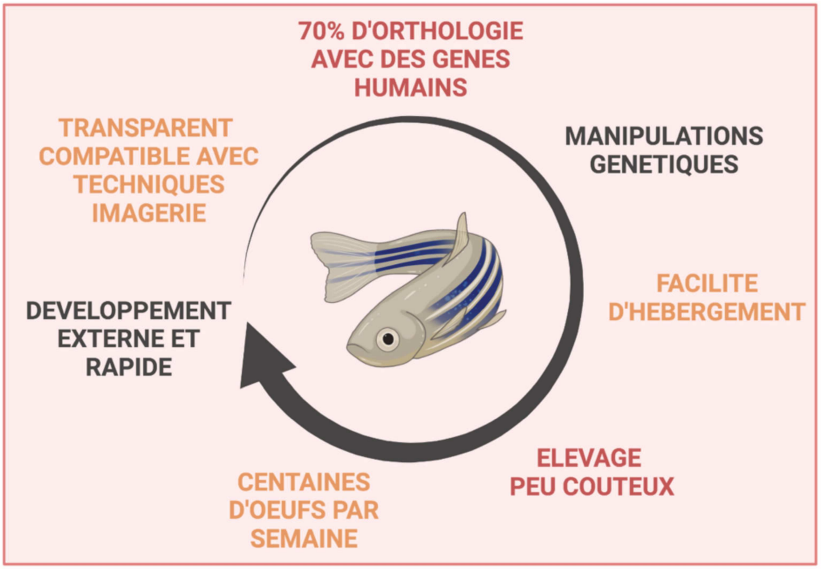


Figure 46 : Avantages du modèle poisson-zèbre

D'une part, son élevage est très facile et peu coûteux. En effet, du fait de sa petite taille, la place nécessaire et la quantité de nourriture sont réduites. Ainsi, le poisson zèbre peut être élevé et maintenu dans des systèmes d'aquarium haute densité à 28°C ce qui minimise les coût d'hébergement par rapport aux animalerie classiques de type rongeur.

D'autre part, un couple de poissons adultes peut donner plusieurs centaines d'œufs chaque semaine. Les études réalisées sur l'embryon dans une intervalle d'une semaine permettent ainsi de. réaliser des analyses à haut débit avec une puissance statistique significative. Comme de nombreuses autres espèces, le poisson-zèbre a un développement externe, ce qui en fait un candidat idéal pour les études de développement. De plus, son développement est rapide puisqu'au cours des cinq premiers jours de vie, tous les organes principaux sont développés et pour la plupart déjà fonctionnels. D'ailleurs à ce stade l'embryon de poisson zèbre est transparent et la formation de pigment peut être inhibée grâce à l'utilisation précoce de phénylthiourée (PTU), un inhibiteur de la synthèse de mélanine. Ainsi, diverses techniques d'imagerie haute résolution peuvent être utilisées dès les premiers stades de développement afin de suivre en temps réel de nombreux processus cellulaires.

Enfin au niveau biochimique et génétique, le génome du poisson zèbre a été séquencé. Il a ainsi pu être démontré que le poisson zèbre partageait 70 % des gènes humains et au moins un orthologue du poisson zèbre a été identifié dans 82 % des gènes liés aux maladies humaines (Howe et al., 2013). Cependant, de nombreux gènes ont été dupliqués au cours de l'évolution du poisson zèbre, 15% des gènes humains ont d'ailleurs plusieurs orthologues (Howe et al., 2013). Enfin, le large éventail de possibilités en termes de manipulations génétiques classe ce modèle vertébré parmi les outils les plus remarquables pour l'étude de nombreuses pathologies humaines, y compris en oncologie.

ii) Les différents stades de développement du poisson zèbre

L'embryogenèse du poisson zèbre partage de nombreuses similitudes avec les vertébrés supérieurs, y compris avec les humains et d'autres mammifères. Les principales étapes du développement embryonnaire du poisson zèbre ont été bien caractérisées et décrites grâce à des techniques d'imagerie non invasives (Figure 47) (Kimmel et al., 1995).

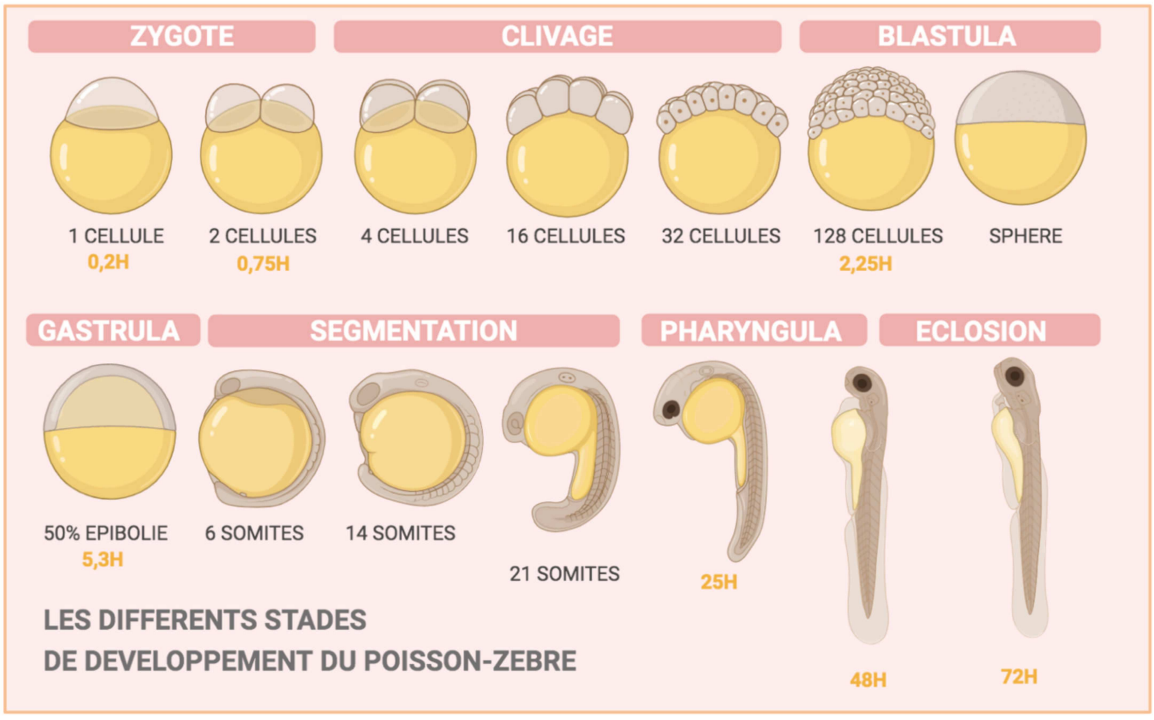


Figure 47 : Les différents stades de développement du poisson zèbre

Le développement précoce du poisson zèbre peut être divisé en plusieurs grandes étapes : période zygote (0-0,75h), période de clivage (0,75-2,25h), blastula (2,25-5,25h), gastrula (5,25-10h), segmentation (10h-24h), pharyngula (24-48h) et période d'éclosion (48-72h). Les premières périodes sont représentées sur la figure ci-dessus. La période de segmentation consiste en la somitogenèse. Le corps commence à se former et les organes primaires se développent notamment le système nerveux et cardiovasculaire. Pendant la

période du pharyngula (24-48h), l'embryon continue à s'allonger. Les organes commencent à être fonctionnels et la circulation sanguine se met en place dès 25 heures. Au cours de la période d'éclosion (48-72h), les organes continuent à se développer, les premiers cartilages et os se forment. C'est aussi le moment de l'éclosion des embryons à partir de leurs chorions (Kimmel et al., 1995). Un avantage non négligeable du poisson zèbre est qu'il est possible d'accélérer ou de ralentir le développement embryonnaire en faisant varier la température lors du développement. Ainsi, alors que le développement standard est mesuré autour de 28°C, une augmentation de la température à 33°C accélère le développement de 25% et une diminution de la température à 24°C ralentit son développement de 25% (Kimmel et al., 1995).

iii) Développement du système immunitaire du poisson zèbre

Il existe de nombreuses similitudes concernant le développement du système immunitaire et l'hématopoïèse embryonnaire entre le poisson zèbre et les mammifères. Chez le poisson zèbre l'hématopoïèse embryonnaire se déroule principalement en deux vagues successives provenant d'emplacements anatomiquement distincts (Bertrand et al., 2007). L'hématopoïèse primitive a lieu au début du développement embryonnaire et conduit à la génération de populations de cellules érythroïdes et myéloïdes primitives. Plus tard au cours du développement, l'hématopoïèse définitive génère des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPC) qui sont responsables de la génération de toutes les cellules sanguines adultes (Figure 48). Bien que les sites anatomiques de l'hématopoïèse soient différents chez le poisson zèbre par rapport aux mammifères, les mécanismes moléculaires à l'origine de l'hématopoïèse quant à eux sont hautement conservés (Gore et al. 2018).

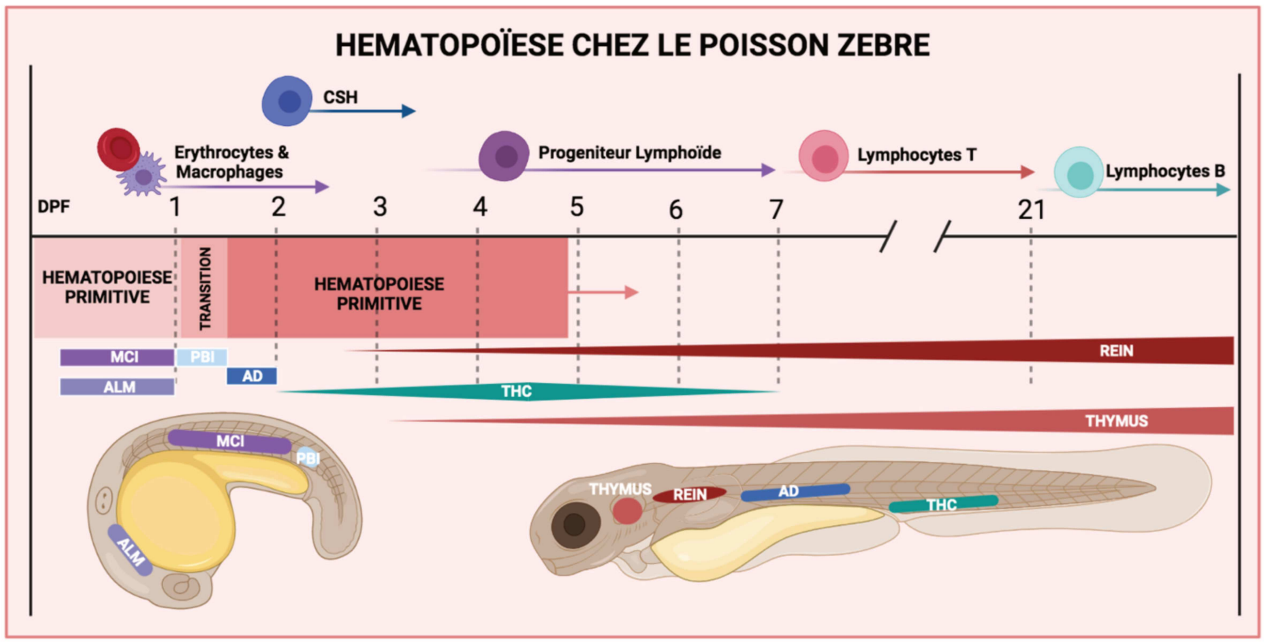


Figure 48 : Hématopoïèse chez le poisson zèbre

La vague primitive d'hématopoïèse a lieu autour de 12-18 hpf chez le poisson zèbre et prend place à deux endroits distincts, dans les îlots sanguins dits de masse cellulaire intermédiaire (MCI) et dans les îlots de sang rostral (Detrich et al. 1995). L'ICM est situé sous la notocorde, entre les somites et au-dessus du sac vitellin. Les érythrocytes primitifs se forment puis pénètrent ensuite dans la circulation avec le début de la circulation à 25 hpf et sont essentiels à la survie de l'embryon. Les macrophages et les neutrophiles primitifs proviennent quant à eux des îlots de sang rostral et génère des macrophages primitifs, la microglie embryonnaire et les neutrophiles (Bennett et al 2001 ; Lieschke et al. 2002). Les macrophages et les neutrophiles primitifs migrent ensuite vers le sac vitellin et colonisent tout l'embryon pour assurer le remodelage tissulaire et l'immunité innée (Herbomel et al., 1999). Chez les mammifères la vague primitive a lieu dans le sac vitellin.

L'hématopoïétique définitive a lieu dans l'Aorte gonade mesonephros (AGM) comme dans les embryons de mammifères et d'autres vertébrés. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) émergent de la paroi ventrale de l'aorte dorsale (AD) par un processus dynamique appelé transition endothéliale-hématopoïétique et décrit pour la première fois dans l'embryon de poisson zèbre (Bertrand et al., 2010a ; Kissa et Herbomel 2010). Une fois détachés, les HSPC entrent dans la circulation et persisteront jusqu'à l'âge adulte en tant que progéniteurs multipotents de tous les types de cellules sanguines adultes. Les HSPC ensemencent ensuite trois organes hématopoïétiques principaux, le tissu hématopoïétique caudal (THC) à 2 dpf, le thymus à 3 dpf et la moelle rénale à 4 dpf. Les HSPC intégrées dans le THC serviront de source de macrophages embryonnaires, de neutrophiles et de monocytes. Le rein qui correspond à la moelle osseuse des mammifères, produira des lignées myéloïde, érythroïde et lymphoïde, laissant le thymus produire des cellules T lymphoïdes matures tout au long de l'âge adulte (Gore et. al 2018). Malgré cette divergence anatomique, les molécules de signalisation, les facteurs de transcription et les programmes génétiques contrôlant la machinerie hématopoïétique définitive sont hautement conservés entre le poisson zèbre et les mammifères

La microglie et ses origines chez le poisson zèbre

Des études récentes chez le poisson zèbre indiquent que la microglie embryonnaire et adulte ont deux origines différentes. Alors que la formation de la microglie embryonnaire se produit au cours de l'hématopoïèse primitive, la microglie adulte provient de la paroi ventrale de l'aorte dorsale (Xu et al., 2015, Ferrero et al., 2018).

Concernant la première population qui donnera la microglie embryonnaire, dans les 24 heures après la fécondation (hpf) les pré-macrophages sont accumulés dans le sac vitellin et commencent à présenter une morphologie de type macrophage (Herbomel, Thisse, & Thisse, 1999). Ces derniers migrent ensuite à travers les tissus du poisson zèbre et en particulier dans le

mésenchyme de la tête entre 23 et 30 hpf. Ils commencent à coloniser le cerveau lui-même autour des 35 hpf (Herbomel, Thisse et Thisse, 2001). A 48 hpf, les jeunes macrophages sont détectés dans le cerveau antérieur, le mésencéphale et le cerveau postérieur. A 60 hpf le nombre de macrophages spécifiquement dans le tectum optique augmente, ce qui coïncide avec la différenciation de la microglie précoce. L'expression de l'apolipoprotéine E (apoE) en plus de la morphologie caractéristique, confirme que ces cellules ont acquis un phénotype de microglie à 72 hpf (Herbomel et al., 2001). Entre 3 et 5 dpf, la microglie présente une motilité élevée et un phénotype amoeboïde phagocytaire. A 5 dpf, la motilité de la microglie ralentit et les cellules commencent à adopter un phénotype ramifié. Cependant, ils continuent à se transformer entre les phénotypes amoeboïde et ramifié jusqu'à 10 dpf (Svahn et al., 2013). Pendant ce temps, la microglie du poisson zèbre forme des contacts directs avec les neurones et les vaisseaux sanguins en développement ainsi que les uns avec les autres (Svahn et al., 2013). Une deuxième augmentation de la microglie tectale est observée à partir de 15 dpf, ce qui peut être dû aux cellules microgliales en division et à l'infiltration d'une nouvelle population cellulaire dérivée de la paroi ventrale de l'aorte dorsale qui correspond à la microglie adulte (Svahn et al., 2013 ; Xu et al., 2015).

2) *Intérêt du poisson zèbre en oncologie*

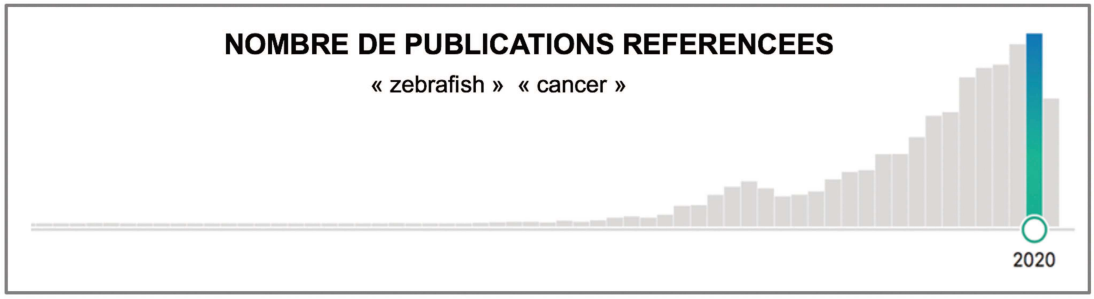


Figure 49 : Evolution du nombre de publications

Comme nous l'avons vu, les caractéristiques intrinsèques du poisson zèbre en font un modèle particulièrement intéressant en recherche pour étudier de nombreuses pathologies humaines en particulier en cancérologie. D'ailleurs une recherche sur Pubmed (NCBI), permet de constater que le nombre d'articles scientifiques mentionnant « Zebrafish » et « cancer » a explosé. En 10 ans, le nombre d'articles référencés a augmenté de 3,5 fois passant de 178 articles référencés en 2010 à près de 633 en 2020 (Figure 49).

Mais comment expliquer cet intérêt grandissant pour le modèle du poisson zèbre en cancérologie ?

Bien que les systèmes *in vitro* pour la recherche sur le cancer aient connu des avancées significatives, les modèles *in vivo* sont essentiels car ils sont les seuls permettant de mimer le microenvironnement tumoral associées aux tumeurs humaines. Dans cette optique, le poisson zèbre est rapidement apparu comme un modèle alternatif aux modèles murins en devenant de plus en plus utilisés pour la recherche sur le cancer et le criblage de nouveaux médicaments. Outre, le développement rapide de l'embryon, sa petite taille, sa transparence, son degré d'homologie avec l'homme et ses avantages éthiques et économiques d'autres avantages ont permis au poisson zèbre de se démarquer de tous les autres modèles *in vivo* disponibles en cancérologie.

D'une part, le modèle permet de visualiser et de suivre en temps réel des populations cellulaires spécifiques grâce à des techniques d'imagerie. En effet, il existe de **nombreuses lignées transgéniques rapportrices** disponibles permettant **d'étudier le microenvironnement tumoral**. Il existe par exemple des lignées fluorescentes marquant les macrophages, les neutrophiles, les cellules endothéliales vasculaires. Il est ainsi possible de réaliser des croisements entre différentes lignées transgéniques pour étudier de manière simultanée plusieurs population d'intérêts au sein d'un même embryon.

D'autre part, bien que l'imagerie *in vivo* de tumeurs fluorescentes greffées ait été réalisée sur des mammifères (Hoffman et al. 2002), elles n'offrent pas l'imagerie à haute résolution qui peut être réalisée sur des embryons de poisson zèbre. En effet, ce modèle **permet**

de suivre quotidiennement les cellules tumorales injectées et d'étudier de nombreux processus cellulaires comme la transition épithélio-mésenchymateuse, la prolifération tumorale ou la dissémination métastatique. Tout cela en suivant individuellement chaque individu. Il est également possible de visualiser les contacts cellulaires et d'étudier les interactions complexes entre les cellules tumorales et cellules du microenvironnement comme les macrophages ou la microglie qui nous l'avons vu jouent un rôle clé dans la progression tumorale. L'observation et la visualisation directe revêt un avantage majeur, car elle ne nécessite pas de procédé invasif ou de sacrifice de l'embryon.

Concernant les similarités entre le poisson-zèbre et l'homme en cancérologie, de **nombreux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur** trouvés chez les souris et les humains sont **conservés chez le poisson zèbre**, notamment les membres de la famille Myc, Ras, Notch, P53, Mdm2, Pten et Bcl-2 (Gutierrez et al. 2011 ; Langenau et al, 2003. ; Den Hertog, 2016 ; Langheinrich et al. 2002 ; Schreiber-Agus et al. 1993, ; Berghmans et al., 2005). Il est ainsi possible de générer des lignées transgéniques induisant des tumeurs y compris de glioblastome.

Un autre point à noter concerne le développement de l'immunité adaptative chez le poisson zèbre. Dans ce dernier, le système immunitaire inné et adaptatif sont temporellement découplés. En effet, pendant les premières semaines de vie, les larves de poisson zèbre ne survivent qu'avec le système immunitaire inné (Novoa et Figueras, 2012). Ce n'est qu'après 4 à 6 semaines après fécondation que le système immunitaire adaptatif devient mature et que les lymphocytes sont fonctionnels (Novoa et Figueras, 2012, Davidson et Zon, 2004). Par conséquent, **ce découplage temporel permet d'étudier *in vivo* les réponses immunitaires innées indépendamment de la réponse immunitaire adaptative** (Hamilton et al., 2016, Tsarouchas et al., 2018, Novoa et Figueras, 2012, Renshaw et al., 2007). Cela est particulièrement intéressant en cancérologie au stade embryonnaire où l'immaturité du système immunitaire adaptatif du poisson zèbre permet d'éviter les rejets après transplantation de cellules cancéreuses humaines. Ainsi, la xénotransplantation dans les premiers stades de vie ne nécessite pas d'immunosuppression.

Un autre avantage non négligeable du modèle concerne la xénotransplantation. En raison de la taille de l'embryon, **la quantité de cellules cancéreuses humaines nécessaires lors de la transplantation est très faible**. Seules quelques dizaines de cellules cancéreuses sont transplantées par embryon (Konantz et al. 2012). Cela est particulièrement adapté pour les échantillons précieux issus de patients (PDX).

Enfin, le modèle est particulièrement utile pour le **criblage à haut débit de molécules anticancéreuses.** En effet, les larves peuvent absorber des composés de faible poids moléculaire solubilisés dans l'eau dans lesquelles elles sont baignées. Leur petite taille permet d'imager 96 embryons de poisson-zèbre simultanément sous un microscope et suivre

l'évolution de 96 tumeurs. Cela permet une évaluation rapide quant à la toxicité et l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques (Terriente & Pujades, 2013 ; Eden et al., 2015, Welker et al., 2016).

De plus, la pression de groupes anti-vivisection et la lourdeur de la règlementation liée à l'utilisation de modèle murin en laboratoire a également incité de nombreux groupe à adopter le modèle poisson zèbre.

En conclusion, le poisson zèbre s'est avéré être un excellent outil pour faire progresser notre compréhension de la biologie du cancer tout en permettant de cribler de nouveaux composés anticancéreux.

3) Le poisson-zèbre, un modèle fiable pour l'étude du glioblastome et de son microenvironnement

Pour l'étude du glioblastome, le modèle est particulièrement puissant et pertinent. En effet, l'homme et le poisson zèbre partagent de nombreuses caractéristiques anatomiques et physiologique communes au niveau du cerveau. D'une part les grandes structures du cerveau humain ont été identifiées dans le cerveau du poisson zèbre comme le cervelet, le télencéphale, le diencéphale et la moelle épinière (Schmidt et al., 2013, Garcia et al., 2016). De même les principaux circuits de neurotransmetteurs glutamatergiques excitateurs et inhibiteurs GABAergiques (Rico et al. 2011) ainsi que les récepteurs cholinergiques (Park et al. 2008) sont conservés (Schmidt et al., 2013). La similitude persiste au niveau cellulaire, car de nombreux types cellulaires sont similaires entre les deux espèces tels que les astrocytes (Kawai et al. 2001), la microglie (Peri et al. 2008) et les oligodendrocytes (Yoshida et al. 2005), Enfin, la différenciation, la connectivité, les voies de signalisation et les modèles d'expression génique, sont hautement conservés entre les deux espèces (Saleem et Kannan et al. 2008).

Ainsi, la conservation des principales subdivisions cérébrales de cette espèce et la facilité de réaliser des transplantations, permet aux chercheurs d'étendre considérablement notre compréhension du microenvironnement tumoral associé au glioblastome. De même que pour les modèles murins précédemment détaillés, il existe deux approches principales afin de modéliser le glioblastome dans le poisson zèbre. La première repose sur la génération de lignées génétiquement modifiées, la seconde repose sur les xénogreffes de cellules tumorales humaines.

i) Lignées transgéniques disponibles

Plusieurs approches génétiques allant de mutations ciblées à une régulation transitoire ou stable des gènes d'intérêt permettent de modéliser le glioblastome chez le poisson zèbre. Pour cela, différents systèmes ont été explorés et validés comme les systèmes CRISPR/Cas9, Tol2 et Gal4/UAS utilisés avec succès dans de nombreuses études (Chia K et al. 2018 ; Ju B et al. 2009 ; Mayrhofer el al. 2017).

La première stratégie repose sur l'expression transgénique d'oncogènes humains et murins chez le poisson zèbre comme KRAS (Ju. B. et al. 2015), HRAS et BRAF (Mayrhofer et al., 2017) qui conduisent au développement de tumeurs cérébrales spontanées.

Ainsi chez le poisson zèbre, Ju et. al. en 2015 ont pu montrer que la surexpression transgénique transitoire de **KRAS^{G12V}** dans les cellules souches et/ou progénitrices neurales conduit à la formation de tumeurs malignes dans la cavité crânienne et de tumeurs cérébrales parenchymateuses en fonction du promoteur neural choisi (figure 50). Lorsqu'il est exprimé sous le contrôle du promoteur du gène krt5, KRAS^{G12V} induit des tumeurs cérébrales dans les zones ventriculaires (figure 50 C' et D') en revanche, lorsqu'il est exprimé sous le contrôle du promoteur du gène gfap, KRAS^{G12V} induit des tumeurs cérébrales à la fois dans les zones ventriculaires et le parenchyme cérébral (figure 50 E et E'). Dans ce contexte des analyses immunohistochimiques ont indiqué une activation importante de la voie canonique RAS/RAF/ERK et de la voie mTOR (Ju B et. al. 2015).

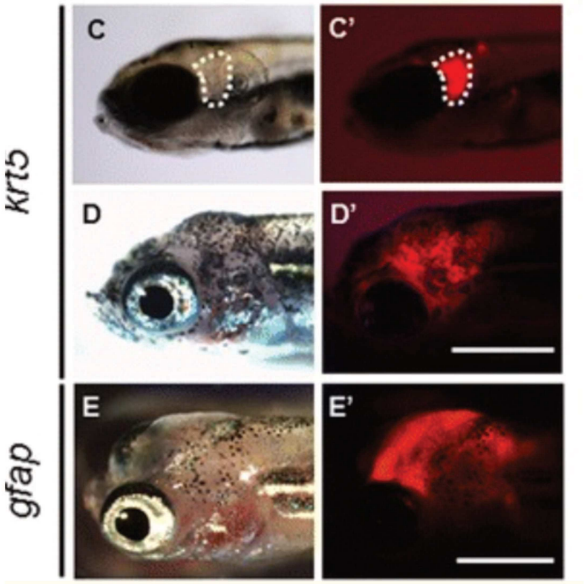


Figure 50 : L'expression de KRAS induit la formation de tumeurs cérébrales. L'expression de KRAS est visualisée en rouge dans le cerveau à différents temps sous le contrôle des promoteurs krt5 et gfap. (C) Embryon âgé de 9 jours. (D,E) Poisson âgé de 2 mois. Echelle : 0.5 cm. (Ju et al. 2015)

Dans le même esprit, Mayrhofer et al. ont pu étudier l'activation de nombreux oncogènes comme **HRAS^{G12V}, YAP^{S5A}, KRAS^{G12V}, AKT, EGFRvIII et BRAF^{V600E}** dans les cellules neurales au cours du développement. Ils ont ainsi pu démontrer que tous ces oncogènes sont capables d'induire la formation de tumeurs *in vivo*. Enfin, en plus de ces oncogènes, d'autres gènes et protéines ont également pu être ciblées comme **Smoa1/AKT1** (Ju B et al 2009) ; **ptf1a/Rac1/Akt1** (Jung et al. 2013) ; **AKT1/cxcr4** (Chia et al 2018) **nf1a/nf1b** (Shin J. et al. 2012).

Enfin, il est également possible d'effectuer des modifications génétiques transitoires chez le poisson zèbre via l'utilisation de morpholinos (MO). Les morpholinos sont des oligonucléotides anti-sens les plus largement utilisés pour étudier la fonction spécifique d'une protéine d'intérêt. Par leur structure complémentaire, ceux-ci vont se fixer sur un ARNm cible et bloquer la traduction ou le processus d'épissage alternatif. Cela aboutit à l'inactivation de l'expression de la protéine. Pour l'étude du glioblastome plusieurs morpholinos ont pu être utilisés notamment ciblant **Ephrin-B3/EphA4** (Royet A et al. 2017), **PlexA1** (Jacob et al. 2016) ou **PJA1** (Shin J et al. 2017). Ceux-ci ont permis d'élucider certains mécanismes moléculaires et de trouver de nouveaux marqueurs pronostiques et stratégies thérapeutiques.

En conclusion les modèles génétiquement modifiés du poisson zèbre ont été utilisés avec succès pour étudier les tumeurs cérébrales dès leurs premiers stades de développement.

Que ce soit via l'activation d'oncogènes ou la régulation transitoire ou stable de gènes/protéines d'intérêt, ces approches ont permis d'étudier l'effet de voies de signalisations pertinentes dans le gliome capables de jouer sur la progression de la maladie.

ii) Xénotransplantations

La seconde approche utilisée pour modéliser le glioblastome consiste à transplanter des cellules cancéreuses humaines marquées chez le poisson zèbre. Le modèle de xénotransplantation est devenu un modèle de choix pour étudier la croissance tumorale, l'invasivité, les processus d'angiogenèse ainsi que de la formation de métastases (Konantz et al., 2012 ; Veinotte, Dellaire et Berman, 2014). Même s'il n'existe pas de consensus ni de standardisation à l'heure actuelle, de nombreux protocoles de xénotransplantation ont été mis au point et explorés. Les nombreux points de variabilité entre les études concernent principalement le site d'injection, le stade de développement, les lignées cellulaires utilisées et la méthode de marquage de ces dernières.

Lignées cellulaires de glioblastome

Afin de modéliser le glioblastome, il convient de déterminer quelles cellules seront transplantées chez le poisson zèbre. La première option repose sur l'utilisation de lignées cellulaires immortalisées comme les U87, U251, U373, CF-STTG1 et D54-MG (Vargas-Patron et al. 2019 ; Yang et al. 2013 ; Hamilton et al. 2016 ; Breznik et al. 2017 ; Umans et al. 2020). La seconde option repose sur l'utilisation de cellules issues de patients (PDX).

Lignées de poisson zèbre utilisées & stades de développement

Afin de pouvoir suivre la prolifération tumorale et d'étudier le microenvironnement tumoral associé au glioblastome *in vivo*, il est nécessaire de maintenir la transparence de l'embryon tout au long de l'étude. Pour cela, deux stratégies ont été utilisées. La première repose sur l'utilisation de la lignée mutante *Casper*.

Il s'agit d'une lignée transgénique développée en 2008, qui démontre une absence totale de tous les mélanocytes et iridophores dans l'embryon et à l'âge adulte. Le corps du poisson est presque entièrement transparent ce qui facilite les observations microscopiques (Figure 51) (White et al. 2008). Cependant malgré ses avantages certains cette lignée est plus fragile et a rarement été utilisée dans les études de xénotransplantation (Corkery et al 2011, Eden et al 2015) en partie car les lignées transgéniques d'intérêt pour suivre les macrophages ou les cellules endothéliales vasculaires ont été générées sur fond *AB (WT) et* non *casper*. Ainsi, la stratégie privilégiée pour garantir la transparence du poisson dans les études de xénotransplantation repose sur un traitement chimique qui comprend l'utilisation de faibles concentrations de PTU (phénylthiourée), une molécule couramment utilisée en balnéation qui inhibe la synthèse de mélanine (Bohnsack et al. 2011).



Figure 51 : Mutants de pigmentation du poisson-zèbre. Dans l'ordre : poisson wild-type (WT), mutant nacre, mutant roy et mutant casper (White et al. 2008)

La question se pose quant au **stade de développement** optimal auquel transplanter le poisson zèbre. Même si la grande majorité des xénogreffes de poisson zèbre sont réalisées 2 à 3 jours après la fécondation (dpf), d'autres études de xénotransplantation ont été réalisées à un stade plus précoce (blastula) et plus tardif (chez le poisson adulte)

En effet, si la transplantation à 48h et 72h a été la plus largement reprise cela peut s'expliquer par plusieurs raisons. D'une part ce stade précoce permet d'injecter les cellules cancéreuses dans différents sites anatomiques y compris dans le cerveau puisqu'à ce stade ce dernier est déjà formé. D'autre part le système immunitaire adaptatif du poisson zèbre n'est pas encore mature ce qui évite les rejets de greffes. Enfin, la transplantation à ce stade donne des résultats rapides et reproductibles. Une autre approche de transplantation robuste, rapide et automatisable a récemment été rapportée par Pudelko et al. Celle-ci consiste à injecter des lignées cellulaires GBM au stade blastula. Ils ont ainsi pu observer que les cellules cancéreuses migraient dans le système nerveux en développement, établissant déjà une tumeur intracrânienne orthotopique 24h après l'injection (Pudelko et al. 2018). Cette approche évite la transplantation intracrânienne plus délicate des embryons. Enfin des greffes ont également été réalisées chez le poisson plus âgé à environ 30 jours (Eden et al 2015, Stoletov et Klemke 2008, Stoletov et al 2007). Malheureusement au stade juvénile le cerveau n'est pas aussi facilement imageable par microscopie que dans les embryons et les larves. De plus à ce stade l'utilisation d'un immunosuppresseur comme la dexaméthasone est requise pour éviter le rejet. Pour éviter cela, d'autres études chez le poisson zèbre adulte ont utilisé une lignée immunodéprimé transgénique (prkdc$^{-/-}$, il2rga$^{-/-}$) (Yan et al. 2019).

Sites d'injection des cellules tumorales

Bien que le site d'injection dépende du type cellulaire et du modèle de cancer à générer la plupart des implantations sont réalisées dans le sac vitellin, le canal de Cuvier ou l'espace périvitellin pour leur accessibilité et la possibilité de transplanter un grand nombre de cellules.

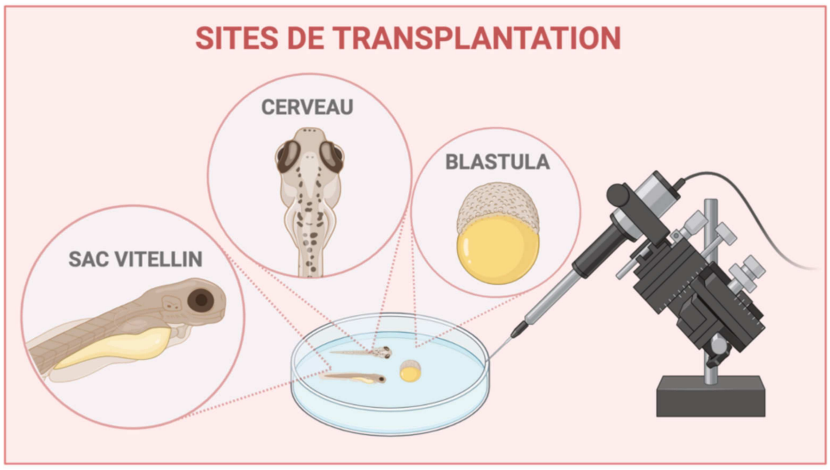


Figure 52 : Les différents sites de transplantation chez le poisson

Dans le cas du glioblastome, deux sites ont été privilégiés pour l'implantation des cellules cancéreuses : le sac vitellin et le cerveau (Figure 52) (Geiger et al 2008, Lally et al 2007, Yang et al 2013, Welker et al. 2017 ; Zeng et al. 2017 ; Vittori et al 2015, Hamilton et al. 2016).

Le sac vitellin est le premier site d'implantation à avoir été exploré (Geiger et al 2008, Lally et al 2007, Yang et al 2013). En particulier car il s'agit d'un site facilement accessible qui permet d'injecter un grand nombre de cellules. L'étude de l'angiogénèse est particulièrement simple dans cette zone. En revanche, elle présente des inconvénients notoires. D'une part, le sac vitellin se dégrade au bout de quelques jours ce qui limite les analyses. De plus, il s'agit d'un site peu physiologique pour implanter les cellules de glioblastome puisque le microenvironnement dans le sac vitellin y est très différent du microenvironnement cérébral. Enfin, la survie, la prolifération et l'invasion des cellules de gliome sont limitées dans cette zone contrairement à l'injection dans le cerveau.

L'implantation des cellules de glioblastome est apparue particulièrement pertinente dans le cerveau du poisson zèbre (Welker et al. 2017 ; Zeng et al. 2017 ; Kitambi et al 2014, Vittori et al 2015, Hamilton et al. 2016). En effet, le SNC commence à se former dès 9 heures après la fécondation et à 2 dpf, le cerveau est bien délimité. La probabilité de développer des tumeurs orthotopiques incite la plupart des chercheurs à injecter des cellules directement dans les ventricules, le mésencéphale ou à la limite du cerveau postérieur-mésencéphale. Étudier l'invasion cellulaire et la dissémination s'avère plus physiologique dans ce contexte car le microenvironnement y est particulièrement adapté. Il a d'ailleurs été démontré qu'une même lignée cellulaire (U87) n'était pas invasive dans le sac vitellin alors qu'elle l'était après implantation dans le cerveau (Lal et al 2011 ; Yang et al 2013, 2014 ; Vittori et al. 2014). Cela démontre que le choix du site d'implantation revêt une importance capitale pour la prolifération tumorale (Reimunde et al. 2021)

iii) Visualisation du microenvironnement tumoral dans le modèle zebrafish

Comme nous l'avons vu précédemment, un des avantages du poisson zèbre est qu'il existe de nombreuses lignées transgéniques qui permettent de visualiser des populations cellulaires clés du microenvironnement tumoral. En transplantant directement ces embryons transgéniques, il est ainsi possible de suivre en temps réel des processus et phénomènes cellulaires impliqués dans la tumorigénèse et la prolifération tumorale.

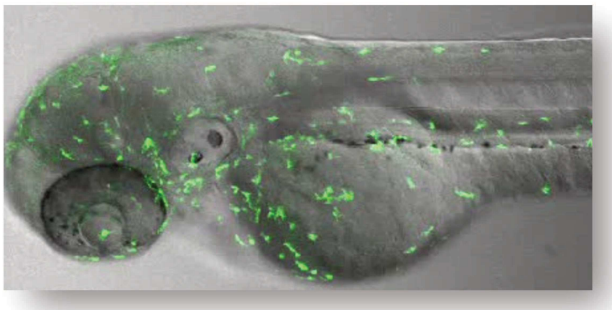


Figure 53: Lignée transgénique marquant les macrophages totaux Tg(mpeg1:gfp)

Une des populations cellulaires clé du microenvironnement tumoral est les **macrophages.** Plusieurs lignées ont été générées pour marquer les **macrophages totaux et la microglie** telle que : *Tg(mpeg1:EGFP) ou Tg(mpeg1:m-cherrry) et Tg(mfap4 :m-cherry)(Figure 53)* (Ellett, Pase, Hayman, Andrianopoulos and Lieschke 2011 ; Walton et al. 2015). Deux **lignées spécifiques de la microglie** ont aussi été mises au point *Tg(apoeb:LYEGFP)* et *Tg(p2ry12:p2ry12-GFP)*(Peri and Nüsslein-Volhard et al. 2008 ; Sieger et al. 2012). Deux lignées marquant spécifiquement les **macrophages pro-inflammatoire M1** ont également été développées : *Tg(tnfa:eGFP-F)* et *Tg(Il1b :GFP-F)* (Nguyen-Chi et al. 2015). En revanche aucune lignée rapportrice marquant spécifiquement les macrophages M2 n'a pour l'heure été publiée.

Concernant les vaisseaux sanguins, plusieurs lignées transgéniques ont également été générées et marquent spécifiquement les cellules endothéliales vasculaires. Les plus utilisées sont les lignées *Tg(fli :GFP) ; Tg(kdrl :eGFP)* et *Tg(kdrl :m-cherry)* (Figure 54) (Lawson et Weinstein 2002a) .

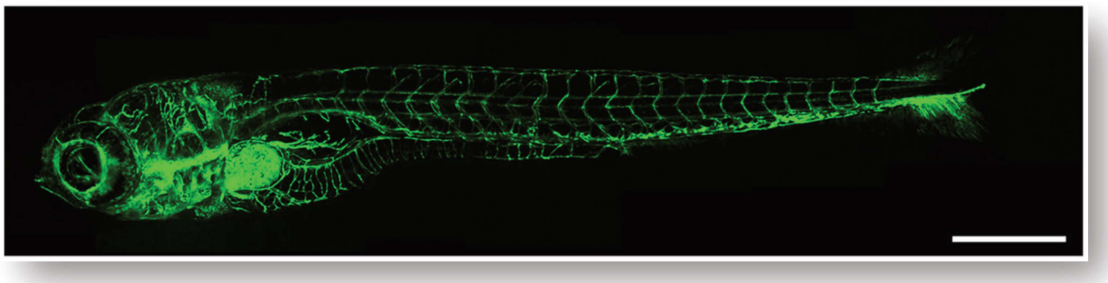


Figure 54 : Lignée transgénique marquant les cellules endothéliales vasculaires Tg(fli:eGFP) Lawson et Weinstein 2002a. Echelle = 500 µm

iv) Étude des macrophages/microglie et des vaisseaux sanguins associée aux glioblastome dans le poisson zèbre

Étude des interactions microglie-glioblastome

A l'heure actuelle, la réponse de la microglie/macrophages associés au glioblastome a été peu étudiée *in vivo* dans le modèle du poisson zèbre (Hamilton et al. 2016 ; Astell et Sieger, 2017). Une seule étude publiée en 2016 explore le rôle des macrophages dans ce contexte. Ainsi, pour la première fois, Hamilton et al. ont pu montrer via imagerie confocale, l'interaction directe entre la microglie et les cellules cancéreuses de glioblastome (Figure 55). Pour cela, les U87 et les U251, deux lignées cellulaires humaines de glioblastome ont été transplantées dans le cerveau d'embryons transgéniques *mpeg:EGFP* marquant les macrophages et la microglie. Les deux lignées de glioblastome transplantées *in vivo* ont ainsi pu être comparées (Hamilton et al. 2016). De manière intéressante, des différences ont pu être observées que ce soit sur la morphologie, la capacités invasive ou la prolifération des cellules cancéreuses. Dans ce contexte le rôle pro-tumoral des macrophages a pu être établi et deux types d'intéractions entre macrophages et cellules cancéreuses ont pu être observées. (Hamilton et al. 2016).

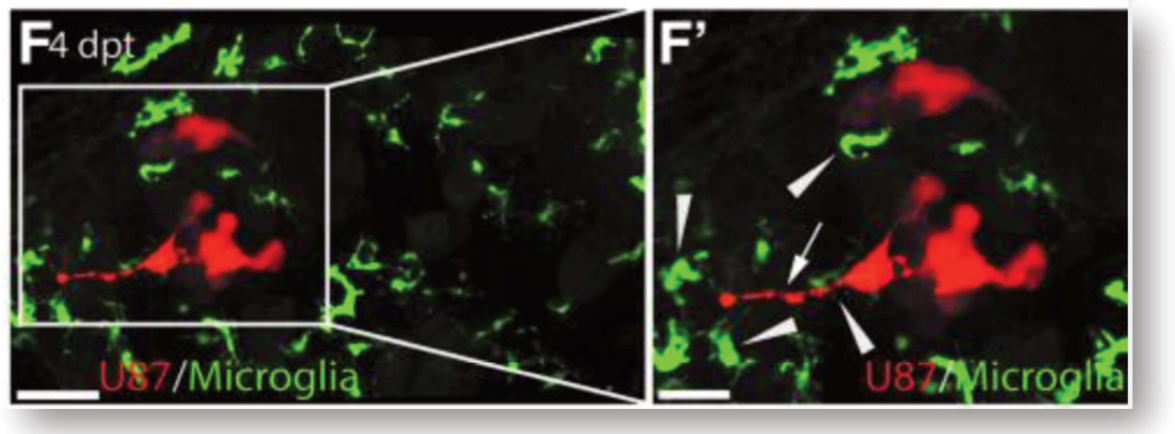


Figure 55 : Interaction microglie-glioblastome. Les cellules cancéreuses de glioblastome U87 sont visualisées en rouge et les macrophages en vert. Les projections des cellules cancéreuses sont signalées avec une flèche blanche, Les microglies interagissant avec les cellules U87 sont marquées d'une pointe de flèche blanche (Hamilton et al. 2016).

Processus de néovascularisation associés au glioblastome dans le poisson zèbre

Les interactions glioblastome-vaisseaux, ainsi que les processus de néovascularisation comme l'angiogenèse, la co-optation tumorale et la dilatation des vaisseaux sanguins retrouvés en clinique chez les patients atteints de glioblastome ont également été étudiés dans des modèles de poisson zèbre (Figure 56) (Umans et al. 2020 ; Zeng et al. 2017 ; Lal et al. 2012 ; Li et al. 2012 ; Nicoli et al. 2017). De manière similaire à l'homme, ces processus sont conservés dans le modèle du poisson-zèbre.

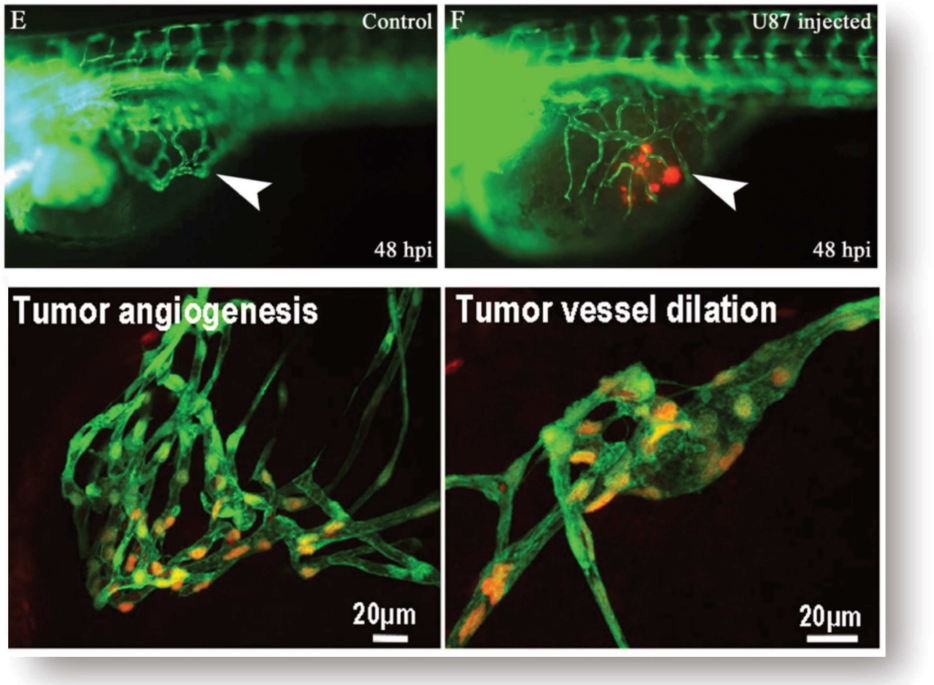


Figure 56 : Angiogénèse et dilatation des vaisseaux (Zeng 2017 ; Li et al 2012)

L'ensemble de ces études menées sur le microenvironnement tumoral nous montre que le poisson zèbre est un modèle idéal pour étudier en temps réel les interactions microglie-gliome ainsi que les processus de néovascularisation telle que l'angiogénèse ou la co-optation des vaisseaux.

4) Le poisson-zèbre, un modèle de choix pour évaluer l'efficacité de nouvelles thérapies anticancéreuses

Le poisson zèbre est devenu un modèle préclinique particulièrement utile pour évaluer l'efficacité antitumorale de nouveaux médicaments anticancéreux. En effet, les molécules peuvent être directement solubilisées dans l'eau dans lesquels baignent les embryons ce qui rend l'administration chimique simple et non invasive (Drabsch et al. 2013 ; Taylor et Zon 2009 ; Yang et al. 2014). De plus, le traitement simultané de nombreux embryons avec de petites quantités de produits chimiques permet un débit relativement élevé et des études peu coûteuses. Grâce à l'imagerie en temps réel, il est aussi possible de tester et valider l'efficacité d'un nouveau traitement. Une autre problématique rencontrée en clinique concerne la barrière hémato-encéphalique qui limite le passage de nombreuses molécules du système circulatoire au système nerveux central (SNC). L'établissement d'une barrière hémato-encéphalique dès 2,5 jours après fécondation chez le poisson zèbre permet de prendre en compte les contraintes physiologiques inhérentes à ce type de cancer (Quinonez-Silvero et al. 2020). Enfin, la toxicité associée au traitement peut-être également évaluée, puisque la

majorité des organes sont déjà formés et parfaitement fonctionnels. Les embryons et les larves de poisson zèbre peuvent ainsi potentiellement combler le fossé entre le criblage *in vitro* à haut débit et les modèles mammifères (Jung et al. 2012 ; Stern et al. 2003).

Dans les xénogreffes de glioblastome chez le poisson-zèbre. Le **témozolomide** a ainsi pu démontrer son efficacité en combinaison ou non avec la radiothérapie avant d'être utilisé comme traitement de référence (Geiger et al. 2013 ; Zeng et al. 2017). Le modèle a aussi permis d'identifier des radio-sensibilisateurs potentiels comme le **NS-123**, qui augmente les effets de la radiothérapie *in vivo* (Lally et al. 2007) sans effets toxiques sur les embryons de poisson zèbre. Le 2-méthoxy-6-acétyl-7méthyljuglone (**MAM**), un produit naturel qui induit une nécroptose dans les cellules cancéreuses a également pu être testé et a montré une efficacité antitumorale similaire à celle du TMZ à de très faibles doses (Yu et al. 2020). Le **bortézomib**, un inhibiteur du protéasome a lui aussi montré une réduction tumorale identique au Témozolomide (Welker et al. 2016).

Un autre composé naturel aux propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes, et antioxydantes, l'**honokiol**, a également été testé pour son activité antitumorale dans le modèle du poisson zèbre. L'honokiol a empêché la migration des cellules cancéreuses de glioblastome vers le cerveau et a réduit l'activité tumorale migratrice, invasive et proliférative (Fan et al. 2018). Des nanoparticules micellaires (NP) chargées d'honokiol et de doxorubicine ont aussi bloqué la progression et inhibé la croissance des vaisseaux grâce à une libération contrôlée des deux molécules (Gao et al. 2017).

Une autre approche pharmacologique intéressante basée sur l'utilisation, **inhibiteurs de MTH1**, qui forcent la cellule cancéreuse à incorporer des nucléotides oxydés dans l'ADN, ont été testés dans des modèles orthotopiques de poisson zèbre. Ceux-ci ont montré une efficacité anti-tumorale satisfaisante (Pudelko et al. 2017). En utilisant le même modèle, Wehmas et al. ont observé une inhibition tumorale significative après traitement par **LY294002, un inhibiteur sélectif de PI3K** (Wehmas et al. 2016). Ces résultats valident les mêmes découvertes observées dans les tissus cérébraux organotypiques de souris (Han et al. 2010).

Des thérapies génétiques et épigénétiques ont également été testées. C'est le cas des **inhibiteurs de la protéine arginine méthyltransférase 5** (PRMT5), qui régulent l'expression des gènes par méthylation de protéines. Ces derniers ont amélioré la survie après microinjection de cellules d'origine humaine GBM exprimant la GFP dans le mésencéphale-cerveau du poisson zèbre (Banasavadi-Siddegowda et al. 2018).

De nombreux traitements anti-angiogéniques ont également été évaluées. C'est le cas de **l'axitinib, du sunitinib et du vatalanib** testés et validés chez le poisson zèbre après transplantation de cellules de glioblastome dans le sac vitellin. En effet, ces traitements ont tous inhibé la formation de vaisseaux induite par la tumeur (Yang et al. 2014). Cette étude a d'ailleurs démontré que le nouveau composé anti-tumoral **Nordy** inhibait l'angiogenèse et

augmentait les effets antiangiogéniques du vatalanib. Dans une autre étude, l'agent chimiothérapeutique **dianhydrogalactitol (DAG)** a été évalué dans des modèles de poisson zèbre afin d'élucider son mécanisme d'action. Jiang et al. ont ainsi montré que le DAG pourrait inhiber la migration et l'invasion des cellules tumorales en inhibant l'expression de la métalloprotéinase-2 (MMP2) matricielle. Des études mécanistiques révèlent aussi que le DAG inhibe à la fois les voies VEGFR2 et FGFR1, bloquant ainsi l'angiogenèse tumorale dans le modèle du poisson zèbre (Jiang et al. 2017).

Enfin, dans une étude sur des juvéniles à 30 dpf, les effets de deux chimiothérapies, l'inhibiteur de tyrosine kinase **erlotinib et le 5-fluorouracile** (5-FU) ont été évaluées. Chez les juvéniles, le 5-FU a été administré en balnéation, tandis que l'erlotinib a été administré par voie orale en raison de sa faible solubilité (Eden et al. 2015). La quantification de la fluorescence des cellules cancéreuses a démontré que le 5-FU et l'erlotinib inhibaient la prolifération des cellules de glioblastome *in vivo*.

L'ensemble de ces études prouvent la pertinence et l'importance du modèle du poisson zèbre. Il permettra grâce à ses avantages biologiques, éthiques et économiques d'évaluer de nouveaux médicaments afin d'améliorer à terme le traitement des patients atteints de glioblastome.

Partie B : OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

Partie B : OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

Au cours de mes trois années de thèse, j'ai mis en place et caractérisé plusieurs modèles complémentaires afin d'étudier le recrutement et la polarisation des macrophages *in vitro* et *in vivo*. Pour cela j'ai travaillé sur différents modèles de glioblastome *in vitro* et *in vivo* au sein de la société AZELEAD et à l'Institut de Génétique Humaine dans l'équipe de Nadine Laguette.

Dans l'équipe de Nadine Laguette, je me suis intéressée à l'effet des doubles brins d'ADN sur la polarisation des macrophages et à l'impact des voies de signalisations des acides nucléiques cytosoliques en particulier de la voie de signalisation cGAS-STING sur le recrutement, la polarisation des macrophages et la tumorigénèse. Pour cela, j'ai pu mettre en place un modèle *in vitro* de polarisation des macrophages à partir de monocytes. Ces travaux m'ont ensuite permis d'explorer à un niveau moléculaire la voie de signalisation cGAS-STING et les conséquences de son activation sur une lignée humaine macrophagique.

En parralèle, au sein de l'entreprise AZELEAD, mes travaux portant sur le modèle du poisson zèbre m'ont amené à développer un modèle de glioblastome permettant d'étudier simultanément les cellules tumorales, les macrophages et les vaisseaux sanguins. J'ai étudié grâce à ce modèle le microenvironnement tumoral associé au glioblastome et caractérisé plus finement les interactions entre macrophages et cellules cancéreuses en temps réel au sein d'un organisme vivant.

Mes résultats seront divisés en deux parties distinctes.

La première partie des résultats comprendra mes travaux menés au sein de l'équipe de N. Laguette à l'IGH. Ces résultats détailleront l'impact des acides nucléiques cytosoliques et de la voie cGAS-STING sur la polarisation des macrophages *in vitro*. L'effet de cGAS sur la tumorigénèse, la réponse aux traitements, le recrutement et la polarisation des macrophages sera également abordé via des expériences *in vitro* et *in vivo*. L'ensemble de ces travaux sera présenté sous la forme de résultats puis discutés dans la partie suivante. Une partie de ces résultats sera intégré dans un article scientifique prochainement soumis avec C. Taffoni, post-doctorante dans l'équipe de N. Laguette.

La deuxième partie présentée sous la forme de deux articles rédigés comprendra mes expériences menées au sein de l'entreprise AZELEAD. Le premier article *« Modelling 3D tumour microenvironment in vivo : a tool to predict cancer fate »* porte sur la méthode que j'ai développé au cours de ma deuxième année de thèse. L'objectif de ce travail était de mettre au point un nouveau modèle permettant d'étudier simultanément l'interaction entre les cellules cancéreuses et deux populations cellulaires clées du microenvironnement tumoral : les

macrophages et les cellules endothéliales vasculaires. Cette article est pré-publié et disponible sur BioRxiv et sera prochainement soumis. Le second article sera prochainement soumis et porte sur le rôle des macrophages et leur impact sur la tumorigénèse dans un modèle de glioblastome chez le poisson-zèbre. J'ai pu à cet égard explorer le recrutement, les interactions complexes entre cellules cancéreuses et macrophages et les caractéristiques morphologiques et dynamiques des macrophages.

Les annexes comprendront la revue « *Nucleic Acid Immunity and DNA Damage Response : New friends and old foes* » publiée en avril 2021 chez Frontiers in Immunology dans laquelle je suis co-auteure. La deuxième annexe comprend un autre article soumis de l'équipe pour lequel j'ai pu apporter ma contribution « *Sting orchestrates the crosstalk between polyunsaturated fatty acids metaabolism and inflammatory response* » qui est en cours de soumission et disponible sur BioRxiv,

Partie C : RESULTATS

Partie C : RESULTATS

A) Effet des acides nucléiques sur la polarisation des macrophages *in vitro* & impact de la voie de signalisation cGAS-STING

Le premier objectif de la thèse était d'étudier l'effet des acides nucléiques cytosoliques et de l'impact de la voie de signalisation cGAS-STING sur la polarisation des macrophages *in vitro*. Pour cela nous avons dû mettre en place un modèle de polarisation des macrophages à partir de monocytes via l'utilisation de la lignée monocytaire immortalisée THP-1. Cette lignée cellulaire est fréquemment utilisée dans différents domaines de recherche (Chanput et al., 2014) en particulier pour étudier la polarisation des macrophages. En effet, après une étape de prédifférenciation à l'aide de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) ou d'autres stimuli, les cellules THP-1 acquièrent un phénotype de type macrophage qui reproduit le phénotype des macrophages humains primaires à plusieurs égards (Maeß et al., 2014). Cette lignée était déjà disponible au sein de l'équipe de N. Laguette, la première étape de mon travail a donc consisté à mettre en place un modèle de polarisation des macrophages humains à partir de monocytes.

Mise au point d'un modèle de polarisation des macrophages M1/M2 *in vitro*

Après analyse de la littérature, il est apparu qu'il n'existait pas de protocole de différenciation standardisé. En effet, les temps d'incubation, les concentrations de PMA et de cytokines variaient grandement d'une étude à l'autre ce qui rendait difficile l'établissement d'un protocole. En se basant sur les travaux de Genin et al. (2015), nous avons mis au point un protocole de différenciation des monocytes en macrophages M1 et M2 (Figure 1A) ce qui nous a permis d'identifier des marqueurs de polarisation caractéristique de ces deux sous-types par différentes techniques analytiques : Analyse transcriptomique par qPCR, analyse de marqueur membranaire par cytométrie en flux et analyse des cytokines sécrétées dans le surnageant.

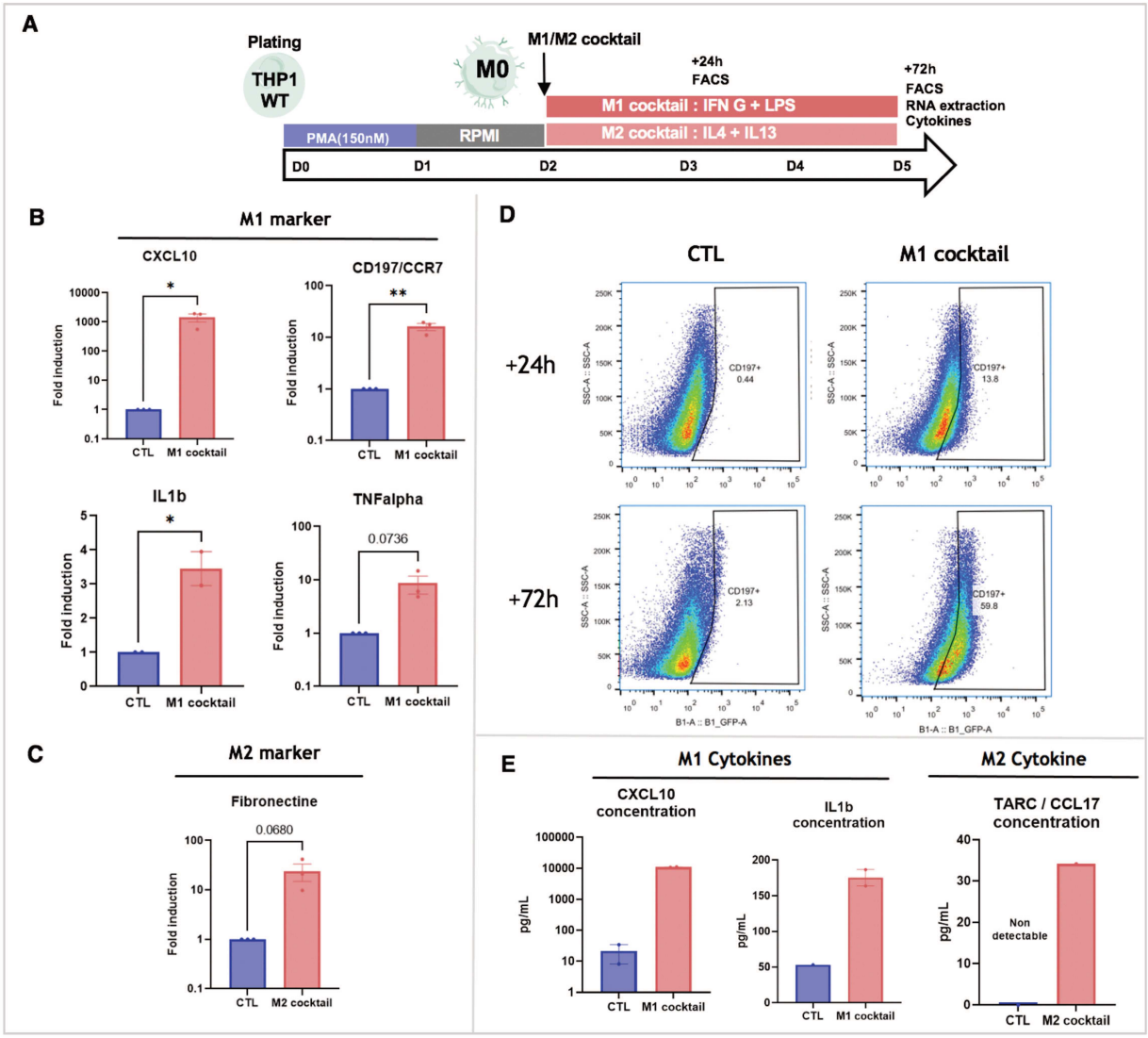


Figure 1 : Mise au point d'un modèle de polarisation *in vitro* et identification de marqueurs de polarisation caractéristiques des macrophages M1/M2 *in vitro*

A : Schéma du protocole conduisant à la polarisation des monocytes en macrophage M1 et M2.

B : Analyse de l'expression des marqueurs de polarisation M1 (CXCL10, CD197, IL-1β, TNFα) 72h après traitement en présence du cocktail de polarisation M1 (LPS + IFNG) par q-RTPCR. L'analyse des taux d'ARNm est normalisé par rapport au gène de référence GAPDH. Les données représentent la moyenne (+SEM), n=2-3. Un t-test de Student a été réalisé pour évaluer la significativité *p<0,05, ** p<0,01.

C : Analyse de l'expression des marqueurs de polarisation M2 (Fibronectine) 72h après traitement en présence du cocktail de polarisation M2 (IL13 + IL4) par q-RTPCR. L'analyse des taux d'ARNm est normalisée par rapport au gène de référence GAPDH. Les données représentent la moyenne (+SEM), n=3. Un t-test de Student a été réalisé pour évaluer la significativité* p<0,05, ** p<0,01.

D : Analyse de l'expression membranaire du marqueur M1 CD197 par cytométrie en flux à 24h et 72h de traitement en présence du cocktail de polarisation M1 (LPS + IFNG). n=2

E : Analyse de la concentration en cytokine M1 (CXCL10 et IL-1β) et M2 (CCL17) 72h après traitement avec les cocktails de polarisation M1 (LPS + IFN G) ou M2 (IL13 + IL4). n=1, dupliquat technique

Par q-RTPCR, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de plusieurs marqueurs de polarisation caractéristiques des macrophages M1 et M2 après traitement respectif avec les cocktails de polarisation M1 (LPS et IFN gamma) ou M2 (IL13, IL4). En effet, le traitement avec le cocktail M1 augmente le niveau d'expression moyen de CXCL10

de 1450,5 fois, de CD197 de 16,1 fois, l'IL1-b de 3,4 fois et du TNFa de 8,7 fois. Le traitement avec le cocktail M2 augmente le niveau moyen d'expression de la fibronectine de 24 fois. Par q-RTPCR, nous avons sélectionné et identifié quatre marqueurs de polarisation des macrophages M1 : CXCL10, CD197/CCR7, l'IL-1β et TNFa (Figure 1B) et la fibronectine comme marqueur de polarisation des macrophages M2 (Figure 1C). Au vu des résultats de q-RTPCR, nous avons ensuite analysé l'expression du marqueur membranaire de polarisation M1, CD197 par cytométrie en flux. Après traitement avec le cocktail de polarisation M1, une augmentation de l'expression du marqueur membranaire M1, CD197 est observé par rapport à la condition contrôle. Ces analyses par cytométrie en flux nous ont ainsi permis de sélectionner le marqueur membranaire de polarisation M1 CD197 (Figure 1D). En revanche, suite au traitement par le cocktail M2, aucun marqueur membranaire de polarisation M2 n'a été sélectionné par cytométrie en flux. La dernière technique repose sur l'analyse de la concentration en cytokines dans le surnageant. Après collecte des surnageants des macrophages traités avec les cocktails M1 et M2, nous avons sélectionné les cytokines CXCL10 et IL-1β caractéristiques de la polarisation des macrophages M1 et la cytokine CCL17/TARC caractéristique de la polarisation des macrophages M2 (Figure 1E).

Une fois ces marqueurs caractéristiques de la polarisation des macrophages M1 et M2 identifiés, nous avons évalué l'effet des acides nucléiques et en particulier des doubles brins d'ADN (80 paires de bases) sur la polarisation des macrophages. En effet, il avait été préalablement montré via des études *in vivo* et *in vitro* que des agonistes de STING tels que le DMXAA et le 2'3'cGAMP étaient capables de repolariser les macrophages M2 (anti-inflammatoires / pro-tumoraux) en macrophage M1 (pro-inflammatoire / anti-tumoraux) (Downey et al. 2014 ; Ohkuri et al. 2017). En revanche, l'effet de l'activation de cGAS, en amont de STING, via l'utilisation des acides nucléiques sur la polarisation n'avait pas été exploré. Cela nous paraissait particulièrement pertinent quand on sait que les cellules cancéreuses peuvent sécréter des exosomes contenant des fragments d'ADN et d'ARN qui peuvent être captés par les macrophages environnant et directement impacter leur polarisation (Han et al. 2021).

Effet des acides nucléiques (dsDNA) sur la polarisation des macrophages

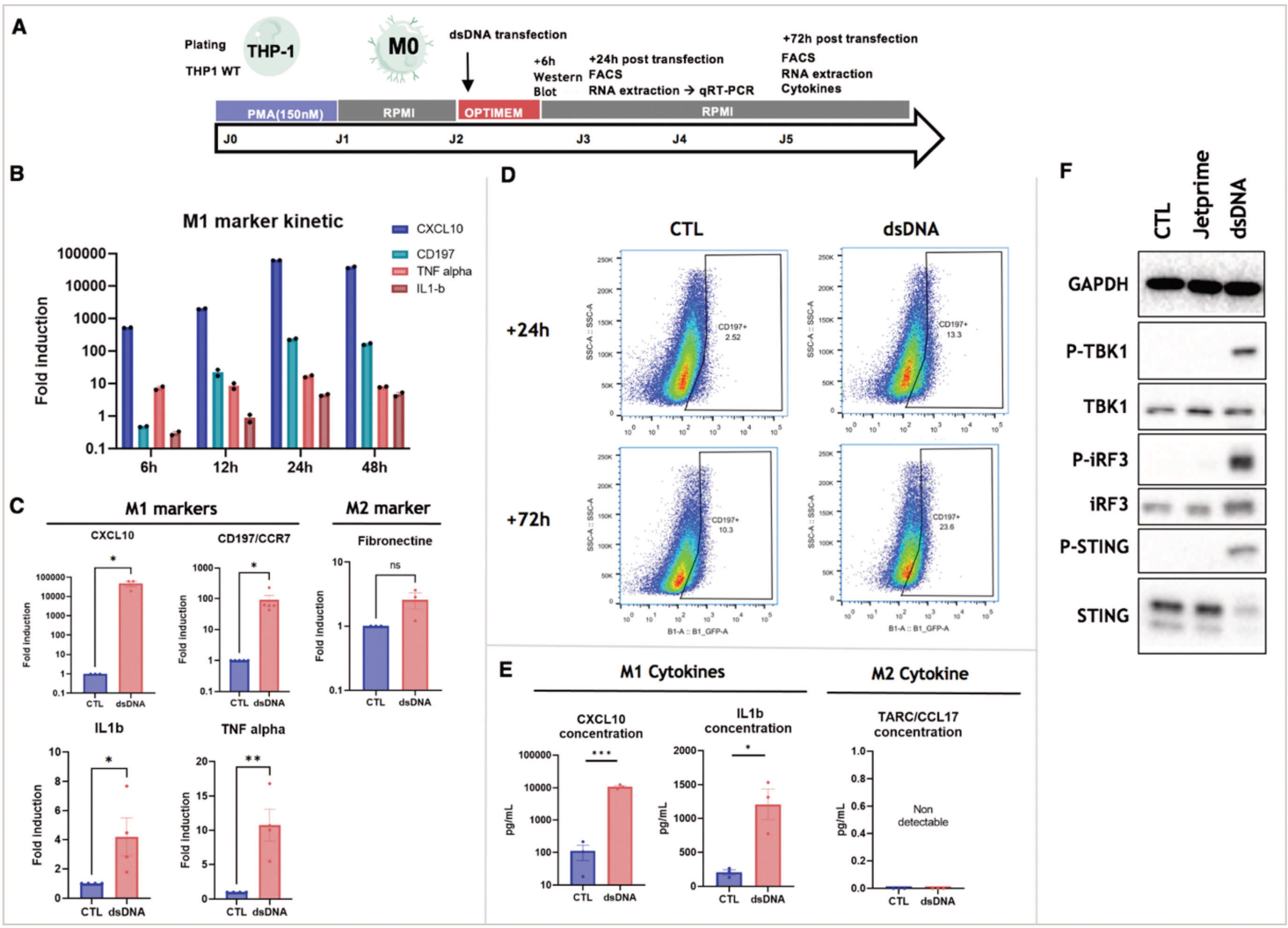


Figure 2 : Les doubles brins d'ADN (dsDNA) induisent la polarisation des macrophages vers un phénotype M1

A : Schéma du protocole de stimulation des macrophages avec des doubles brins d'ADN.

B : Cinétique représentant l'expression des marqueurs de polarisation M1 (CXCL10, CD197, IL-1β, TNFα) 6h, 12h, 24h, 48h après stimulation avec des doubles brins d'ADN par q-RTPCR. L'analyse des taux d'ARNm est normalisée par rapport au gène de référence GAPDH. n=1

C : Analyse de l'expression des marqueurs de polarisation M1 (CXCL10, CD197, IL-1β, TNFα) et M2 (Fibronectine) 24h stimulation avec des doubles brins d'ADN par q-RTPCR. L'analyse des taux d'ARNm est normalisée par rapport au gène de référence GAPDH. Les données représentent la moyenne (+SEM), n=3-5. Un t-test de Student a été réalisé pour évaluer la significativité* p<0,05, ** p<0,01.

D : Analyse de l'expression membranaire du marqueur M1 CD197 par cytométrie en flux à 24h et 72h après stimulation avec des doubles brins d'ADN. n=1

E : Analyse de la concentration en cytokine M1 (CXCL10 et IL-1β) et M2 (CCL17) 72h après stimulation avec des doubles brins d'ADN. Les données représentent la moyenne (+SEM) n=3. Un t-test de Student a été réalisé pour évaluer la significativité * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001.,

F : Analyse par Western blot de l'activation de la voie de signalisation cGAS-STING 6h après stimulation avec des doubles brins d'ADN. Les échantillons ont été incubés en présence des anticorps indiqués.

Afin d'étudier l'effet des doubles brins d'ADN (dsDNA) sur la polarisation des macrophages, nous avons fait synthétiser des simples brins d'ADN de 80 paires de bases que

nous avons ensuite hybridés. La pureté de ces doubles brins a été validé avant d'entreprendre les expériences ultérieures. Les monocytes (THP-1) ont été dans un premier temps prédifférenciés en macrophages (M0) via l'utilisation de PMA puis transfectés avec les doubles brins d'ADN (Figure 2A). Afin d'identifier quel était le moment idéal pour collecter les cellules, nous avons réalisé une cinétique par q-RTPCR. Pour cela, nous avons collectés les macrophages transfectés à 6h, 12h, 24h et 48h et avons constaté que l'induction des marqueurs de polarisation par q-RTPCR était maximale 24h après transfection ce qui nous a permis de fixer ce moment pour les expériences ultérieures (Figure 2B).

Nous avons constaté que les marqueurs de polarisation M1 préalablement identifiés dont le CXCL10, CD197, IL-1β et TNFa étaient significativement augmentés suite à la transfection d'acides nucléiques doubles brins d'ADN, 24h après stimulation (Figure 2C). En revanche, la fibronectine marqueur de polarisation M2 précédemment identifié n'était pas induit dans ces cellules (Figure 2C). Nous avons confirmé ce phénotype de polarisation par l'analyse des cytokines issues du surnageant des cellules. De manière identique, nous avons observé une augmentation significative de la concentration en cytokines caractéristique de la polarisation des macrophages M1, CXCL10 et IL-1β, et l'absence d'augmentation de la concentration en cytokine caractéristique de la polarisation des macrophages M2, CCL17 qui n'était pas détectable dans le surnageant (Figure 2E). Enfin, une expérience réalisée en cytométrie en flux nous a permis de confirmer ce statut de polarisation via l'augmentation du marqueur de polarisation membranaire des macrophages M1, CD197 à 24h et 72h après transfection (Figure 2D). Ainsi la combinaison de ces approches tend à montrer que les acides nucléiques doubles brins d'ADN sont capables d'induire une polarisation des macrophages prédifférencié vers un sous-type M1 *in vitro*. Cela est cohérent avec les résultats préalablement publiés utilisant des agonistes de STING, qui montraient une repolarisation des macrophages M2 en M1 (Downey et al. 2014 ; Ohkuri et al. 2014, Ohkuri et al. 2017 ; Cheng 2018).

Étant donné l'importance de cGAS dans la reconnaissance des doubles brins d'ADN cytosoliques, nous avons confirmé l'activation de la voie de signalisation intracellulaire cGAS-STING après transfection des acides nucléiques. Pour cela, nous avons collecté les cellules 6h après transplantation et réalisé une analyse protéique par Western Blot. Les résultats montrent que la voie est bien activée 6h après transfection avec les doubles brins d'ADN (Figure 2F) et que cette activation n'est pas dépendante du réactif de transfection utilisé (Jetprime). Cette activation de la voie cGAS-STING est visible via la présence des phosphorylations successives de TBK1, d'IRF3 et de STING. De même la dégradation de STING après stimulation avec les doubles brins d'ADN témoigne de l'activation de la voie (Gonugunta et al. 2017). La question s'est ensuite posée, quant à l'importance de la voie cGAS-STING dans ce contexte de polarisation des macrophages.

L'activation des marqueurs de polarisation des macrophages M1 après stimulation avec des doubles brins d'ADN est dépendante de cGAS et de STING.

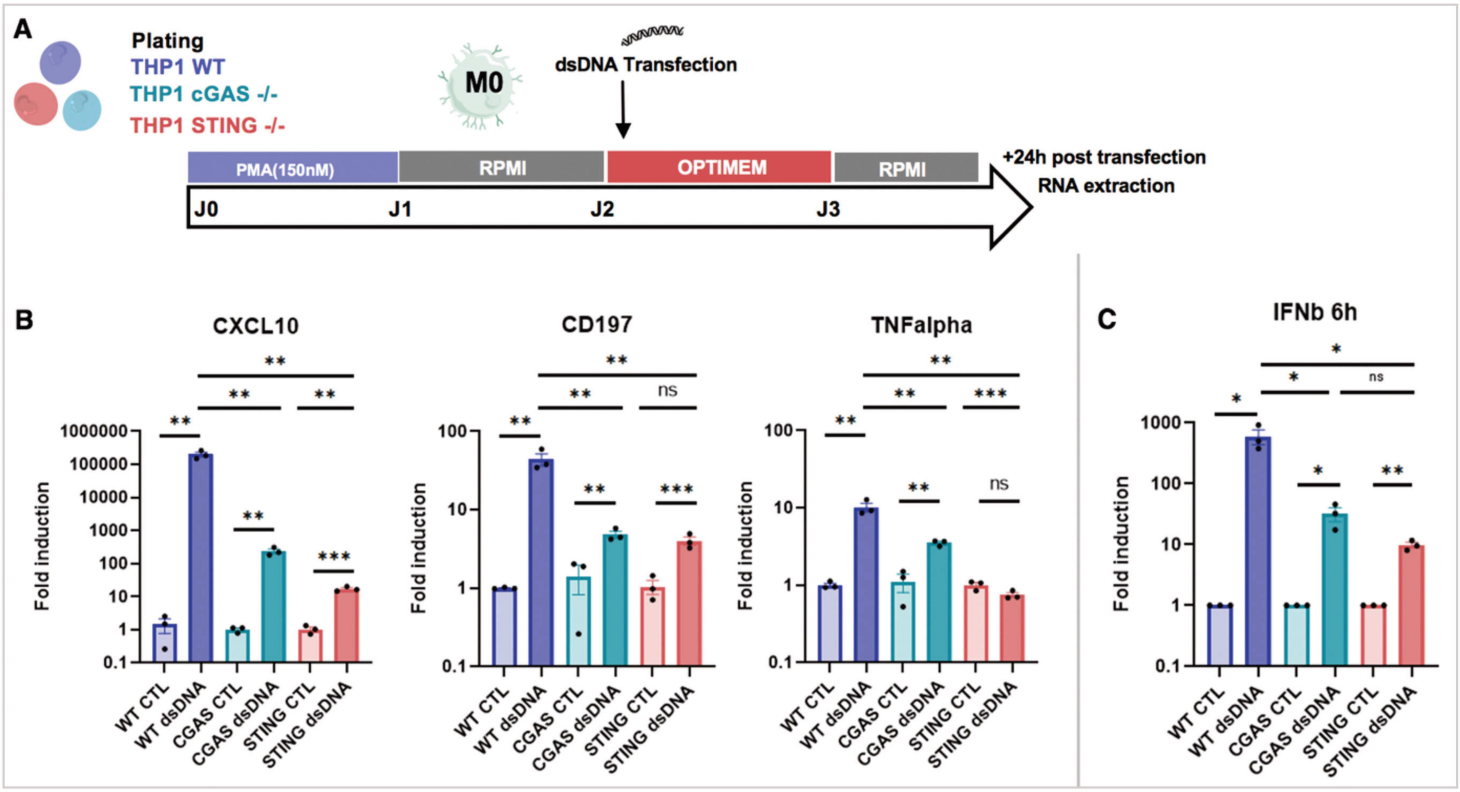


Figure 3 : L'induction des marqueurs de polarisation des macrophages M1 après stimulation avec des doubles brins d'ADN repose sur la voie cGAS-STING

A : Schéma représentant le protocole de stimulation des macrophages avec des doubles brins d'ADN.

B : Analyse représentant l'expression des marqueurs de polarisation M1 (CXCL10, CD197, TNFa) 24h, après stimulation avec des doubles brins d'ADN par q-RTPCR. L'analyse des taux d'ARNm est normalisée par rapport au gène de référence GAPDH. Un t-test de Student a été réalisé pour évaluer la significativité* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001. Les datas présentées (triplicats biologiques) sont représentatives de 4 expériences indépendantes.

C : Analyse représentant l'expression d'IFNb 6h, après stimulation avec des doubles brins d'ADN par q-RTPCR. L'analyse des taux d'ARNm est normalisée par rapport au gène de référence GAPDH. Un t-test de Student a été réalisé pour évaluer la significativité* p<0,05, ** p<0,01. Les datas présentées représentent la moyenne +SEM, n= 3 expériences indépendantes

Afin d'étudier l'importance de cGAS et de STING sur la polarisation des macrophages après stimulation avec des doubles brins d'ADN, deux lignées disponibles au laboratoire (THP1 cGAS$^{-/-}$ et THP1 STING$^{-/-}$) et générées par S. Paludan ont été utilisées. En suivant le même protocole précédent (Figure 3 A), nous avons transfecté les trois lignées THP1 contrôle, cGAS$^{-/-}$ et STING$^{-/-}$ avec des ADN doubles brins et analysé le statut de polarisation des macrophages par q-RTPCR.

Nous avons observé que l'induction des marqueurs de polarisation caractéristiques des macrophages M1 était moindre dans les lignées cGAS$^{-/-}$ et STING$^{-/-}$ par rapport à la lignée contrôle (Figure 3B). Si l'on prend par exemple le marqueur de polarisation CXCL10, l'induction suite à la stimulation avec les doubles brins d'ADN est 845 fois moins importante entre la lignée contrôle et la lignée CGAS$^{-/-}$ et 11742 fois moindre entre la lignée contrôle et STING$^{-/-}$. Pour le marqueur de polarisation CD197, l'induction est 8,9 fois moins importante entre la lignée

contrôle et la lignée CGAS$^{-/-}$ et 10 fois moindre entre la lignée contrôle et STING$^{-/-}$. Ainsi, l'activation des marqueurs de polarisation des macrophages M1 suite à la stimulation avec des ADN double brin repose majoritaire sur la voie de signalisation cGAS-STING. De même l'induction de l'interféron est bien majoritairement dépendante de cGAS et de STING dans les macrophages pré-différenciés (Figure 3C).

L'induction des marqueurs de polarisation M1 : vague primaire ou secondaire ?

Ainsi, nous venons de voir que l'activation de la voie cGAS-STING par les doubles brins d'ADN induit l'expression de marqueurs de polarisation caractéristique des macrophages M1 ainsi que l'augmentation d'expression de l'interféron β. Il a été rapporté que l'IFN-β et deux facteurs de transcription (IRF1 et IRF5) étaient impliqués dans la polarisation des macrophages M1 (Xie et al. 2016). De plus, la principale signature de l'activation de la voie cGAS-STING passe par la production d'interféron de type I. Une fois sécrétés, l'IFNa et l'IFNβ se lient à un récepteur transmembranaire hétérodimérique IFNAR composé de deux sous-unités IFNAR1 et IFNAR2 (Zanin et al. 2021). Cette liaison mène à l'activation des protéines tyrosine kinases, Janus kinase 1 (JAK1) et tyrosine kinase 2 (TYK2) (Levy DE, 2002 ; Stark et al. 2012) qui, une fois activée, phosphorylent les facteurs de transcription cytoplasmiques STAT1 et STAT2 qui se dimérisent et migrent vers le noyau. Cette cascade de signalisation activent la transcription de près de 300 gènes stimulés par l'interféron (ISGs) (Ivashkiv, 2014).

Il aurait été intéressant d'évaluer si l'augmentation des marqueurs de polarisation caractéristiques des macrophages M1 est dépendante de l'interféron de type 1 produit (IFN a, β). En d'autres termes, si l'induction des marqueurs M1 observée est dû à une première vague d'activation ou est secondaire à la production d'Interféron de type I. Pour cela, il serait pertinent de générer la lignée THP1-IFNAR$^{-/-}$ pour évaluer si l'augmentation des marqueurs de polarisation des macrophages M1 est indépendante ou non de l'interféron.

B) Effet de cGAS sur la tumorigenèse, sur le recrutement et la polarisation des macrophages : *in vitro/in vivo*

Effet de cGAS sur la tumorigenèse *in vitro* et *in vivo* sur modèle murin

Nous avons ensuite étudié l'effet de cGAS sur la tumorigenèse et sur le recrutement et la polarisation des macrophages. Pour cela, nous avons utilisé deux lignées humaines de glioblastome déjà générées au sein de l'équipe par C. Taffoni à partir de la lignée parentale T98G. Étant donné que la lignée T98G n'exprime pas constitutivement cGAS, une lignée T98G surexprimant cGAS (T98G cGASOE) et son contrôle respectif (T98G empty) ont été générées.

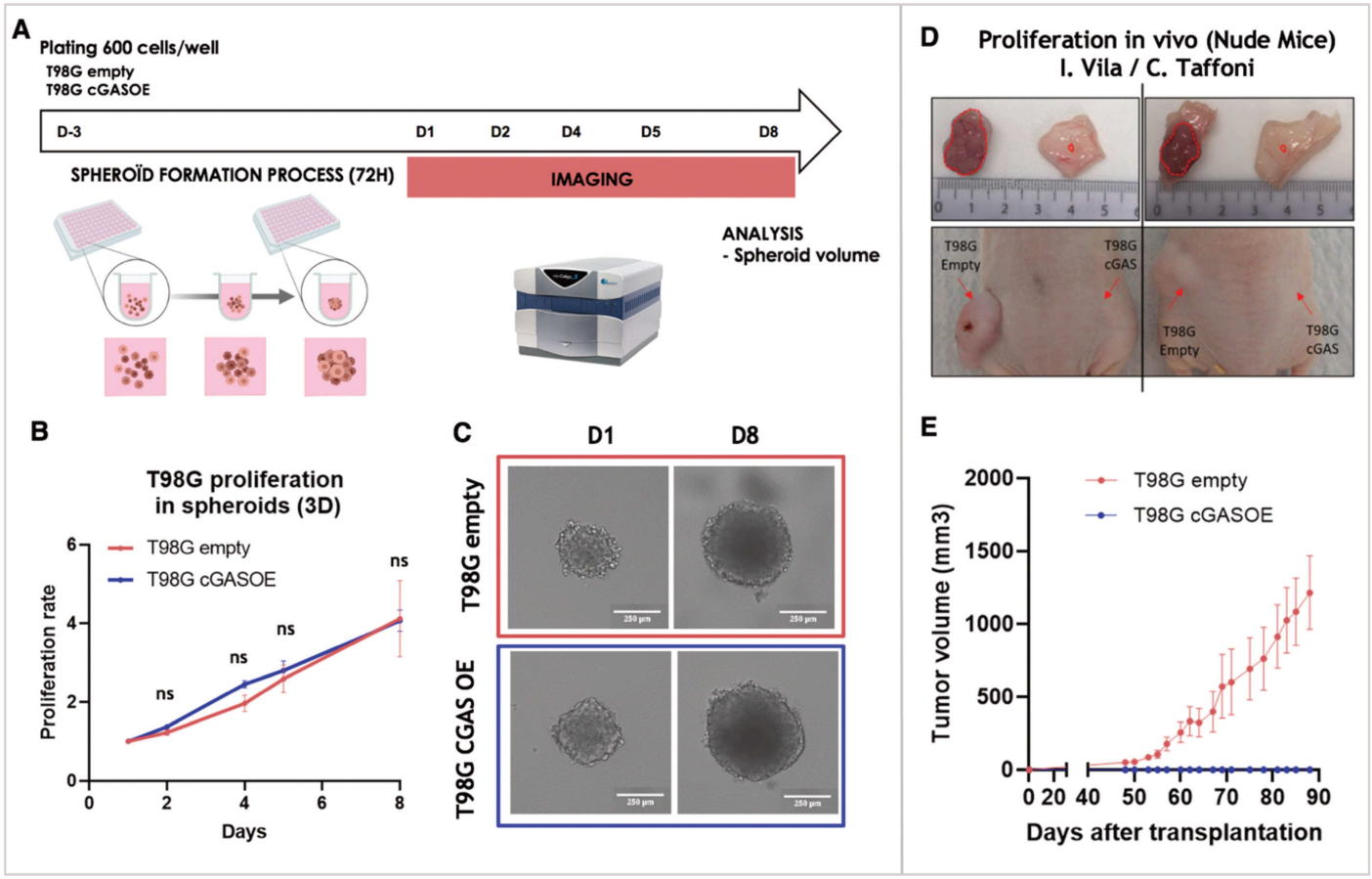


Figure 4 : Effet de cGAS sur la croissance tumorale en modèle sphéroïde (*in vitro*) et murin (*in vivo*)
A : Schéma représentant le protocole de formation des sphéroïdes (3D)
B : La prolifération des cellules T98G exprimant un vecteur codant vide ou surexprimant cGAS a été analysée en modèle sphéroïde 3D sur 8 jours. Les cellules ont été ensemencée et incubées pendant 3 jours pour permettre la formation des sphéroïdes avant d'être imagées. Le taux de prolifération a été estimé en normalisant le volume tumoral (estimé par l'application Celigo) au volume tumoral à J1. Le graphique représente la moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en dupliquat. Un t-test de Student a été réalisé pour évaluer la significativité* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001
C. Images représentatives des sphéroïdes T98G vides et T98G cGAS à D1 et D8 avec le cytomètre Celigo.
D : Images représentatives des tumeurs T98G contrôles et T98G cGASOE 70 jours après la greffe sous-cutanée.
E : Évolution du volume tumoral moyen, mesuré par un pied à coulisse, après une greffe sous-cutanée de T98G contrôles et de T98G cGASOE chez des souris Nude. N=7

La première étape a été d'étudier l'effet de cGAS sur la prolifération tumorale. Pour cela nous avons mis au point un modèle 3D de glioblastome en culture (Figure 4A). Grâce à ce modèle *in vitro* nous avons quantifié la croissance tumorale des deux lignées T98G et T98G cGASOE. Nous avons démontré qu'il n'existait pas de différence significative en termes de prolifération entre les deux lignées cellulaires (Figure 4B-C). Autrement dit, *in vitro*, la surexpression de cGAS n'influe pas sur la prolifération des cellules de glioblastome T98G en modèle 3D. L'étape suivante a été d'étudier la croissance tumorale des deux lignées *in-vivo*, pour cela nous avons utilisé un modèle murin et greffé en sous-cutané les deux lignées cellulaires, une par flanc sur des souris Nude. La croissance a ensuite été suivie au fil des jours grâce à l'utilisation d'un pied à coulisse. Ces expériences *in vivo* réalisées par I. Vila et C. Taffoni nous ont permis d'observer une différence majeure concernant la prolifération cellulaire des deux lignées (Figure 4D-E). En effet, il est apparu de manière claire que la lignée T98G surexprimant cGAS ne proliférait pas dans ces souris Nude (Figure 4D-E). Nous nous sommes alors demandé quelle était la cause d'une telle différence. Pour répondre à cette question le modèle du poisson zèbre, nous est apparu comme particulièrement pertinent puisque de par sa transparence, il nous permet d'étudier en temps réel les processus cellulaires mis en jeu après transplantation des lignées de glioblastome. Notre hypothèse était que les macrophages présents dans les souris Nude pouvaient jouer un rôle crucial dans la prolifération tumorale.

Effet de cGAS sur la croissance tumorale et l'invasivité *in vivo* dans le modèle du poisson zèbre

Pour réaliser ces expériences de transplantation chez le poisson zèbre, il a été préalablement nécessaire de générer deux lignées fluorescentes stables afin de pouvoir les suivre après transplantation. Pour cela, les deux lignées de glioblastome T98G empty et cGASOE ont été transfectées avec un plasmide GFP puis sélectionnées grâce à la généticine.

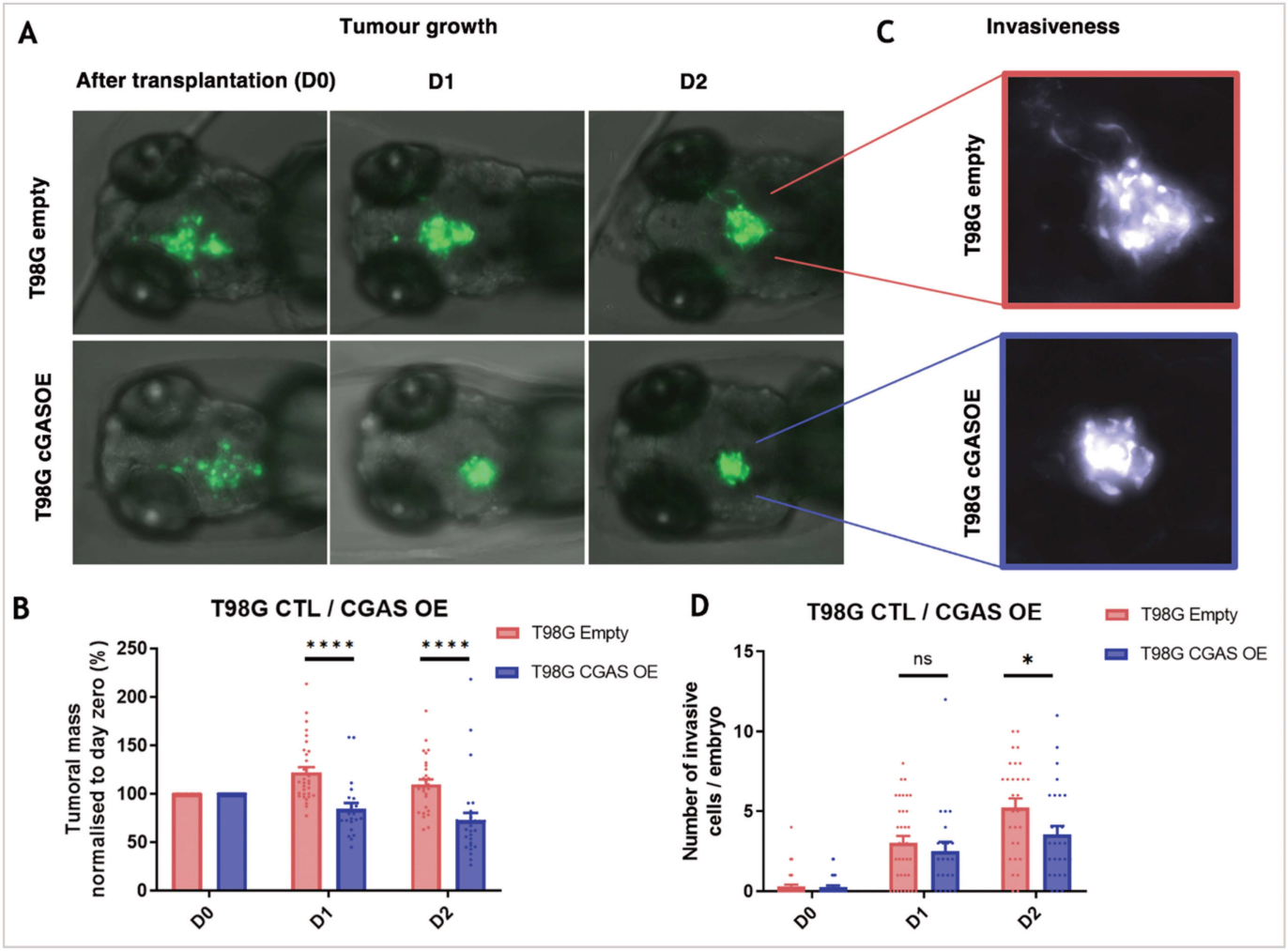


Figure 5 : Effet de cGAS sur la croissance tumorale chez le poisson zèbre (*in vivo*)
A : Des embryons de poisson zèbre ont été transplantés avec la lignée T98G empty (CTL) et T98G CGASOE à 3dpf. Les embryons de poisson zèbre ont été imagés quotidiennement jusqu'à 5dpf (J2).
B. Pour estimer la croissance tumorale, l'aire tumorale a été normalisée pour chaque embryon au jour de la transplantation (J0). Les données représentent la moyenne (± SEM), n = 22-35 embryons. Un test de Mann-Whitney a été réalisé pour évaluer la significativité* p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 , ****p<0,0001
C. Images des tumeurs T98G empty et cGAS, montrant la présence de cellules invasives de formes allongées.
D. Graphique représentant le nombre de cellules invasives (allongées) par tumeur et par embryons. Le nombre de cellules invasives ont été comptées manuellement. Les données représentent la moyenne (± SEM), n = 22-35 embryons. Un test de Mann-Whitney a été réalisé pour évaluer la significativité * p<0,05,

Les deux lignées T98G empty et cGASOE ont été transplantées dans le cerveau du poisson zèbre au niveau du mésencéphale 3 jours après fécondation (3dpf) puis suivies quotidiennement par imagerie dans des plaques 96 puits (Figure 5A). La croissance tumorale de chaque tumeur a été estimée à J1 et J2 en normalisant l'aire tumorale au jour de la transplantation (J0). De manière identique au modèle murin, les résultats obtenus ont montré une différence significative concernant la pousse des lignées T98G empty et cGASOE. En effet, dès le premier jour après transplantation nous avons constaté que la lignée T98G surexprimant cGAS proliférait moins que la lignée contrôle (Figure 5B). Cette dernière semblait plus rapidement éliminée après transplantation dans le cerveau du poisson zèbre que a lignée contrôle.

Dans un deuxième temps nous avons étudié l'invasivité des deux lignées en comptant manuellement le nombre de cellules invasives, de forme allongée, qui s'échappaient de la masse tumorale. Après quantification, il apparait de manière claire que la lignée contrôle T98G empty est plus invasive que la lignée surexprimant cGAS deux jours après transplantation (D2) (Figure 5D). Cela est d'ailleurs visible dans les images présentées (Figure 5C). L'ensemble de ces résultats mettent en lumière le rôle anti-tumoral de cGAS dans ce contexte.

Effet de cGAS sur le recrutement des macrophages *in vivo* dans le modèle du poisson zèbre.

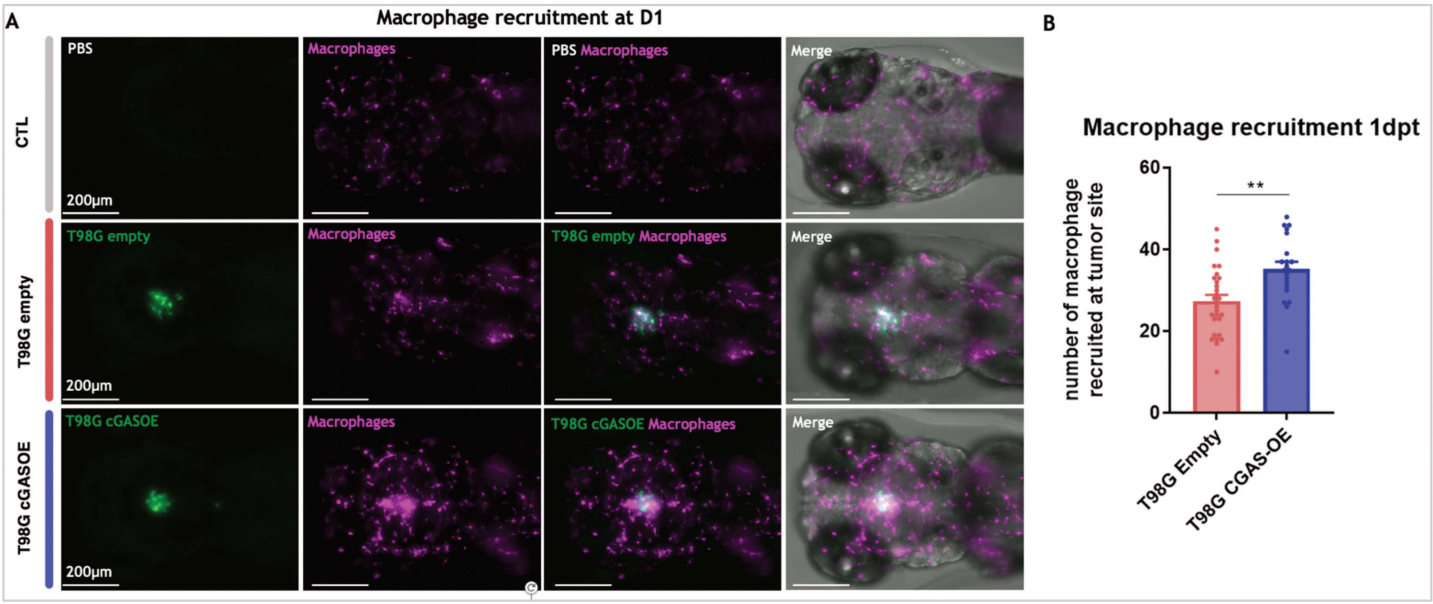


Figure 6 : Effet de cGAS sur le recrutement des macrophages chez le poisson zèbre (*in vivo*)

A : Des embryons de poisson zèbre issus de la lignée rapportrice MFAP ont été transplantée avec la lignée T98G empty, T98G CGASOE ou avec du PBS pour les embryons contrôles à 3dpf. Les images représentent les embryons de poisson zèbre à J1. Les cellules cancéreuses sont représentées en vert, les macrophages en magenta.

B. Le graphique représente le nombre de macrophages recrutés au niveau de la tumeur un jour après transplantation (1dpt / D1). Le nombre de macrophage recruté a été compté manuellement pour chaque embryon. Les données représentent la moyenne (± SEM), n = 21-29 embryons. Un t-test non apparié a été réalisé pour évaluer la significativité * p<0,05, ** p<0,01,

Suite aux résultats précédents montrant que la lignée T98G surexprimant cGAS proliférait moins que la lignée T98G empty dans le cerveau du poisson zèbre, nous nous sommes questionnés sur le recrutement des macrophages dans ce contexte. Pour explorer l'effet des macrophages, nous avons utilisé une lignée transgénique de poisson zèbre rapportrice *Tg(mfap4 :RFP)* marquant les macrophages. Des poissons contrôles ayant reçus une injection de PBS ont été sélectionnés comme contrôle (CTL). Comme nous le voyons, un jour après transplantation, l'inflammation induite par la transplantation au site d'injection est déjà résolue dans les poissons contrôles et n'induit pas de recrutement des macrophages (Figure 6A). Les images obtenues montrent qu'un jour après transplantation, la lignée de glioblastome T98G surexprimant cGAS recrute plus de macrophages que la lignée de glioblastome contrôle (T98G empty) (Figure 6A). Des agrégats de macrophages étaient d'ailleurs visibles tout autour de la tumeur (Figure 6A). En quantifiant manuellement le nombre de macrophages recrutés autour de la tumeur nous avons confirmé que le nombre de macrophages recrutés aux abords de la lignée surexprimant cGAS est plus important qu'autour de la lignée de glioblastome contrôle (T98G empty) (Figure 6B).

Ces résultats suggèrent un rôle anti-tumoral des macrophages recrutés capables de phagocyter et éliminer les cellules cancéreuses. Ainsi, la présence de cGAS dans ce contexte semble favoriser le recrutement des macrophages et l'élimination subséquente des cellules cancéreuses. Fort de ces résultats, nous nous sommes intéressés au statut de polarisation de ces macrophages recrutés.

Effet de cGAS sur la polarisation des macrophages *in vitro* / *in vivo*

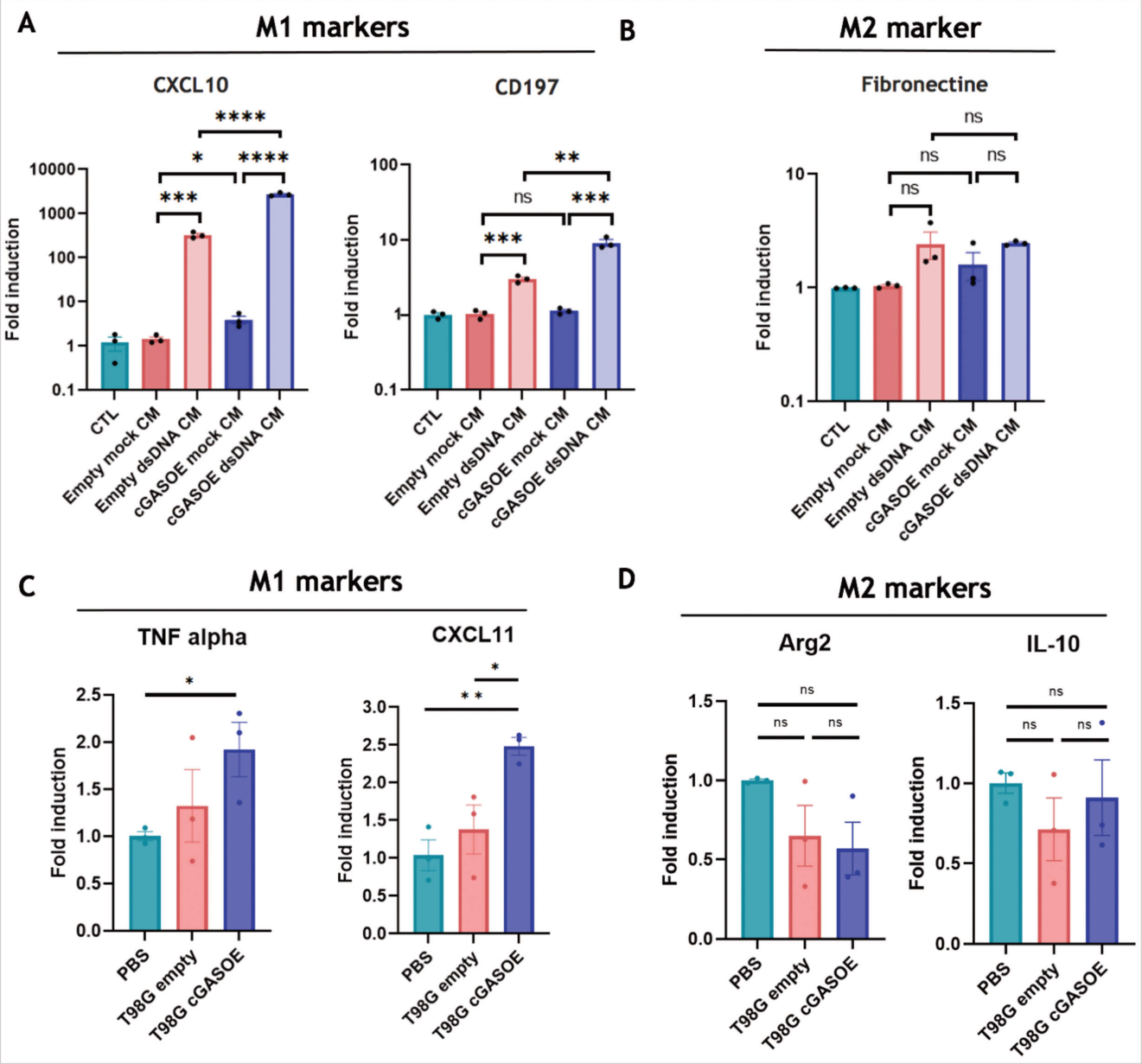


Figure 7 : Effet de cGAS sur la polarisation des macrophages *in vitro* et *in vivo*

A-B : Les milieux conditionnés issus des T98G empty et T98G cGASOE ont été collectés et incubés pendant 24h sur les macrophages prédifférenciés (M0). Les graphiques représentent l'analyse de l'expression des marqueurs de polarisation M1 (CXCL10, CD197) et M2 (Fibronectine) par q-RTPCR. L'analyse des taux d'ARNm est normalisée par rapport au gène de référence GAPDH. Les données présentées (tripliquats biologiques) sont représentatives de 3 expériences indépendantes. Un t-test a été réalisé pour évaluer la significativité * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001.

C-D. Les embryons de poisson zèbre à 3dpf ont été xénotransplantés avec des cellules T98G empty ou T98G CGAS OE. Les embryons contrôles ont été injectés avec du PBS. Le jour suivant (J1) la région de la tête a été isolée du reste du corps et 25 têtes d'embryons ont ensuite été regroupées avant d'en extraire l'ARNm. Les graphiques représentent l'analyse de l'expression des marqueurs de polarisation M1 (TNFα et CXCL11) et M2 (Arg2 et IL10) des macrophages du poisson zèbre par q-RTPCR.. Les valeurs ont été normalisées à ef1a comme gène de référence. Chaque point représente un total de 25 embryons. Un t-test a été réalisé pour évaluer la significativité * p<0,05, ** p<0,01.

Pour répondre à la question du statut de polarisation des macrophages recrutés, deux approches complémentaires nous sont apparues comme pertinentes. *In vitro*, nous avons étudié l'effet du milieu conditionné issu des cellules de glioblastome T98G empty ou T98G cGASOE sur la polarisation des macrophages sur le modèle THP-1 que nous avions déjà validés. Pour cela, nous avons cultivés en parallèle les lignées de glioblastome (T98G empty et T98G. cGASOE) stimulées ou non avec des acides nucléiques (dsDNA) ainsi que des macrophages prédifférenciés (M0). Nous avons ensuite incubé pendant 24h ces macrophages avec le milieu conditionné issu des lignées de glioblastome puis analysé les marqueurs de polarisation par q-RTPCR. Nous avons constaté que le milieu conditionné issu des T98G cGASOE préalablement stimulé par des doubles brins d'ADN induisait davantage l'expression des marqueurs de polarisation caractéristique des macrophages M1 (CXCL10, CD197) que celui issu de la lignée contrôle (Figure 7A). Aucune différence significative n'a pu être établie entre les deux lignées concernant le marqueur de polarisation des macrophages M2 (Fibronectine) (Figure 7B).

Pour compléter ces résultats, nous avons évalué dans un second temps *in vivo* le statut de polarisation des macrophages des embryons de poisson zèbre par q-RTPCR après transplantation des deux lignées de glioblastome. Pour cela, les deux lignées humaines T98G contrôles et cGASOE ont été injectées dans le cerveau des poissons zèbres à 3 dpf. Des poissons contrôles ont également été injectés avec du PBS. Un jour après transplantation, les têtes des poissons ont été isolées du reste du corps puis dissociées avant d'extraire l'ARN messager. Les analyses transcriptomiques des marqueurs de polarisation caractéristiques des macrophages. M1 comme le CXCL11 et TNFa et des marqueurs de polarisation caractéristiques des macrophages M2 comme l'Arg2 et l'IL10 ont été réalisées. De manière similaire, les résultats montrent une augmentation significative des marqueurs de polarisation caractéristiques des macrophages M1 après transplantation des cellules T98G surexprimant cGAS (Figure 7C). L'expression des marqueurs M2 restent quant à elle stable et aucune différence n'est observée entre les deux lignées de glioblastome (Figure 7D).

Ensemble ces résultats *in vitro* et *in vivo* tendent à montrer que les macrophages recrutés sont bien de phénotype M1 (anti-tumoraux) et que la lignée de glioblastome T98G surexprimant cGAS favorise davantage la polarisation vers ce phénotype que la lignée contrôle.

C) Autres résultats : Effet de cGAS sur la réponse aux traitements en modèle sphéroïde 3D

Après avoir évalué l'effet de cGAS sur la croissance tumorale *in vitro* en modèle sphéroïde 3D, nous avons étudié l'effet de cGAS sur la réponse aux traitements en modèle sphéroïde. Dans l'équipe, deux molécules, la camptothécine et le Nu7441, un inhibiteur de DNA-PK, avaient déjà été étudiées sur la lignée T98G en modèle 2D (C. Taffoni). C'est donc tout naturellement que nous nous sommes tournés vers ces deux traitements pour explorer leur effet sur le modèle 3D.

Brièvement, la camptothécine est un inhibiteur sélectif de l'ADN topoisomérase I (Top1), dont les dérivés solubles irinotécan et topotécan sont utilisés dans différents types de cancers. La camptothécine stabilise les complexes de clivage Top1-ADN et induit des cassures double-brin responsable de la toxicité cellulaire (Park 2015)

Concernant, le Nu7441, il s'agit de l'un des inhibiteurs les plus puissants et sélectifs de DNA-PK à ce jour. La protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) est une protéine kinase fortement exprimée dans les cellules humaines, DNA-PK s'est révélée cruciale dans la voie de réponse aux dommages à ADN (DDR), en particulier dans la réparation des cassures double brins. Plus récemment des travaux ont démontré le rôle de DNA-PK et son interconnexion avec la voie cGAS-STING dans l'inflammation (Karpova et al. 2002, Ferguson et al. 2012 ; Burleigh et al. 2020). DNA-PK est une cible prometteuse dans la lutte anti-cancéreuse et de nombreux inhibiteurs ciblant DNA-PK comme le Nu7441 ont été développés. *In vitro*, il a par exemple été démontré que le Nu7441 potentialisait l'effet de la chimiothérapie induisant des dommages à l'ADN dans de nombreuses lignées de cellules cancéreuses (sein, poumon…) (Elliott 2011, Ciszewski 2014, Yanai 2017, Dong 2018). De plus, il a été démontré qu'il augmentait la sensibilité aux radiations et à la chimiothérapie dans les lignées cellulaires de carcinome colorectal (Zhao 2006, Ciszewski 2014). Actuellement de nombreux essais cliniques sont en cours dans le domaine de l'oncologie pour évaluer l'innocuité, la toxicité et le profil pharmacocinétique des inhibiteurs de DNA-PK seuls ou en association avec d'autres traitements.

Pour répondre à cette nouvelle problématique nous avons traités les sphéroïdes 3 jours après leur ensemencement puis avons analysé la survie cellulaire des sphéroïde 7 jours après traitement.

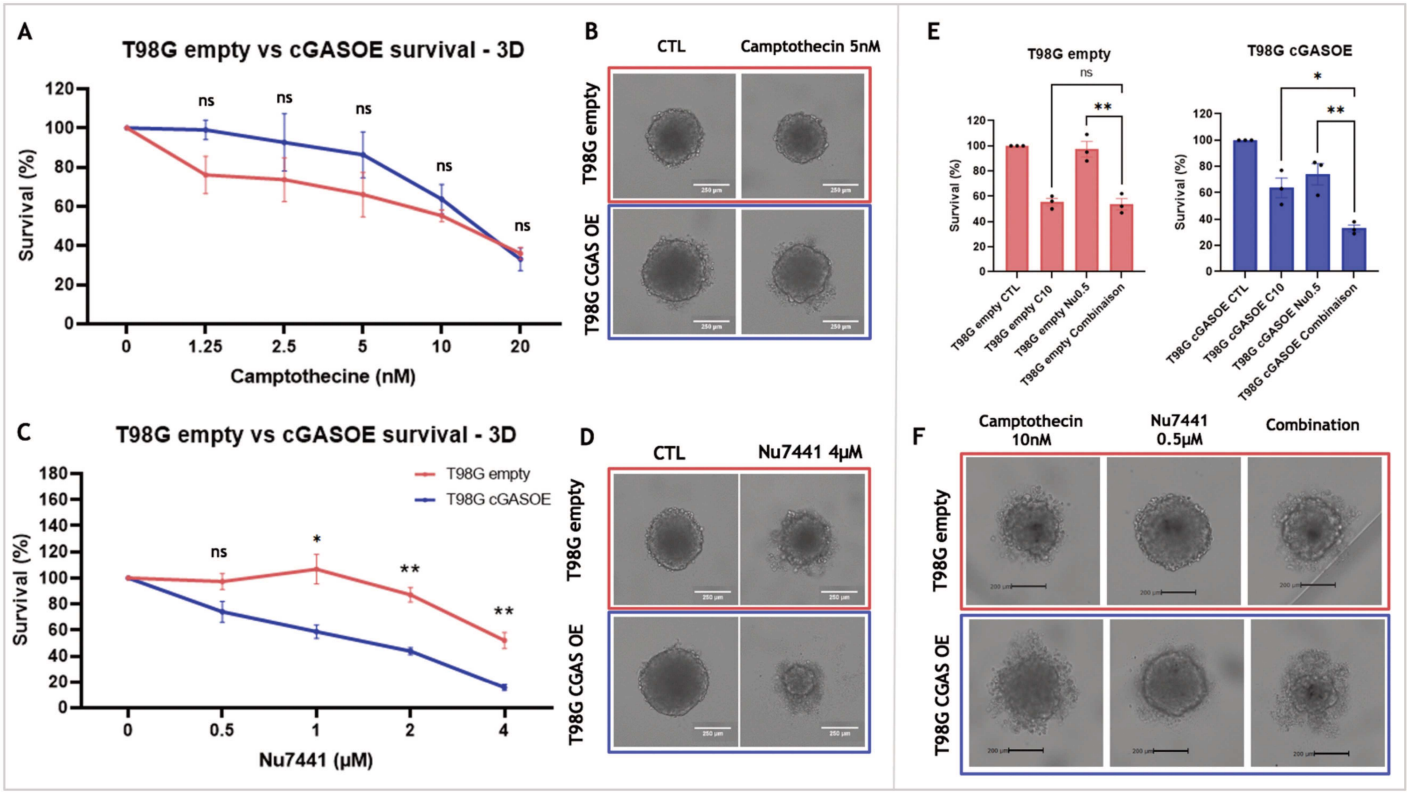


Figure 8 : Effet de cGAS sur la réponse aux traitements

A. Analyse de la survie (%) des T98G empty et cGASOE en sphéroïde en réponse à différentes doses de camptothécine. Les sphéroïdes ont été traité 3 jours après ensemencement. La survie a été évaluée avec le Cell titer Glo à J8. Le graphique représente la moyenne (+SEM), n=3. Un t-test a été réalisé pour évaluer la significativité * p<0,05, ** p<0,01.

B. Images représentatives prises au Celigo à J8 en condition contrôle ou pour une dose de Camptothécine de 5nM.

C Analyse de la survie (%) des T98G empty et cGASOE en sphéroïde en réponse à différentes doses d'inhibiteur de DNA-PK (Nu7441). Les sphéroïdes ont été traité 3 jours après ensemencement. La survie a été évaluée avec le Cell titer Glo à J8. Le graphique représente la moyenne (+SEM), n=3. Un t-test a été réalisé pour évaluer la significativité * p<0,05, ** p<0,01.

D. Images représentatives prises au Celigo à J8 en condition contrôle ou pour une dose de Nu7441 à 4µM.

E. Analyse de la survie (%) des T98G empty et cGASOE en sphéroïde en réponse à la combinaison de camptothécine (10nM) et de Nu7441 (0,5µM). Les sphéroïdes ont été traité 3 jours après ensemencement. La survie a été évaluée avec le Cell titer Glo à J8. Le graphique représente la moyenne (+SEM), n=3. Un t-test a été réalisé pour évaluer la significativité * p<0,05, ** p<0,01.

F. Images représentatives prises au Celigo à J8 avec traitement de camptothécine seul (10nM), de Nu7441 seul (0,5µM) ou après combinaison de camptothécine et de Nu7441.

Effet de cGAS sur la réponse à la camptothécine

Nous avons observé l'effet de cGAS sur la réponse à la camptothécine. Nos résultats montrent que les deux lignées répondent de manière identique à la camptothécine. Il n'existe pas de différence significative entre les deux lignées pour des doses de camptothécine comprises entre 1,25nM et 20nM (Figure 8A-B). Ainsi, l'absence ou la présence de cGAS ne semble pas influer pas sur la réponse à la campthothécine.

Effet de cGAS sur la réponse à l'inhibiteur de DNA-PK

Nous avons également exploré l'effet de cGAS sur la réponse à l'inhibiteur de DNA-PK. Nos résultats montrent que la lignée surexprimant cGAS est beaucoup plus sensible à l'inhibiteur de DNA-PK que la lignée contrôle en particulier pour des doses supérieures ou égales à 1µM (Figure 8C-D). La présence de cGAS semble donc influer sur la réponse à l'inhibiteur de DNA-PK. Le fait que les cellules régulent à la baisse l'expression de cGAS les rend plus résistantes à l'inhibiteur de DNA-PK. Cette différence pourrait s'expliquer par le mécanisme d'action de l'inhibiteur de DNA-PK (Nu7441). En effet, des résultats *in vitro* (C. Taffoni) semblent montrer que le Nu7441 induit des cassures doubles brins et génèrent des fragments d'ADN doubles brins dans le cytosol des cellules traitées. Ainsi cette différence pourrait s'expliquer par la reconnaissance de ces fragments d'ADN par cGAS dans les cellules T98G surexprimant cGAS qui activent la voie de signalisation et la production d'interférons de type I qui mène à terme à la sénescence cellulaire (Yang et al. 2017). Cependant, la réponse reste entière quant à l'absence de différence de réponse à la camptothécine qui induit elle aussi des cassures doubles brins.

Effet de la combinaison des deux traitements (Camptothécine et inhibiteur de DNA-PK)

Nous avons ensuite étudié l'effet combiné des deux traitements, la camptothécine et inhibiteur de DNA-PK sur les deux lignées de glioblastome. Nous avons observé qu'à une dose de 10nM de camptothécine et 0,5 µM de Nu7441, les deux lignées ne réagissaient pas de la même manière (Figure 8E-F). En effet, la lignée T98G surexprimant cGAS est plus sensible à la combinaison des deux traitements que la lignée contrôle. Une synergie semble exister dans ce cas précis ce qui n'est pas le cas dans la lignée T98G contrôle.

D) Article 1 : Modélisation 3D du microenvironnement tumoral *in vivo* : un outil pour prédire le devenir du cancer

Format « Brief communication » – Méthode
Publié sur BioRxiv le 23 septembre 2021

Résumé

Récemment, de nombreuses études ont démontré le rôle fondamental du microenvironnement tumoral (TME) dans la progression du cancer. Ici, nous décrivons une méthode de pointe pour visualiser en 3D le comportement des tumeurs dans les embryons de poisson zèbre. Nous mettons en évidence deux acteurs majeurs du microenvironnement. tumoral, les macrophages et les vaisseaux. Cet outil précieux est transposable à l'imagerie de xénogreffes de cellules de patients (PDX) afin de prédire le devenir des tumeurs malignes en fonction de la dynamique de leur microenvironnement.

Intérêt des travaux

Au cours des dernières décennies, le modèle du poisson zèbre est apparu comme l'un des modèles les plus pertinents pour l'étude du cancer *in vivo*. Cependant, les travaux déjà publiés reposent principalement sur l'utilsation d'images 2D. Grâce aux outils informatiques disponibles, il nous semblait primordial de générer un modèle 3D capable de prendre en compte le microenvironnement tumoral afin d'étudier son évolution au cours du temps et son impact sur la progression tumorale. Cela nous a conduit à la mise au point d'un modèle de glioblastome et de mélanome intégrant le microenvironnement tumoral chez le poisson zèbre. Ici, nous démontrons la faisabilité de la modélisation en 3D de la dynamique du microenvironnement tumoral au niveau cellulaire. Grâce à cette méthode, nous ouvrons la voie à une meilleure compréhension de la modification du microenvironnement tumoral *in vivo* en visualisant en temps réel la coopération entre différents types cellulaires comme les macrophages, les vaisseaux au cours de la progression tumorale. Cette méthode s'inscrit directement dans une démarche plus globale de médecine de précision.

Modelling 3D tumour microenvironment *in vivo:* a tool to predict cancer fate

AUTHORS

J. Marines [1,2,3], F. Lorenzini [1,3], K. Kissa [4], L. Fontenille [1§]

AFFILIATIONS

[1] AZELEAD, 377 rue du Pr Blayac, 34080 Montpellier, France

[2] Institut de Génétique Humaine, CNRS, Université de Montpellier, Molecular Basis of Inflammation Laboratory, Montpellier, France

[4] LPHI, CNRS, INSERM, Univ Montpellier, Montpellier, France - Multiscale analysis of blood stem cells production *in vivo*

[3] These authors contributed equally to this work

[§]Correspondence should be addressed to laura.fontenille@azelead.com

ABSTRACT

Recently, many studies demonstrated the fundamental role of tumour microenvironment (TME) in cancer progression. Here, we describe a state-of-the-art method to visualize in 3D the behaviour of tumours in zebrafish embryos. We highlight two major actors of TME, macrophages and vessels. This valuable tool is transposable to Patients Derived Xenograft imaging in order to predict the fate of malignant tumours according to the dynamics of their TME.

The TME characterisation has become over the years a major topic in the understanding of tissue tumorigenesis and the development of treatments. The tumour niche is a very dynamic region where different cell types coexist and interact with cancer cells and condition their fate[1]. Among them, vessels play an important role as a pathway for cancer dissemination[2] and, at the same time, for oxygen and nutrient supply [3]. Similarly, the recruitment and infiltration of several types of immune cells in the tumour such as macrophages, neutrophils and lymphocytes have been described as having a direct impact on cancer progression [4]. Finally, the composition of the tumour niche is nowadays used as a mean of diagnosis and indicator of good or bad prognosis [5 6]. Therefore, the 3D dynamics visualization of the tumour microenvironment appears as a predictive tool of cancer cell behaviour in terms of intravasation, invasiveness and metastasis. To this end, extensive efforts are currently made to explore 3D reconstruction of human cancer biopsies[7 8]. However, to study in detail the molecular and cellular mechanisms of cancer progression, innovative methods based on *in vivo* models are essentials.

The use of *in vitro* immortalized cell lines has been the gold standard for many years. However 2D and 3D culture models remain limited by the number of co-cultured cell types which do not sufficiently account for the complexity of the TME [9]. Thus, *in vivo* models are crucial to reliably reproduce the interactions between different cell types. In recent years, zebrafish embryos have emerged as a relevant tool in oncology. The simple

manipulation, the low cost of rearing and the wide range of genetic manipulations make it one of the most pertinent tools for cancer *in vivo* studies. In addition, its transparency allows to image and visualize in real time conserved cellular processes involved in tumour dissemination as well as interactions between cancer cells and their microenvironment [10]. Xenograft of human cancer cells in zebrafish embryos have been widely used to model different types of cancer [11]. Indeed, due to the immaturity of its adaptive immune system at the embryonic stage, rejection after transplantation of human cancer cells is prevented [12]. Over the last decades, several teams have characterized the types of interactions between xenografted human cancer cells and macrophages in the zebrafish embryo [13 14]. Furthermore, the interaction between cancer cells and vessels has been intensively studied. Processes such as angiogenesis and vessel co-option reported in patients are conserved after xenografting glioblastoma and melanoma into the zebrafish embryo [15 16]. The feasibility of simultaneous imaging of three different populations in the yolk sac using two zebrafish reporter lines has been shown [17]. However, 3D and 4D visualization of macrophages and surrounding vessels in the TME has never been modelled.

Here we report for the first time a cutting-edge methodology to visualize in 3D live imaging the interaction between tumour microenvironment and cancer cells to study cancer fate. To validate and demonstrate the reproducibility of our approach, two different 3D cancer models were established. In order to follow and predict the tumour's fate, fluorescent human glioblastoma (U87) and human melanoma (A375) cell lines were engineered and transplanted into the midbrain and swim bladder of early-stage zebrafish embryos. Using two zebrafish transgenic reporter lines, *Tg(kdrl:gfp)* and *Tg(mfap4:RFP)*, we were able to simultaneously study the behaviour of macrophages and vessels in contact with human cancer cells and the fate of the latter.

The general method consists of five steps synthesized in the Fig. 1A. The workflow includes the generation of the stable fluorescent blue lines, the embryos and cells preparation, the xenotransplantation procedure, the image and video acquisition followed by analysis using Fiji and Imaris software. One day after transplantation, we visualised the recruitment of macrophages around glioblastoma (Fig. 1 C) and melanoma tumour (Fig 1 H). Using the Imaris Software, we reconstructed in 3D, the tumour mass and the TME, including the macrophage population and vasculature (Fig 1 F, K). From the 2D images and Z-stack we observed that recruited macrophages interact with cancer cells. However, only 3D visualisation allows to characterize the physical orientation of macrophages around the tumour and their infiltration inside the tumour mass (Sup. Video 1 and 2). In addition, thanks to time-lapse images, the dynamics of macrophages was monitored in 4D (Sup. Video 3 and 4). Long-contact between macrophages and glioblastoma cancer cells are visualised, suggesting an intense communication between the two types of cells (Sup. Video 3). Recently the pro-tumoral role of macrophages in zebrafish glioblastoma and melanoma models has been demonstrated [13 18]. Quantifying the number of macrophages and following their dynamics in time and space will unravel the steps leading to the evolution of the tumour and the appearance of cancerous metastases.

We also investigated tumour vasculature evolution, a crucial player in TME. One or two days after cancer cell transplantation, we observed angiogenesis and vessel co-option phenomena. We observed dramatic changes in vessel morphology upon contact with human glioblastoma and melanoma cells. Proximity to human

glioblastoma cells directly influences vessel dilation and shape (Fig 2 B,C,G,H and Sup Video 4). The 3D reconstructions highlight the abnormal tortuosity of the vessels (Fig 2 D) and their infiltration within (Fig 2 I and Sup Video 4) the tumour. In the melanoma model, the cancer cells induce neoangiogenesis (Fig 2 L, M). The 3D reconstruction allowed visualization of infiltrated new vessel inside the tumour mass (Fig 2 N and Sup. Video 5). Interestingly, in both cancer models, we observed vessel co-option (Fig 2 J, T), with cancer cells beginning to migrate following the vessels as a dissemination route as described in the literature[2]. Thus, our method allows real-time visualization of tumor dissemination with the migration of cancer cells along the vessels. Simultaneously vessel morphology changes that promote tumor growth can be monitored. Real-time observation of vessel dynamics within the tumour is a valuable tool for the selection of new anti-tumour compounds such as anti-angiogenic treatments.

Moreover, Figure 2 N-O shows the evolution of macrophage shape and orientations in space, from horizontal to vertical orientation, which allows their migration following the vasculature inside the tumour niche. Thus, considering the importance of macrophages in tumour angiogenesis[19] the 3D reconstruction gives an insight of the crosstalk between these immune cells and vessels in the promotion of tumour progression.

Here we demonstrate the feasibility of modelling in 3D the dynamics of the TME at cellular and tissular level. Thanks to our methods, we pave the way for a complex understanding of the TME architecture modification *in vivo* by visualising the co-operation of specific cellular types such as macrophages and vessels, during the tumour progression. This method can be implemented by using other zebrafish transgenic lines to study other TME players such as neurons [20]. At the same time, this tool can be applied to study other cancer types according to the different human cell lines used and the injection site. In this perspective, the 3D modelling of Patients Derived Xenografts (PDXs) in zebrafish embryos, would help clinicians in the treatment decision. Combining in the same model different colours allow to study the involvement of different cellular types in one embryo, saving time by performing less experiments thus decreasing experimental procedures cost. This is in line with the increased attention on the ethical guidelines. Finally with the exponential interest in precision medicines, this time-efficient and reliable method, consisting in 3D modelling of TME in zebrafish embryos, will represent a powerful tool to predict tumour fate in patients and to screen new efficient therapies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank V. Diakou and E. Jublanc from MRI platform for their help during image acquisition and image analysis. This work was supported by Agence Nationale de Recherche Technologie (ANRT), NEUcrest-ITN Project (EU's Horizon 2020 grant No. 860635) and AZELEAD.

AUTHOR

JM, FL, LF designed the experiments. JM, FL performed the experiments. JM, FL, KK and LF wrote the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

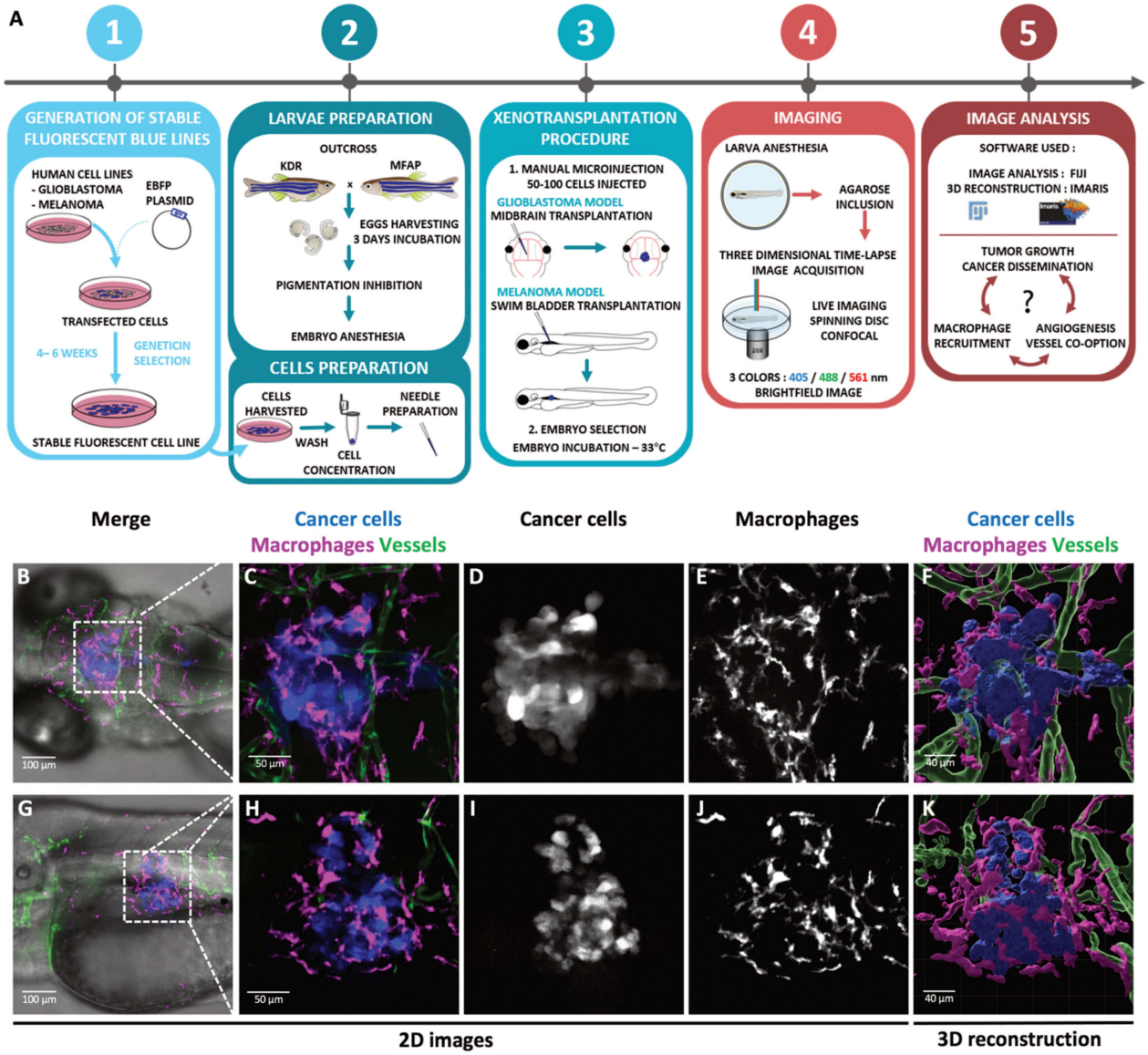
The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

1. Baghban, R. *et al.* Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. doi:10.1186/s12964-020-0530-4
2. Zhang, Y., Wang, S. & Dudley, A. C. Models and molecular mechanisms of blood vessel co-option by cancer cells. *Angiogenesis* **23**, 17–25 (2020).
3. Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. & Kojiro, M. Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management* **2**, 213–219 (2006).
4. Gajewski, T. F., Schreiber, H. & Fu, Y. X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology* **14**, 1014–1022 (2013).
5. Huang, S. *et al.* Identification of Immune Cell Infiltration and Immune-Related Genes in the Tumor Microenvironment of Glioblastomas. *Front. Immunol.* **11**, 2708 (2020).
6. Ladányi, A. Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research* **28**, 490–500 (2015).
7. Sabdyusheva Litschauer, I. *et al.* 3D histopathology of human tumours by fast clearing and ultramicroscopy. *Sci. Rep.* **10**, 1–16 (2020).
8. Hong, S. M. *et al.* Three-dimensional visualization of cleared human pancreas cancer reveals that sustained epithelial-to-mesenchymal transition is not required for venous invasion. *Mod. Pathol.* **33**, 639–647 (2020).
9. Hoarau-Véchot, J., Rafii, A., Touboul, C. & Pasquier, J. Halfway between 2D and animal models: Are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *International Journal of Molecular Sciences* **19**, (2018).
10. Lieschke, G. J. & Currie, P. D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics* **8**, 353–367 (2007).
11. Xiao, J., Glasgow, E. & Agarwal, S. Zebrafish Xenografts for Drug Discovery and Personalized Medicine. *Trends in Cancer* **6**, 569–579 (2020).
12. Novoa, B. & Figueras, A. Zebrafish: Model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **946**, 253–275 (2012).
13. Hamilton, L., Astell, K. R., Velikova, G. & Sieger, D. A Zebrafish Live Imaging Model Reveals Differential Responses of Microglia Toward Glioblastoma Cells In Vivo. doi:10.1089/zeb.2016.1339
14. Wang, J. *et al.* Novel mechanism of macrophage-mediated metastasis revealed in a zebrafish model of tumor development. *Cancer Res.* **75**, 306–315 (2015).
15. Lal, S., La Du, J., Tanguay, R. L. & Greenwood, J. A. Calpain 2 is required for the invasion of glioblastoma cells in the zebrafish brain microenvironment. *J. Neurosci. Res.* **90**, 769–781 (2012).
16. Zhao, C. *et al.* A Novel Xenograft Model in Zebrafish for High-Resolution Investigating Dynamics of Neovascularization in Tumors. *PLoS One* **6**, e21768 (2011).
17. Mealiea, D. *et al.* Modeling oncolytic virus dynamics in the tumor microenvironment using zebrafish. *Cancer Gene Ther.* doi:10.1038/s41417-020-0194-7
18. Roh-Johnson, M. *et al.* Macrophage-Dependent Cytoplasmic Transfer during Melanoma Invasion In Vivo. *Dev. Cell* **43**, 549-562.e6 (2017).
19. Britto, D. D. *et al.* Macrophages enhance Vegfa-driven angiogenesis in an embryonic zebrafish tumour xenograft model. *DMM Dis. Model. Mech.* **11**, (2018).
20. Shurin, M. R., Shurin, G. V., Zlotnikov, S. B. & Bunimovich, Y. L. The Neuroimmune Axis in the Tumor Microenvironment. *J. Immunol.* **204**, 280–285 (2020).

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1. Experimental workflow and 3D glioblastoma and melanoma TME reconstruction.



A. The method is composed of five successive steps. Blue glioblastoma (GBM) and melanoma fluorescent human cancer cell lines, (U87 and A375 respectively) were firstly generated (1). For this purpose, GBM cells and melanoma cells were transfected with a EBFP2 plasmid and selected during several weeks using Geneticin (1). Then, cells and embryos were prepared prior to transplantation (2). GBM cells were transplanted in the midbrain and melanoma cells in the swim-bladder of 3dpf embryos (3). Imaging and time-lapse were performed at 24h or 48h post transplantation (4). Image analysis was achieved using Fiji and Imaris software (5).

B-K. Each cell population is highlighted with a coded color; cancer cells in blue or white, macrophages in magenta or white, and vessels in green.

B-E. Visualization of GBM TME in the midbrain of zebrafish embryo at 4dpf and 24h post transplantation. Images represent a Z projection of 67 slices.

G-J. Visualization of Melanoma TME in the swim-bladder of zebrafish embryo at 4dpf and 24h post transplantation. Images represent a Z projection of 74 slices.

F,K. 3D reconstruction of tumors infiltrated by macrophages and vessels.

E,J. A High number of macrophages are recruited all around the tumor sites.

Figure 2. Analysis of 3D TME reconstruction and vessel dynamics: a predictive tool for tumor fate

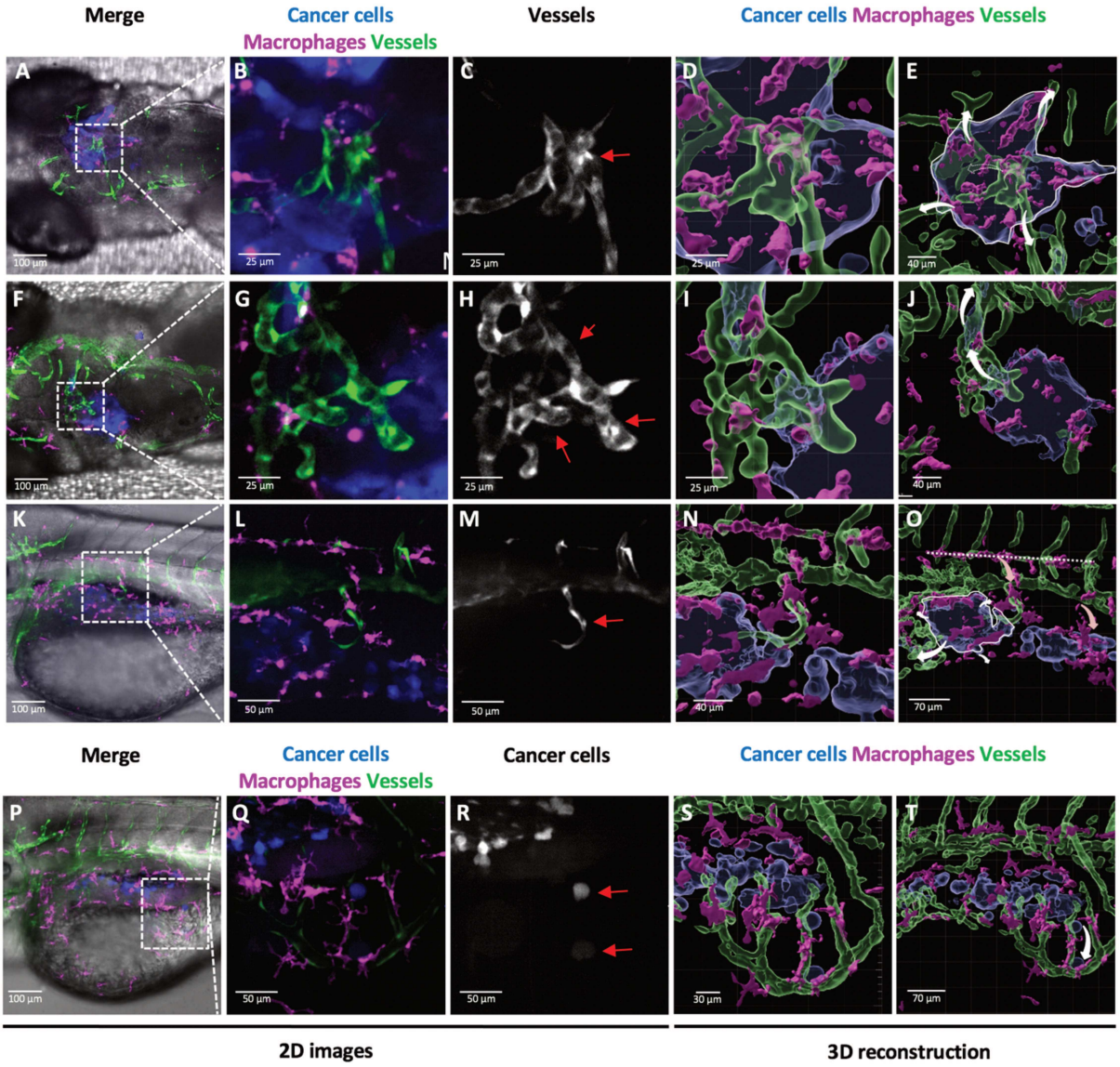


Figure 2. Analysis of 3D TME reconstruction and vessel dynamics: a predictive tool for tumor fate

A-T. Each cell population is highlighted with a coded color; cancer cells in blue or white, macrophages in magenta or white, and vessels in green or white as shown in the images. The arrows in 3D reconstructions represent the prediction of tumor fate (white arrow) and macrophage fate (light-red arrow).

A-E. Z stack projection (A-C) and reconstruction (D-E) of the glioblastoma TME live imaging 48 hours after transplantation. **B-D.** The images show vessel dilatation in the center of the tumor mass (**C**, red arrow). **E.** The white arrow in the 3D reconstruction represents the prediction of tumor growth.

F-J. Z stack projection (F-H) and reconstruction (I-J) of the glioblastoma TME live imaging 48 hours after transplantation. Images represent a Z projection (Z=30 slices) of the TME. **H**. Vessel angiogenesis in contact with the tumor mass (red arrow). **I-J**. 3D reconstruction showing cancer cells migration through the vessels in the upper left corner. **J**. The white arrow represents the predicted route of cancer dissemination regarding vessel localization.

K-O. Z stack projection (K-M) and reconstruction (N-O) of the melanoma TME live imaging 24 hours after transplantation. Images represent a Z projection (Z=74 slices) of the TME. **L-M**. Neo-angiogenesis is shown with a new vessel redirected inside the tumor mass (red arrow). **N**. Macrophages are recruited at the tumor site following the new growing vessel. **O**. The horizontal dashed line represents macrophages orientation outside the

tumor site. The light-red arrows represent the orientation of the macrophage migration. The white arrows represent the predicted route of cancer cells dissemination regarding vessel localization.

P-T. Z stack projection (P-R) and reconstruction (S-T) of the melanoma TME live imaging 24 hours after transplantation. Images represent a Z projection (Z=74 slices) of the TME. **R**, In the images two cancer cells detach from the primary mass following the vessels (red arrows). **T**, The white arrow represents cancer cell migration and dissemination from primary mass.

LEGENDS SUPPLEMENTARY VIDEOS

Supplementary Video 1: Navigation inside a 3D glioblastoma reconstruction to visualize macrophage recruitment and vessel organization.

U87 human glioblastoma cells (blue) and its microenvironment such as macrophages (magenta) and vessels (green) are observed in the video. Human glioblastoma cells are transplanted in the midbrain region of zebrafish embryo at 3dpf, the video represents the glioblastoma TME 24h post transplantation. Macrophages are recruited all around the tumour mass and display close contact with glioblastoma cells suggesting an intensive communication between both populations.

Supplementary Video 2: Navigation inside a 3D melanoma reconstruction to visualize macrophage recruitment.

Human A375 melanoma cells (blue), macrophages (magenta) and vessels (green) are observed in the video. Human melanoma cells are transplanted in the swim bladder of a zebrafish embryo at 3dpf. The video represents the melanoma TME at 24h post transplantation. The navigation inside the TME 3D reconstruction allows to visualize the massive presence of macrophages around and inside the tumour mass.

Supplementary Video 3: Macrophage dynamics in the glioblastoma tumour microenvironment.

4D time-lapse reconstruction of U87 glioblastoma cells (blue) and macrophages (magenta). Human glioblastoma cells are transplanted in the midbrain region of zebrafish embryo at 3dpf, the video represents the glioblastoma TME at 24h post transplantation. The time Interval between two images is 7 min. Two macrophages behavioural dynamics is highlighted. Macrophages in contact with glioblastoma cells (white arrowhead) tends to have a low motility profile that allows long lasting contact between the two populations. On the opposite, peripheral macrophages (yellow arrowhead), distant from the tumor are more dynamic.

Supplementary Video 4: Glioblastoma TME dynamics.

4D time-lapse reconstruction of U87 glioblastoma cells (blue) and its microenvironment such as macrophages (magenta) and vessels (green). Human glioblastoma cells are transplanted in the midbrain region of a zebrafish embryo at 3dpf, the video represents the glioblastoma TME 24h post transplantation. The time Interval between two images is 7 min. The reconstruction allows the visualisation of vessel (white arrow) inside the core of tumour mass. Image acquisition allows to visualise at the same time multiple events such as mitosis (yellow asterisk *) and macrophage migration along vessels (white arrowhead). The spatial position of the cancer mass in the TME is fundamental to understand the mechanistic role of vessels.

Supplementary Video 5: Navigation inside a 3D melanoma reconstruction to visualize vessel dynamics.

Human A375 melanoma cells (blue), macrophages (magenta) and vessels (green) are observed in the video. Human melanoma cells are transplanted in the swim bladder of a zebrafish embryo at 3dpf, the video represents the melanoma TME 24h post transplantation.
The navigation inside the 3D reconstruction allows to visualize the dynamics of neo-angiogenic events. The spatial position of the cancer mass in the TME is fundamental to understand the mechanistic role of vessels. The video highlights the presence of a neo-growing-vessel inside the tumour mass located in the swim bladder where normally there is no vascular system. The specific localization of the vessel inside the tumour using the 3D reconstruction permit to predict the growth of the tumour itself.

MATERIAL AND METHODS

Animal rearing

Adult zebrafish (*Danio rerio*) were maintained on a 12/12 h light/dark cycle in a partially recirculating system and fed 3 times/day with fresh Artemia salina and dry food. Outcross of homozygous transgenic zebrafish lines *tg(KDR:eGFP)* and *tg(mfap4:RFP)* were used to perform cell transplantations. All experimental procedures on zebrafish were performed in accordance with the European guidelines and regulations on Animal Protection from the French Ministry of Health (F341725).

Cell culture maintenance

Human glioblastoma cancer cell line, U87 WT, was purchased at ATCC (U-87 MG ATCC® HTB-14™). Human melanoma cancer cell line, A375 WT, was kindly provided by A. Pelegrin from IRCM - Montpellier. U87 and A375 cells were cultured in DMEM (Eurobio scientific) supplemented with 1% L-glutamine 200mM (Eurobio scientific), 1% Penicillin/Streptomycin (Eurobioscientific #CABPES01-0U) and 10% foetal bovine serum (Eurobio scientific) at standard conditions of 5% CO2, at 37°C. Cells were cultured in 100mm Petri dish (Corning) and split twice a week when they reached 80-90% confluency.

Generation of stable fluorescent human cancer cell lines

To obtain U87-eBFP+ (blue fluorescent protein) and A375-eBFP+ cells, U87 WT and A375 cells were stably transfected with EBFP2-N1 plasmid using Phosphate calcium. EBFP2-N1 was a gift from Michael Davidson (Addgene plasmid #54595). One day before transfection, cells were plated in 6 well plates. EBFP2-N1 purified plasmid (4µg) was transfected using 2.5M CaCl2 reagent. 24h after transfection, complete DMEM medium was replaced. eBFP+ cells were selected using Geneticin (800-1000µg/mL) diluted in DMEM media during 4-6 weeks before starting *in vivo* experiments.

Embryo and cell preparation prior to xenotransplantation

Embryos were initially maintained at 28 °C at a maximum density of 50 embryos per Petri dish in fish water supplemented with 0.0002% methylene blue (Sigma) as an antifungal agent. After 24h, embryos were placed in fish water containing 200µM Phenylthiourea (PTU) to prevent embryo pigmentation and allow fluorescent imaging acquisition.

Glioblastoma cells (U87-eBFP+) and melanoma cells (A375-eBFP+) were harvested from a 100mm petri dish the day of xenograft transplantation. Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and detached using Trypsine-Versene EDTA (Eurobio scientific) at 37°C for 5 min. Trypsine-versene was inactivated by complete DMEM media and cells were pelleted (1000rpm-5min) then washed with PBS. Finally, cells were resuspended in 50µL PBS to ensure highly concentrated cell preparation.

Xenotransplantation of human cancer cell lines

Borosilicate glass capillaries (O.D.: 1 mm, I.D.: 0,75 mm, Sutter Instrument) were pulled using glass micropipette puller (Sutter Instrument). Capillaries were filled with 10 µL of cells suspension. Injection was performed under a stereomicroscope (Leica M80 Stereo zoom microscope) using a micromanipulator (Narishige) and oil manual microinjector (Cell Tram Vario Eppendorf). Before xenografting, embryos were anesthetized in 0.16 mg/ml PBS/Tricaine (MS-222) then tidily aligned laterally for melanoma or dorsally for glioblastoma transplantation. Embryos were maintained in position during injection using forceps. Melanoma cells were transplanted in the swim bladder, while glioblastoma cells were transplanted in the midbrain region. Between 50 to 100 cells were transplanted per embryo. Transplanted embryos were maintained at 33°C in fish water containing PTU.

3D and 4D live-imaging acquisition

A fluorescence stereomicroscope (AXIO Zoom.V16 Zeiss) equipped with eBFP filter was used for phenotypic selection of xenotransplanted embryos. Embryos with fluorescent tumor mass in the swim bladder or in the brain were selected for image/time lapse acquisition. 4 or 5 dpf (1- or 2-days post transplantation) anaesthetized embryos were mounted laterally or dorsally in 0,7% low melting point agarose (Life Technologies) in a 35mm fluorodish covered with fish water containing Tricaine. Images and time-lapse were acquired at 33°C using a Confocal spinning disk ANDOR coupled to a Nikon Ti Eclipse microscope (Objectives: 20x/0.75). 405/488/561 lasers were used with appropriate filters. For time-lapse, images were taken each 7 minutes with 1µm z-step interval.

Image analysis

Images and time lapse were processed using Fiji and Imaris software. Images were smoothened and brightness/contrast was adjusted using Fiji software over all z-stacks. Maximum projections were generated using Fiji software. Segmentation and 3D reconstructions of macrophages, vessels and cancer cells were performed using Imaris Software 9.5. Supplementary videos were recorded using the same software.

E) Article 2 : Caractérisation d'un modèle de glioblastome chez le poisson zèbre et étude du rôle des macrophages dans la progression tumorale par imagerie en temps réel.

Résumé

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont démontré le rôle fondamental du microenvironnement tumoral (TME) dans la progression du glioblastome (GBM). Ici, nous avons caractérisé avec précision un modèle de glioblastome chez l'embryon de poisson zèbre en quantifiant la croissance tumorale, le caractère invasif et la dissémination des cellules cancéreuses grâce à la reconstruction 3D. Au sein du microenvironnement tumoral, le rôle des macrophages dans la progression du cancer a été étudié en détail grâce à l'analyse approfondie des macrophages et de leur interaction avec les cellules tumorales. Pour cela, nous avons exploré le recrutement, la dynamique et les changements morphologiques des macrophages. Enfin, nous avons donné de nouvelles preuves attestant de la persistance d'un rôle anti-tumoral précoce des macrophages grâce à la visualisation des cellules cancéreuses apoptotiques et de l'infiltration d'agrégats macrophagiques.

Intérêt des travaux

Après avoir présenté la méthodologie nous permettant de générer un modèle 3D de glioblastome dans l'embryon du poisson zèbre, nous avons voulu aller plus loin dans sa caractérisation. En quatre jours seulement, nous avons observé une croissance moyenne de 82% de la tumeur ainsi que la conservation des capacités invasives des cellules de glioblastome humaines. Contrairement aux modèles murins qui nécessitent plusieurs semaines de croissance, nous proposons ici un modèle 3D robuste, reproductible et rapide pour l'étude de la prolifération tumorale, de l'invasivité et de la dissémination des cellules cancéreuses. Dans le glioblastome, les macrophages représentent la population cellulaire majoritaire et peuvent atteindre jusqu'à la moitié des cellules de la masse tumorale (Hambardzumyan et al. 2016). Cela nous a poussé à étudier le recrutement, la dynamique et la morphologie des macrophages ainsi que l'étude des interactions entre macrophages et cellules cancéreuses. Nous avons observé une augmentation significative du nombre de macrophages recrutés autour de la tumeur au cours du temps et une diminution de leur motilité. Ici, nous rapportons pour la première fois des preuves d'une fonction phagocytaire antitumorale conservée à un stade précoce du développement tumoral chez le poisson zèbre. L'intérêt du modèle développé a permis l'étude de la corrélation entre croissance tumorale et comportement des macrophages. Le modèle est un outil puissant pour la connaissance de la maladie et le criblage de nouvelles thérapies anticancéreuse.

Characterization of a larval zebrafish glioblastoma model and investigation of macrophage role in tumour progression by live imaging

Authors : J. Marines[12], F. Lorenzini[1], J. Le Friec[1], N. Do Khoa[1], K. Kissa[3*], L. Fontenille[1*]

[1] AZELEAD, 377 Rue du Professeur. Blayac, 34080 Montpellier, France

[2] Institut de Génétique Humaine, CNRS, Université de Montpellier, Molecular Basis of Inflammation Laboratory, Montpellier, France

[3] LPHI, CNRS, INSERM, Univ Montpellier, Montpellier, France

[*]Co-last authors

Abstract: Over the last decades, many studies demonstrated the fundamental role of tumour microenvironment (TME) in glioblastoma (GBM) cancer progression. Here, we developed a promising U87-GBM zebrafish model allowing the tumour growth quantification, invasiveness and dissemination in real time through 3D reconstructions images. In the context of TME, the role of macrophages in cancer progression was studied in detail through the analysis of macrophages and GBM interactions. For this purpose, we investigated macrophages recruitment, dynamics and morphological changes upon different types of interactions with glioblastoma cells. Finally, we gave novel insights of the presence of an early anti-tumoral role of macrophages through the visualization of macrophage aggregates infiltration and apoptotic cancer cells.

Key words: Zebrafish, glioblastoma, macrophages, microglia, tumour microenvironment, live imaging, 3D reconstruction

INTRODUCTION

Glioblastomas (GBM) are defined as the most common and aggressive form of gliomas (Gusyatiner & Hegi, 2018) of the central nervous system. Despite multimodal approaches including surgery, chemotherapy and radiotherapy, the median survival of patients is around 15 months (Stupp et al. 2005, Thakkar et al. 2014). This can be explained by the intrinsic nature of these tumours which are highly aggressive and proliferative.

Importantly, over the past decades, the tumour microenvironment (TME) appears to be crucial for cancer progression. GBM TME is composed of malignant and non-malignant cells including vascular endothelial cells, pericytes, fibroblasts as well as resident or infiltrating immune cells. In particular, macrophages associated to glioblastoma (GAMs) represent the major cell population that can reach up to half of the cells of the tumour mass (Hambardzumyan et al. 2016). More importantly, numerous studies have shown a direct correlation between the infiltration density of tumor associated macrophages (TAMs) and patient prognosis. A high macrophage infiltration is associated with a poor prognosis in many cancers such as glioblastoma (Takeya et al. 2016, Bingle et al. 2002; Li and Graeber 2012).

Macrophages are key component of the innate immune system. Following their infiltration into the tissues and under the influence of the local microenvironment, macrophages can differentiate into different subtypes. Conventionally, a dichotomic view divided them in two subpopulations. On one hand, M1, called

"classically activated macrophages" are pro-inflammatory cells characterized by high phagocytic ability and high antigen presentation capacity. On the other part, M2 called "alternative macrophages" display an anti-inflammatory phenotype, characterized by high possibility to resolve inflammation and contribute to tissue remodelling. Interestingly, TAM's phenotype can change during tumorigenesis. In early-stage tumours, TAMs are more inflammatory and tumoricidal (M1) with cytotoxic function and phagocytic activity that limit tumour growth (Biswas et al. 2008; Mantovani et al. 2013). However, as the tumour progresses and becomes more established, the macrophages shift towards an M2 phenotype that promotes a deleterious immunosuppressive microenvironment responsible of multiple pro-tumoral functions (Gabrilovich et al. 2012). GBM develops mechanisms to exploit the intrinsic functional plasticity of macrophages and microglia to facilitate tumour growth (Hambardzumyan et al., 2016, Prionisti et al., 2019) and evade immune surveillance. In this context, the M2 macrophages contribute to the progression of GBM, by promoting survival, invasion, reorganization of the extracellular matrix, resistance to chemotherapy and angiogenesis (Prionisti et al., 2019, Hambardzumyan et al., 2016, Coniglio et al., 2012, Zhai et al., 2011, Hamilton et al., 2016; Qian and. Pollard 2010; Zhang et al. 2016). Thus, further studies are essential to understand the specific role of macrophages in cancer progression with the final goal to develop innovative therapies.

In cancer research, the use of *in vitro* immortalized cell lines has been the gold standard for many years. However, 2D and 3D *in vitro* models failed to reproduce the complexity of the TME. Over the last decades, zebrafish (*Danio rerio*) emerged as an alternative model to mouse models in oncology. Thanks to its strong homology with human counterpart, its rapid development and transparency that allow high content imaging the zebrafish embryo became a reliable model to study cancer and innate immune response (Renshaw and Trede, 2012). In particular, it became relevant for larval xenotransplantation studies, because only the innate immune system is detectable and functional at one day (Herbomel et al. 1999, 2001) whereas the adaptive immune system is fully functional after 4 to 6 weeks (Novoa and Figueras, 2012, Davidson and Zon, 2004). This is particularly relevant in oncological studies, because it prevents rejection after transplantation of human cancer cells in larval zebrafish without needing immunosuppressive treatments.

Thanks to Imaging technologies, important progress have been made in the live-imaging of transparent zebrafish embryos (Renaud et al. 2011 ; He et al. 2020). Moreover, the zebrafish model allows to visualize and monitor in real time individual cell populations. For this purpose, many reporter transgenic lines were generated and are now available to visual TME players such as macrophages, neutrophils and vessels (Ellett, Pase, Hayman, Andrianopoulos and Lieschke 2011 ; Walton et al. 2015 ; Lawson et Weinstein 2002a). This makes possible to investigate cellular processes, like epithelial-mesenchymal transition (EMT), tumour proliferation, neovascularization processes, metastatic dissemination and cancer-cells/macrophages interactions (Umans et al. 2020; Zeng et al. 2017; Lal et al. 2012; Nicoli et al. 2017; Hamilton et al. 2016; Astell et al. 2017).

Over the past decades, several teams have used U87 cell line to model GBM in zebrafish embryos. Interactions between xenografted human cancer cells and macrophages in the zebrafish embryo have also been investigated (Hamilton et al.2016, Astell et al. 2017). However, GBM model and macrophage-glioma interactions have never been fully characterized and 3D reconstruction of glioblastoma TME has never been used for this goal.

In the present study, we developed a U87-GBM zebrafish model permitting tumour growth imaging, invasiveness and dissemination in real time through 3D reconstructions images. We also went further in the investigation of macrophage and GBM interactions, macrophage dynamics and morphology. For this purpose, we analysed macrophages recruitment and defined different types of interactions. Finally, we highlighted an early anti-tumoral role of macrophages through visualization of apoptotic cancer cells and macrophage aggregates infiltration.

RESULTS

In order to finely characterize the glioblastoma-macrophage interactions, we developed a glioblastoma zebrafish model. This method is summarized in the figure 1A and consists of five steps as previously described in Marines *et al*, 2021. The workflow includes the generation of the stable glioblastoma fluorescent blue line using U87 human cell line, the embryos and cells preparation, the xenotransplantation procedure and the image and video acquisition followed by analysis using Fiji and Imaris software for 3D reconstruction.

3D modelling and characterization of U87-GBM model *in vivo*

In order to use our cancer model for further analysis, the first step to complete was the characterization of the zebrafish U87-GBM model. For this purpose, after xenotransplantation procedure, we daily monitor transplanted embryos from one day (D1) to 4 days (D4) post transplantation using a confocal microscope. This allowed us to characterize and monitor tumour growth in individualised embryo. As it was reported by several teams before (Vittori et al. 2015; Hamilton et al. 2016), we observed that human glioblastoma (U87) cells can proliferate in zebrafish brain embryos (Fig1B). Thanks to Z-stack images acquisition we were able to reconstruct in 3D the tumour mass with a high-resolution level (Fig. 1C). Interestingly, the 3D visualisation gives more information about the tumour architecture and the organisation of cancer cells compared to the 2D images. For example, we observed that over the time, cancer cells seem to be more aggregated with a densification of the tumour. Using these images, we confirmed and quantified tumour growth from D1 to D4. We daily monitored tumour area for each embryo (Fig 1D) and normalised it to D1 (Fig 1E). We observed a significant increase from D1 to D4 with a mean tumour area at D1 of 6496 µm² to 10938 µm² at D4 (***p=0,0002). The normalization to D1 demonstrated an increase of tumour growth of +29% at D2, +48% at D3 (p=0,0061) and +83% at D4 (p=0,0002). These tumour growth percentages are coherent with one of the studies mentioned before (Hamilton and al. 2016) where they observed a similar increase from D0 to D4.

To further characterize our model, we analysed U87-GBM cells morphology and invasive capacities. Thanks to 2D images and 3D reconstruction we observed that the morphology of some cancer cell changes over the days after transplantation procedure (Fig 2A). Indeed, one day after transplantation cells display a round/ellipsoidal morphology. After few days, we noticed the presence of cancer cells that appear more elongated with processes (Fig 2A) which can suggest EMT. This events demonstrate that zebrafish brain microenvironment is relevant to induce human EMT transition of GBM cancer cells. Moreover, we noticed that some cells escape from primary tumour mas, as it shown in 2D projection and 3D reconstruction images. To quantify this invasive cell capability, we manually counted the number of invasive cancer cells per embryos (Fig

2B). We observed a significative increase of invasive cells from D1 to D4 with respectively 0,77 to 3,77 invasive cancer cells per embryo (*p=0,0115). More interestingly, we observed that the invasive cells were following blood vessels (Fig. 2C and Fig 2D) as it was previously mentioned (Lal et al. 2012). In this case, vascular system serves as a route for GBM cancer cells dissemination inside the brain. Together, these results show that human GBM cells can proliferates in zebrafish brain embryo, suggesting that zebrafish brain microenvironment is particularly adapted and can mimic the human microenvironment counterpart by favouring tumour proliferation, invasiveness and dissemination. This made the zebrafish model a pertinent model to study GBM *in vivo*.

Once characterization U87-GBM cells in zebrafish brain embryo was completed, we focused our attention on macrophages behaviour. As previously mentioned, macrophages and microglia are key players in GBM TME. However, the number of publications studying macrophages-GBM interactions in zebrafish model remains limited (Hamilton et al. 2016, Astell et al. 2017). To overcome this, we investigated in detail macrophages recruitment, interactions with cancers cells, their morphology, dynamics and infiltrative properties.

Macrophage recruitment & GBM-macrophages interactions

Firstly, we analysed the evolution of macrophage recruitment around tumour mass. For this purpose, Z-stack confocal images of individualised embryos from D1 to D4 post transplantation were taken (Fig 3A). Macrophages in contact with cancer cells were defined as “recruited macrophages” and manually counted by moving in all the Z-stack. We observed a significant increase of recruited macrophages around the tumour from D1 to D4, from 3,16 macrophages (D1) to 12,66 macrophages (D4) (fig 3B) (*p=0,0105). Similarly, when we report this number to the total macrophage number in the brain region, the ratio of recruited macrophage increased from 11,5% at D1 to 36,59% at D4 (**p=0,0021) (Fig 3C). This is particularly visible in 3D reconstruction images (Fig 3A) that allow better visualisation of GBM-macrophages interactions. Secondly, we questioned if transplantation of GBM cells in the brain could have an impact on the total number of macrophages in the brain region and increased macrophage mitosis or peripheral macrophages recruitment. We observed that from D2 to D4 no significant differences in the total number of macrophages between CTL embryos and GBM transplanted embryos, suggesting that GBM transplantation doesn’t impact the recruitment of peripheral macrophages or increase macrophage mitosis process at this stage (Fig 3D). In zebrafish, these observations suggest that human GBM cell transplantation attract local macrophages and impact their distribution without affecting their division.

Once we observed that macrophages were recruited and interacted with cancer cells, we identified different types of macrophages interactions. We defined 4 different types of interactions depending on macrophage shape and total surface in contact with GBM cell (Fig 3E). We observed “close-contact” interaction from amoeboid macrophage (Upper left), “Finger-touched contact” interaction, characterized by a reduced contact surface, from an elongated macrophage process that touch GBM cell (Upper right). “Multiple contacts” interaction was defined when one macrophage could interact with several processes to one or more cancer cells (bottom left). Finally, “surrounding contacts” interaction was defined when a cancer cells was wrapped by a macrophage, with a large surface contact (bottom right). Further analysis would be necessaries to understand if these macrophages contacts are correlated with a specific function.

Dynamics and morphology of macrophages

We analysed the dynamic profile of macrophages in contact or not with GBM tumour mass during tumour growth. The idea was to investigate whether GBM cancer cells can impact the dynamic profile of macrophages. To do so, we generated 5-minutes time lapse images. After acquisition, we manually tracked between 10 and 12 macrophages in contact with the tumour and we subdivided them in two groups, « tumor recruited macrophages » or « tumor non-recruited macrophages ». The mean distance travelled per 5 minutes and the mean motility was calculated. As shown in figure 4 A, we observed that the distance travelled in 5 minutes by recruited macrophages at D3 was significantly lower compared to the non-recruited macrophages (****p<0,0001). Thus, macrophage motility was significantly reduced (Fig 4B) (****p<0,0001). We also defined an immobility index by counting the number of macrophages pauses in the interval time-lapse. A pause was considered when the distance travelled by the macrophage in 5 minutes was inferior to 1µm and we observed that recruited macrophages significantly do more pauses than non-recruited macrophages (Fig 4C). This result suggests the presence of an intense and complex communication between macrophages and GBM cells.

Then, we explored macrophage morphology at 2- and 3-days post transplantation. For this purpose, we defined 4 macrophage morphologies: amoeboid (round macrophages without processes), intermediate (macrophages with short or few processes), ramified (mature macrophages with several and long processes) and elongated (macrophages moving in one direction) (Fig 4D). We firstly compared the morphology of total macrophages between control embryos and GBM xenotransplanted embryos. Globally, we observed a different distribution of macrophage morphology between control and xenotransplanted embryo at D2 (*** pvalue=0,0002) and D3 (**** pvalue<0,0001). As previously defined by Svahn et al. 2013, in control embryos, we observed a switch from intermediate to ramified morphology between D2 and D3 post transplantation. Interestingly, in transplanted embryo, this macrophage morphology switch didn't occur and macrophages maintained an intermediate morphology (Fig 4D) suggesting that human glioblastoma cells affect the maturation of brain macrophages between D2 and D3. Moreover, amoeboid macrophage were still present at D3 in xenotransplanted embryos compared to CTL embryos, where amoeboid macrophages were completely absent. Next, we looked at recruited macrophage morphology and, from D1 to D3, we observed a decrease of amoeboid and elongated morphology and an increase of intermediate and ramified morphology (Fig 4F). These results show that human GBM cells can both impact macrophages morphology and dynamics properties.

Together all these analyses give new information and details about the number and ratio of macrophages recruited, the different types of GBM-macrophages interactions, the dynamics and macrophage morphology.

Insight into an early anti-tumoral macrophage function: Apoptotic cancer cells & infiltrative macrophages

Intriguingly, on the contrary to what was already reported in literature (Hamilton et al. 2016), we identified some evidence of anti-tumoral macrophage functions in early-stages tumour. By analysing tumour growth (Fig 1.E), we noticed that, in 2 embryos, tumour didn't increase from D1 to D2 (-4% and -15% decrease). In these 2 embryos, we observed a massive macrophage infiltration inside the tumour mass in comparison to the other embryos where tumour increased of +28% (Fig 5B). On the opposite, tumours with a high tumour

growth rate tend to have less macrophages recruited at D2 (Fig 5A). This suggest that at an early stage (D2) these macrophages were more antitumoral. Moreover, by looking at 2D and 3D reconstruction images, we noticed that, in this context, macrophages were highly aggregated and infiltrating (Fig 5B). We hypothesize that this macrophage infiltration could be link to tumour density. With these observations, we can balance previous results from Hamilton and al. 2016, where no infiltrative macrophages were observed in U87 tumour.

Interestingly, we also observed multiples intracytoplasmic vacuoles in transplanted GBM cancer cells. These cells, visible after transplantation, were no more present the following days, suggesting that they were engulfed and eliminated by macrophages. Furthermore, these cancer cells were swelling with an increase size area around 4 times bigger compared to normal cancer cells. These massive vacuoles are visible in 2D images and 3D reconstruction (Fig 5C). We also observed fragmented cells forming apoptotic bodies. These swelling and fragmented cells were called “apoptotic cells” in the analysis. Apoptotic cancer cells with at least one visible vacuole in their cytoplasm were manually counted on Fiji by moving in all the Z-stack from D1 to D4. We observed a significant increase of the apoptotic cancer cells at D3 compared to D1 from 1,6 to 5,66 apoptotic cells per embryo (*p=0,0311). These observations suggest that these cancer cells were still viable the day of transplantation. More interestingly, we noticed that macrophages were interacting with these apoptotic cells, wrapping them with the probable final aim to phagocyte them. Similarly, when we quantified the number of macrophages in contact with these cells, we found that the increase of apoptotic cells was correlated with an increase of macrophage contacts. These observations suggest an anti-tumoral role of these specific macrophages that was not mentioned before in U87-GBM zebrafish model.

DISCUSSION

Over the last decades, zebrafish model appears as one of the most relevant models to study glioblastoma. However, these studies are mainly based on 2D images. In this work, we highlight the potential of using 3D reconstruction to explore tumour architecture and interconnexion between cancer cells and macrophages, present in the TME. We quantified tumour growth and invasiveness of U87-GBM cells over 4 days in zebrafish brain embryos. Focusing on proliferation rate of U87-GBM cells and their invasive capacities, zebrafish brain microenvironment appears particularly adapted to mimic the human microenvironment counterpart by favouring tumour proliferation, invasiveness and dissemination with vessel association. The conservation of these events confirmed the reliability and the relevance of the zebrafish model as a pertinent model to study GBM *in vivo*. In comparison with mouse model, zebrafish provide a fast tool to monitor and visualise in real-time tumor progression. Moreover, orthotopic cancer cells transplantation in zebrafish embryos is easier and necessitate less biological and technical material compared to their murine counterpart.

As mentioned in the literature, GBM, cancer cells have developed several mechanisms to exploit the intrinsic functional plasticity of macrophages and microglia to facilitate tumour growth (Hambardzumyan et al., 2016, Prionisti et al., 2019). In GBM zebrafish models, the pro-tumoral role of macrophages has been shown, by depleting macrophages and using CSF1R inhibitor (Hamilton et al. 2016). However, in this model, macrophage antitumoral functions has not been shown. Here, we reported for the first time some evidence of a conserved

anti-tumoral phagocytic function at an early-stage tumour development. With our observations we visualized macrophages aggregates infiltration and apoptotic cancer cells, suggesting that the anti-tumoral role of some macrophage subpopulation is still conserved. This made us to consider that macrophage interactions with GBM cells are more complex as what expected, and that macrophage populations could be in a balance of pro-tumoral and anti-tumoral functions. Indeed, even if some macrophages phagocyte and eliminate some glioblastoma cells, their low number doesn't manage to inhibit global proliferation and invasive properties of U87 cells. To go further on this question, it could be interesting to study in detail the macrophage polarization status through cellular identification of different macrophages subpopulations in GBM tumor microenvironment. Do macrophages in contact with apoptotic cancer cells present M1- like status? This could be assessed by live imaging using M1 zebrafish transgenic lines (Nguyen et al. 2015), in-situ-hybridization methods or by transcriptomic analysis, performing for example q-RTPCR.

Finally, our reliable model could be efficiently used to screen new molecules and repolarizing macrophage agents, with the final goal to increase the proportion of macrophage with anti-tumoral functions that could inhibit tumour growth and cancer cell dissemination.

MATERIAL AND METHODS

Animal rearing

Zebrafish (*Danio rerio*) strains were raised and maintained under standard conditions [1]. The homozygous transgenic zebrafish line tg(mfap4:RFP) and tg(kdr:eGFP) were used. Incross or outcross of these two lines were performed to obtain the double transgenic line. All experimental procedures on zebrafish were performed in accordance with the European guidelines and regulations on Animal Protection from the French Ministry of Health (F341725).

Cell culture maintenance

Human glioblastoma cancer cell line, U87 WT, was purchased at ATCC (U-87 MG ATCC® HTB-14™). U87 cells was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Eurobio scientific) supplemented with 1% L-glutamine 200mM (Eurobio scientific), 1% Penicillin/Streptomycin (Eurobioscientific #CABPES01-0U) and 10% foetal bovine serum (FBS) (Eurobio scientific) at standard conditions of 5% CO2, at 37°C. Cells were cultured in 100mm Petri dish (Corning) and split twice a week when they reached 80-90% confluency as described previously (Marines et al 2021).

Generation of stable fluorescent human cancer cell lines

To obtain U87-eBFP+ (blue fluorescent protein) cells, U87 WT cells were stably transfected with EBFP2-N1 plasmid using Phosphate calcium. EBFP2-N1 was a gift from Michael Davidson (Addgene plasmid #54595). One day before transfection cells were plated in 6 well plates (Corning). EBFP2-N1 purified plasmid (4µg) was transfected using 2.5M CaCl2 reagent. 24h after transfection, complete DMEM medium was replaced. eBFP+ cells were selected using Geneticin (800-1000µg/mL) diluted in DMEM media during 4-6 weeks before starting *in vivo* experiments.

Embryo and cell preparation prior to xenotransplantation

Embryos were initially maintained at 24-28°C at a maximum density of 50 embryos per Petri dish in fish water supplemented with 0.0002% methylene blue (Sigma) as an antifungal agent. After 24h, embryos were placed in fish water containing 200µM Phenylthiourea to prevent embryo pigmentation and allow fluorescent imaging acquisition. Glioblastoma cells (U87-eBFP+) were harvested from a 100mm petri dish the day of xenograft transplantation. 70-80% confluent cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and detached using Trypsine-Versene EDTA (Eurobio scientific) at 37°C for 5 min. Trypsine-versene was inactivated by complete DMEM media and cells were pelleted (1000rpm-5min) then washed with PBS. Cells were finally resuspended in 50µL PBS to ensure highly concentrated cell preparation.

Xenotransplantation of human cancer cell lines

Borosilicate glass capillaries were used to perform injection under a stereomicroscope (Leica M80 Stereo zoom microscope) using a micromanipulator (Narishige) and oil manual microinjector (Cell Tram Vario Eppendorf).

Before xenografting, embryos were anesthetized in 0.16 mg/ml PBS/Tricaine (MS-222) then tidily aligned dorsally for glioblastoma transplantation. Glioblastoma cells were transplanted in the midbrain region. Between 50 to 100 cells were transplanted per embryo. After transplantation an intermediate temperature of 33°C was chosen to ensure proper zebrafish development and human cancer cell proliferation.

Live-imaging acquisition

A fluorescence stereomicroscope (AXIO Zoom V16 Zeiss) equipped with eBFP filter was used for phenotypic selection of xenotransplanted embryos. Embryos with fluorescent tumour mass in the midbrain were selected for image/time lapse acquisition and individualised. From 1 to 4 days post transplantation, embryos were anaesthetized and mounted dorsally in 0,7% low melting point agarose (Life Technologies) in a 35mm fluorodish covered with fish water containing Tricaine. Images and time-lapse were acquired using a LSM 510 Meta Zeiss confocal microscope (Objectives: 40x/0.7 and 10X/1). 405/488/543 lasers were used with appropriate filters. Images were taken with 1µm z-step interval to a total Z-stack of 90-130µm depending on tumor size. For time-lapse acquisition, images were taken each 5 minutes during 35-40minutes with 4.83µm z-step interval.

Image analysis and statistical analysis

Images and time lapse were processed using Fiji and Imaris software. Images were smoothened and brightness/contrast was adjusted using Fiji software over all z-stacks. Maximum projections were generated using Fiji software. Segmentation and 3D reconstructions of macrophages and cancer cells were performed using Imaris Software 9.5. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 8.

Tumour growth, invasiveness and apoptotic cell analysis

To estimate tumour growth, Z-projection were performed using Fiji. A threshold was then applied in Fiji for each embryo from D1 to D4 to determine tumour area. Tumour area was then normalized to D1 for each embryo to evaluate tumour growth of U87 cell line. To estimate invasiveness, the elongated cells or invading cells that escape primary mass were manually counted on Fiji by moving in all the Z-stack. For apoptotic cancer cell analysis, cancer cells with at least one visible vacuole in their cytoplasm were manually counted on Fiji by moving in all the Z-stack.

Macrophage analysis

For macrophage recruitment analysis, macrophages in contact with tumour mass were considered as recruited macrophages and manually counted on Fiji by moving in all the Z-stack. Total macrophages in the brain region were also manually counted by moving in all the Z-stack.

For macrophage dynamic analysis, recruited macrophages and non-recruited macrophages were individually tracked on Fiji with Manual tracking plugin. Between 10-12 macrophages of each populations were followed from 3 independent embryos at D3 post transplantation. The mean distance travelled per 5 minutes and the mean motility was calculated. Immobility index was estimated by counting the number of macrophages pauses

in the interval time-lapse. A pause was considered when the distance travelled by the macrophage in 5 minutes was inferior to 1µm.

Morphological analysis was performed at D3 post transplantation. We defined 4 macrophages morphology. Macrophages were manually counted as amoeboid (round macrophages without processes), intermediate (macrophages with short or few processes), ramified (mature macrophages with several and long processes) or elongated macrophage (macrophages moving in one direction).

Acknowledgements

This work was supported by Agence Nationale de Recherche Technologie (ANRT) and AZELEAD.

Author

JM, LF, KK designed the experiments. JM performed the experiments. JM, JLF and NDK analysed the experiments. JM, FL, KK and LF wrote the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES

Astell KR, Sieger D. Investigating microglia-brain tumor cell interactions in vivo in the larval zebrafish brain. *Methods Cell Biol*. 2017;138:593-626. doi:10.1016/bs.mcb.2016.10.001

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*. 2002;196(3):254-265. doi:10.1002/path.1027

Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol*. 2008;180(4):2011-2017. doi:10.4049/jimmunol.180.4.2011

Coniglio SJ, Eugenin E, Dobrenis K, et al. Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. *Mol Med*. 2012;18(1):519-527. Published 2012 May 9. doi:10.2119/molmed.2011.00217

Davidson AJ, Zon LI. The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene*. 2004;23(43):7233-7246. doi:10.1038/sj.onc.1207943

Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):253-268. Published 2012 Mar 22. doi:10.1038/nri3175

Gusyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. *Semin Cancer Biol*. 2018;51:50-58. doi:10.1016/j.semcancer.2017.11.010

Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*. 2016;19(1):20-27. doi:10.1038/nn.4185

Hamilton L, Astell KR, Velikova G, Sieger D. A Zebrafish Live Imaging Model Reveals Differential Responses of Microglia Toward Glioblastoma Cells In Vivo. *Zebrafish*. 2016;13(6):523-534. doi:10.1089/zeb.2016.1339

He S, Tian Y, Feng S, et al. In vivo single-cell lineage tracing in zebrafish using high-resolution infrared laser-mediated gene induction microscopy. Elife. 2020;9:e52024. Published 2020 Jan 6. doi:10.7554/eLife.52024

Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. *Development*. 1999;126(17):3735-3745.

Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol*. 2001;238(2):274-288. doi:10.1006/dbio.2001.0393

Lal S, La Du J, Tanguay RL, Greenwood JA. Calpain 2 is required for the invasion of glioblastoma cells in the zebrafish brain microenvironment. *J Neurosci Res*. 2012;90(4):769-781. doi:10.1002/jnr.22794

Li W, Graeber MB. The molecular profile of microglia under the influence of glioma. *Neuro Oncol*. 2012;14(8):958-978. doi:10.1093/neuonc/nos116

Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013;229(2):176-185. doi:10.1002/path.4133

J. Marines, F. Lorenzini, K. Kissa, L. Fontenille, Modelling 3D tumour microenvironment in vivo: a tool to predict cancer fate bioRxiv 2021.09.23.461461; doi: https://doi.org/10.1101/2021.09.23.461461

Nguyen-Chi M, Laplace-Builhe B, Travnickova J, et al. Identification of polarized macrophage subsets in zebrafish. Elife. 2015;4:e07288. Published 2015 Jul 8. doi:10.7554/eLife.07288

Nicoli S, Ribatti D, Cotelli F, Presta M. Mammalian tumor xenografts induce neovascularization in zebrafish embryos. Cancer Res. 2007;67(7):2927-2931. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4268

Novoa B, Figueras A. Zebrafish: model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2012;946:253-275. doi:10.1007/978-1-4614-0106-3_15

Prionisti I, Bühler LH, Walker PR, Jolivet RB. Harnessing Microglia and Macrophages for the Treatment of Glioblastoma. *Front Pharmacol*. 2019;10:506. Published 2019 Jun 5. doi:10.3389/fphar.2019.00506

Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39-51. doi:10.1016/j.cell.2010.03.014

Renaud O, Herbomel P, Kissa K. Studying cell behavior in whole zebrafish embryos by confocal live imaging: application to hematopoietic stem cells. Nat Protoc. 2011;6(12):1897-1904. Published 2011 Nov 10. doi:10.1038/nprot.2011.408

Renshaw SA, Trede NS. A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. *Dis Model Mech*. 2012;5(1):38-47. doi:10.1242/dmm.007138

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330

Takeya M, Komohara Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe?. *Pathol Int*. 2016;66(9):491-505. doi:10.1111/pin.12440

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(10):1985-1996. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0275

Umans RA, Ten Kate M, Pollock C, Sontheimer H. Fishing for Contact: Modeling Perivascular Glioma Invasion in the Zebrafish Brain. ACS Pharmacol Transl Sci. 2020;4(4):1295-1305. Published 2020 Dec 17. doi:10.1021/acsptsci.0c00129

Vittori M, Motaln H, Turnšek TL. The study of glioma by xenotransplantation in zebrafish early life stages. *J Histochem Cytochem*. 2015;63(10):749-761. doi:10.1369/0022155415595670

Zeng A, Ye T, Cao D, et al. Identify a Blood-Brain Barrier Penetrating Drug-TNB using Zebrafish Orthotopic Glioblastoma Xenograft Model. Sci Rep. 2017;7(1):14372. Published 2017 Oct 30. doi:10.1038/s41598-017-14766-2

Zhai H, Heppner FL, Tsirka SE. Microglia/macrophages promote glioma progression. *Glia*. 2011;59(3):472-485. doi:10.1002/glia.21117

Zhang M, Hutter G, Kahn SA, et al. Anti-CD47 Treatment Stimulates Phagocytosis of Glioblastoma by M1 and M2 Polarized Macrophages and Promotes M1 Polarized Macrophages In Vivo. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153550. Published 2016 Apr 19. doi:10.1371/journal.pone.0153550

Fig.1: Experimental workflow and tumour growth.

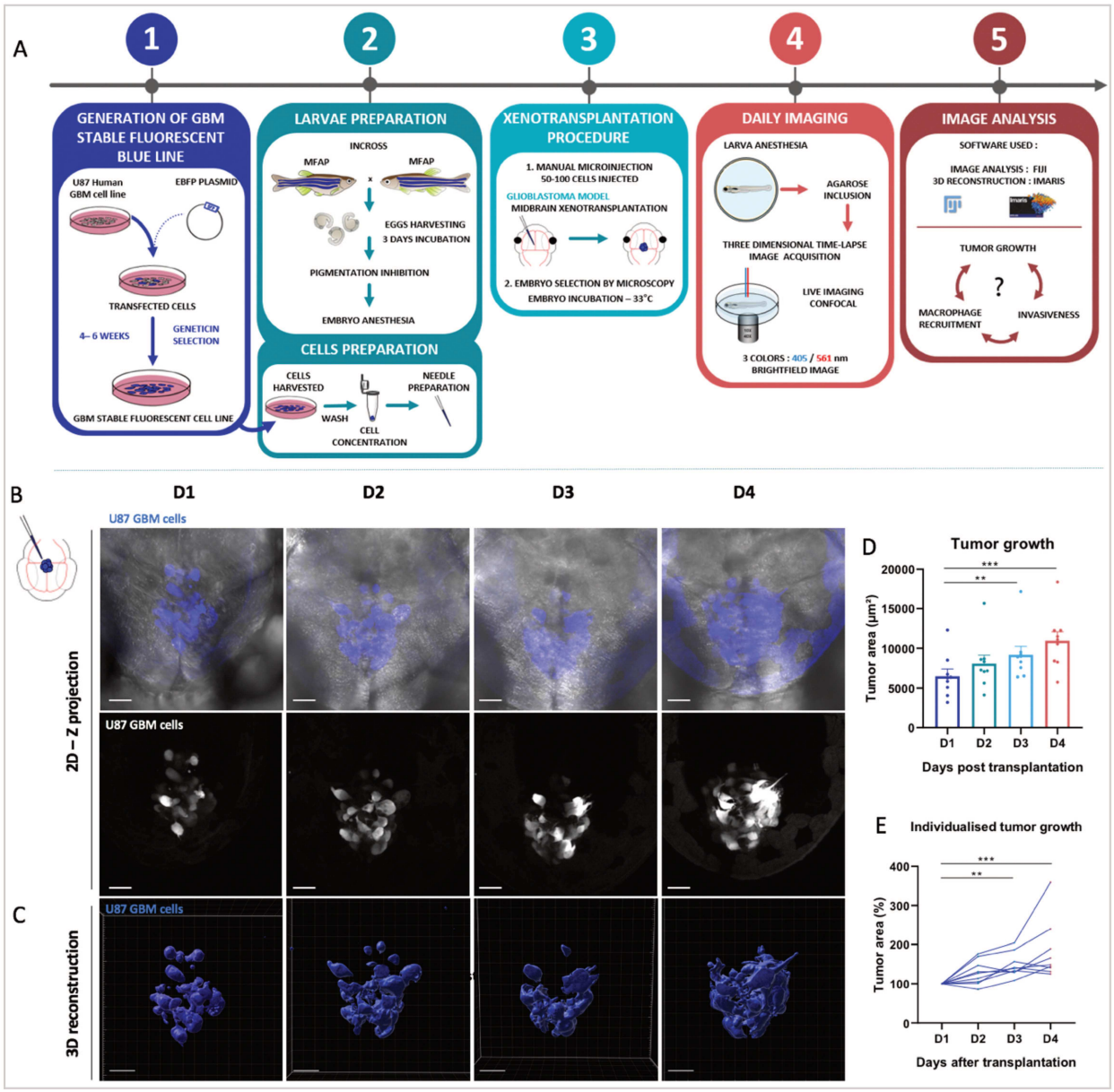


Fig.1: Experimental workflow and U87-GBM tumour growth.

A: The method is composed of five different steps. Blue glioblastoma fluorescent human cancer cell line (U87) was firstly generated. For this purpose, GBM cells were transfected with a EBFP2 plasmid and selected during several weeks using Geneticin. Then, cells and embryos were prepared prior to transplantation. GBM cells were transplanted in the midbrain of 3dpf embryos. Imaging and time-lapse were performed from 1-day post transplantation (D1) to 4 days post transplantation (D4). Image analysis was achieved using Fiji and Imaris software.

B: Cancer cells (blue or white) are shown in the images from D1 to D4 post transplantation. Images represent Z projection (Z=84-112 slices in total). Last images represent 3D reconstruction of tumour mass. Scale bar = 40µm.

C: Visualization of GBM 3D reconstruction in the midbrain of zebrafish embryo from D1 to D4 post transplantation. Scale bar = 40µm.

D-E: Tumour growth representation. Each day, the tumour growth of individualized embryo was monitored from D1 to D4 post transplantation. The tumour area was estimated on Fiji after Z-projection of the entire tumour mass (80-130 slices).

D. Tumour area was estimated in µm².

E. Daily tumour area was normalized to D1.

Statistical analysis was performed in Graphpad. Data in D and E represent the mean (±SEM), n = 9. Friedman test has been performed to evaluate the significance* p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Fig2: Invasiveness and dissemination of U87-GBM cells *in vivo*

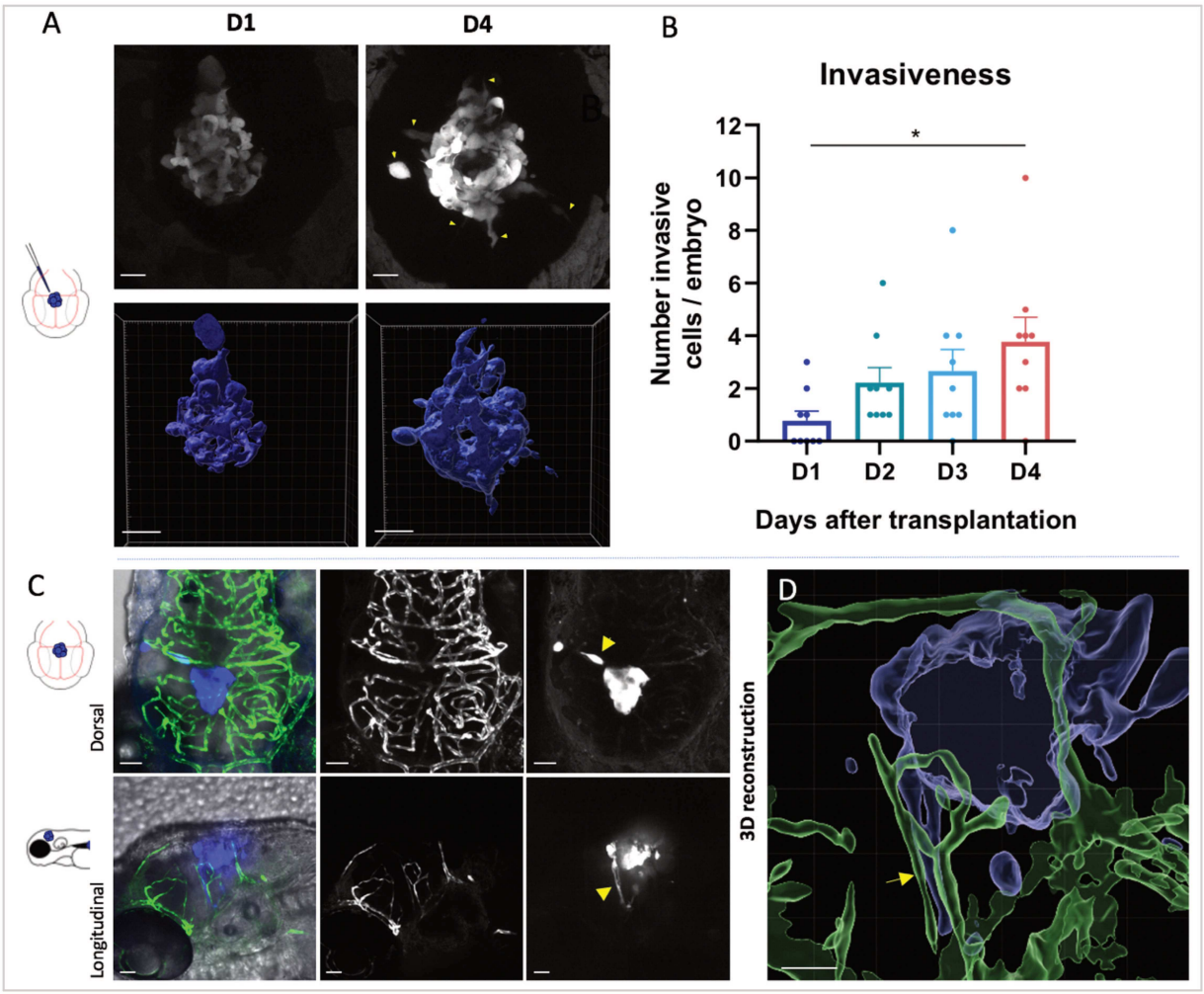


Fig2: Invasiveness and dissemination of U87-GBM cells *in vivo*

A: Cancer cells (blue or white) are shown in the images at D1 and D4 post transplantation. First line of images represent Z projection (97-120 slices in total) of GBM cancer cells. Yellow arrowheads show invasive cells that escape from primary mass. Second line represent 3D reconstruction of tumour mass. Scale bar = 40µm (First line) / Scale bar = 50µm (second line).

B: Graph representation of GBM cancer cell invasiveness. Invasive cells per embryo were counted manually and monitored each day following transplantation from D1 to D4. Statistical analysis was performed in Graphpad. Data in B represent the mean (±SEM), n = 9. Friedman test has been performed to evaluate the significance* p<0,05.

C: Cancer cells (blue or white) and vessels (green or white) are shown in the images. First line represents dorsal view of 1dpt embryos, second line represents longitudinal view of 2dpt embryos. Scale bar = 50µm.

D. 3D reconstruction of GBM cells (blue) and vessels (green) after 2dpt. GBM cells are migrating along vessels as a route of dissemination (yellow arrow). Scale bar = 40µm.

Fig.3: Macrophage recruitment and GBM-macrophages interactions

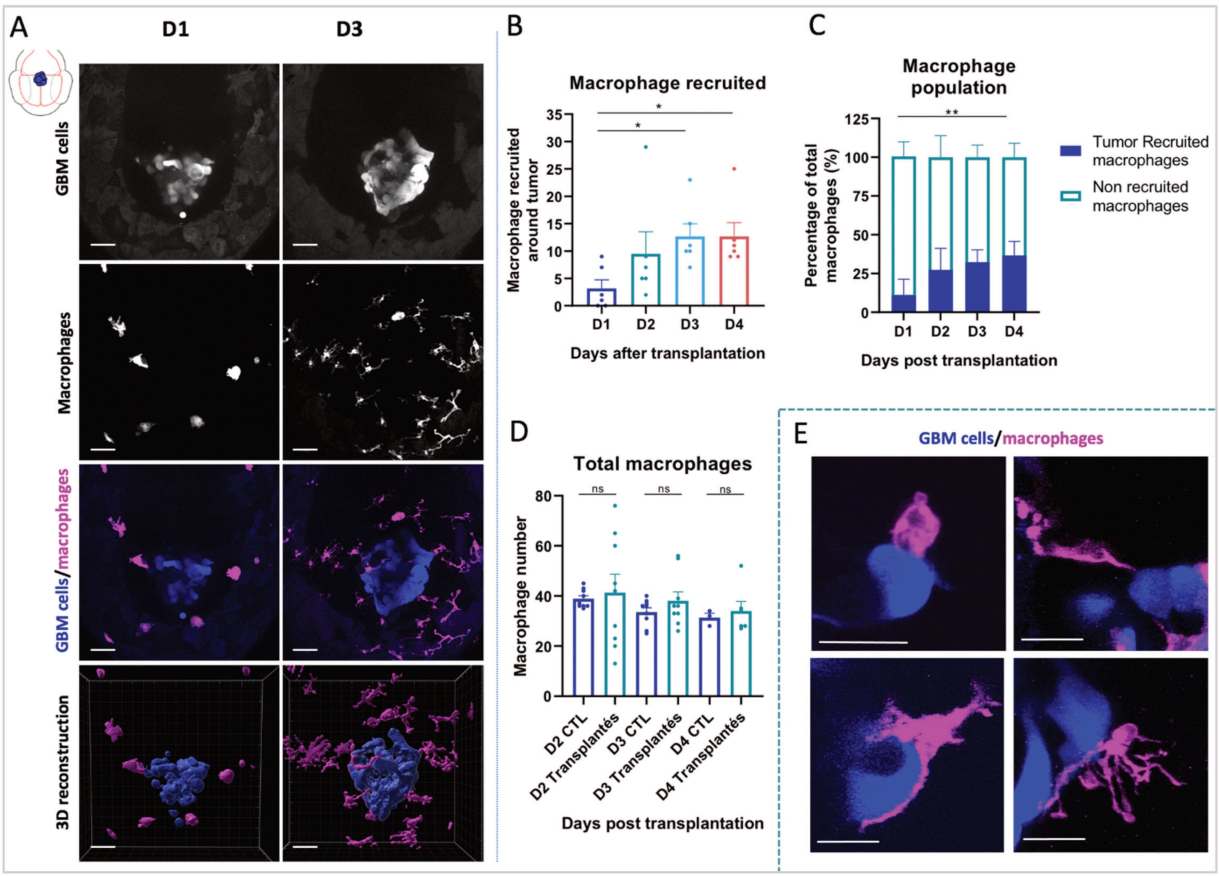


Fig.3: Macrophage recruitment and GBM-macrophages interactions

A: Cancer cells (blue or white) and macrophages (magenta or white) are shown in the images at D1 and D3 post transplantation. Images represent Z projection (93-116 slices in total) of GBM cancer cells and macrophages recruitment. Last line, represent 3D reconstruction of tumour mass with macrophages. Scale bar = 40µm.

B: Graph represents the number of macrophages recruited to tumour mass from D1 to D4 post transplantation per embryo. Statistical analysis was performed in Graphpad. Data in B represent the mean (±SEM), n = 6. *Friedman test* has been performed to evaluate the significance* p<0,05.

C: Graph represents the ratio of recruited macrophages on total macrophages from D1 to D4 post transplantation. Statistical analysis was performed in Graphpad. Data in C represent the mean (±SEM), n = 6. *Friedman test* has been performed to evaluate the significance* p<0,05 **p<0,01.

D. Graph represents the number of total macrophages from D1 to D4 post transplantation in control embryos injected with PBS and GBM transplanted embryos. Statistical analysis was performed in Graphpad. Data in D represent the mean (±SEM), n = 3-9. *t-test* has been performed to evaluate the significance* p<0,05.

E. Cancer cells (blue) and macrophages (magenta) are shown in the images. Images represent Z projection of different types of interactions between cancer cells and macrophages. Scale bar = 20µm.

Fig.4: Macrophage dynamic and morphology

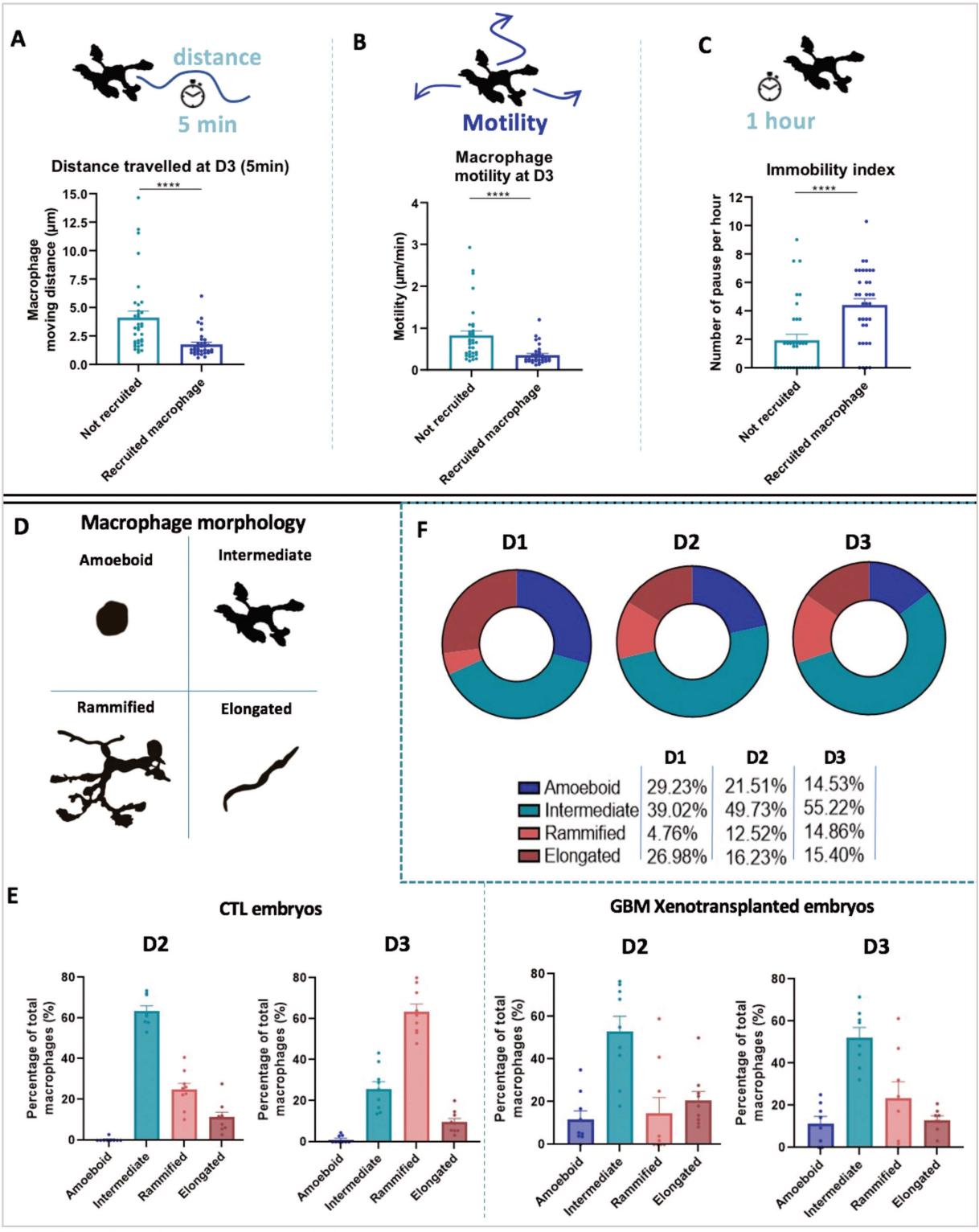


Fig.4: Macrophage dynamics and morphology

A: Graph represents the distance travelled by macrophages in µM in 5 minutes interval depending on their localization at 3 days post transplantation. 10-12 macrophages were manually tracked for each embryos in Fiji. Macrophages in contact with cancer cells are considered as recruited macrophages. Statistical analysis was performed in Graphpad. Data in A represent the mean (±SEM), n = 34. *Mann Whitney test* has been performed to evaluate the significance* p<0,05 **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

B: Graph represents macrophages motility µM/min depending on their localization at 3 days post transplantation. 10-12 macrophages were manually tracked for each embryos in Fiji. Macrophages in contact with cancer cells are considered as

recruited macrophages. Statistical analysis was performed in Graphpad. Data in B represent the mean (±SEM), n = 34. *Mann Whitney test* has been performed to evaluate the significance* p<0,05 **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001

C: Graph represent macrophages immobility index at 3 days post transplantation. Immobility index was estimated by counting the number of macrophages pauses in the interval time. A pause was considered when the distance travelled by the macrophage in 5 minutes was less than 1µm. 10-12 macrophages were manually tracked for each embryos in Fiji. Macrophages in contact with cancer cells are considered as recruited macrophages. Statistical analysis was performed in Graphpad. Data in C represent the mean (±SEM), n = 34. *Mann Whitney test* has been performed to evaluate the significance* p<0,05 **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

D. Based on Svahn paper, 4 macrophages morphologies were defined. Macrophages were manually counted as amoeboid (round macrophages without processes), intermediate (macrophages with short or few processes), ramified (mature macrophages with several and long processes) or elongated (macrophages moving in one direction).

E. Morphological analysis was performed on total macrophages at D3 post transplantation. Graph represents the percentage of each macrophage morphology population at D2 and D3 post transplantation in CTL embryos or GBM xenotransplanted embryos. Data in E represent the mean percentage (±SEM), n = 9. Chi square *test* has been performed to evaluate the significance of macrophage morphology distribution * p<0,05 **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

F. Morphological analysis was performed on recruited macrophages at D3 post transplantation. Graph represents the percentage of each macrophage morphology population at D2 and D3 post transplantation in GBM xenotransplanted embryos.

Fig.5 : New insight of anti-tumoral function of macrophages *in vivo*:

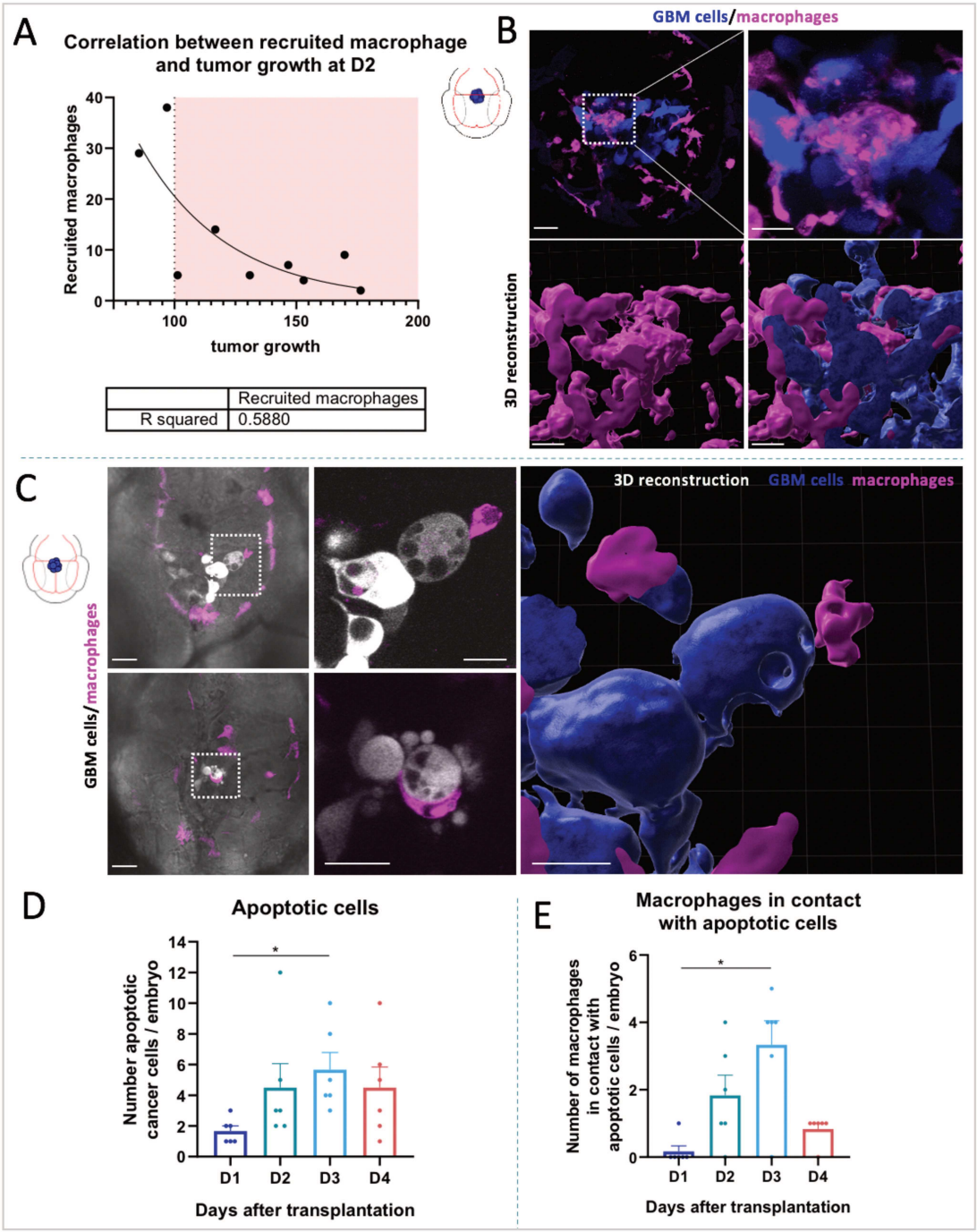


Fig.5 : New insight of anti-tumoral function of macrophages in vivo

A: Graph represent the correlation between macrophage number and tumor growth at D2 post transplantation.

B: Cancer cells (blue) and macrophages (magenta) are shown in the image. Macrophages infiltrate tumor mass and aggregates. Second line represent 3D reconstructions of GBM cells and macrophages. Scale bar upper left images = 40µm / Scale bar = 20µm

C. Cancer cells (blue) and macrophages (magenta) are shown in the image. Macrophages interact with dying cancer cells that contains big intracytoplasmic vacuoles. Apoptotic bodies are also visible. Right image represents 3D reconstruction of cancer cells and macrophages. First column images Scale bar = 40µm / Scale bar = 20µm

D. Graph represent the number of apoptotic cancer cells per embryo from D1 to D3 post transplantation Apoptotic cancer cells were counted manually on Fiji by moving in all the Z-stack. A cancer cell was considered as apoptotic when it has at least one visible vacuole in their cytoplasm. Statistical analysis were performed in Graphpad. Data in D represent the mean (±SEM), n = 6. Friedmann test has been performed to evaluate the significance* p<0,05

E. Graph represent the number of macrophages in contact with apoptotic cancer cells per embryo from D1 to D3 post transplantation. Macrophages were counted manually on Fiji by moving in all the Z-stack. Statistical analysis were performed in Graphpad. Data in D represent the mean (±SEM), n = 6. Friedmann test has been performed to evaluate the significance* $p<0,05$

Partie D : DISCUSSION DES RESULTATS

Partie D : DISCUSSION DES RESULTATS

Effet de cGAS sur la tumorigenèse et l'invasivité des cellules cancéreuses

Dans de nombreux cancers chez l'homme, il a été montré que l'expression de cGAS était fortement diminuée voire inactivée par différents mécanismes allant de la régulation épigénétique à l'induction de microARN régulateurs (Konno et al. 2018 ; Xia et al., 2016a ; Xia et al., 2016b, Wu et al. 2017). Plus récemment, Schadt et al. en 2019 ont observé que les tissus sains adjacents à la tumeur exprimaient cGAS alors que l'expression de cGAS était rare dans les cellules cancéreuses (Schadt et al. 2019). Il a été suggéré que la perte de cGAS dans les cellules tumorales serait un mécanisme par lequel les tumeurs évoluent pour échapper à la réponse immunitaire dépendante de la voie cGAS-STING (Marcus et al. 2018). En effet, la perte d'expression de cGAS par les cellules tumorales peut apporter des avantages intrinsèques aux cellules tumorales en permettant par exemple à la cellule tumorale de contourner la sénescence (Gluck et al., 2017 ; Yang et al., 2017).

Dans ce contexte, nous avons voulu ensuite étudier l'effet de cGAS sur la tumorigenèse et sur l'invasivité des cellules de glioblastome. Alors que le modèle 3D *in vitro,* ne nous a pas permis d'observer de différence significative en termes de prolifération entre les deux lignées de glioblastome surexprimant ou non cGAS, nos résultats *in vivo* sur modèle murin et sur le modèle du poisson-zèbre ont révélé une différence significative entre les deux lignées. Ces résultats démontrent les limites du modèle sphéroïde 3D qui ne prend pas en compte l'importance du microenvironnement tumoral contrairement aux modèles *in vivo*. Dans les deux études de xénotransplantation réalisées, la perte d'expression de cGAS augmente la prolifération tumorale *in vivo*. Autrement dit, la surexpression de cGAS n'influe pas sur la croissance intrinsèque des cellules de glioblastome T98G mais influe activement sur le microenvironnement tumoral qui joue un rôle majeur dans la progression tumorale. De même, une différence significative était visible en terme d'invasivité entre les deux lignées après transplantation chez le poisson zèbre. La lignée de glioblastome qui n'exprimait pas cGAS était plus invasive que la lignée surexprimant cGAS. Ces résultats peuvent être mis en relation avec l'étude récente publiée par Cheng et al. qui a montré *in vivo* que le cGAMP, second messager produit pas cGAS, inhibait les métastases et prévenait le processus de transition epithélio-mésenchymateuse (EMT) via son action sur les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) (Cheng et al. 2020). Ces résultats mettent en lumière le rôle anti-tumoral de cGAS dans l'invasivité et la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et supportent les résultats préalablement publiés montrant que l'expression du cGAS dans les tumeurs est un déterminant clé de l'immunogénicité tumorale.

Effet de cGAS sur le recrutement et la polarisation des macrophages

Nous avons constaté que la présence de cGAS dans les cellules de glioblastome transplantées chez le poisson-zèbre, favorisait le recrutement des macrophages ainsi que l'élimination des cellules cancéreuses. Ces résultats sont cohérents avec d'autres expériences *in vitro* réalisées par C. Taffoni qui confirment que les cellules de glioblastome T98G qui surexpriment cGAS recrutent davantage de monocytes que les cellules contrôles. Il serait pertinent d'étudier *in vivo* l'effet de STING et d'IRF3 en aval de cGAS en générant des lignées T98G STING$^{-/-}$ et IRF3$^{-/-}$ afin de voir si l'augmentation du recrutement des macrophages est dépendante ou non de l'inflammation.

Ces résultats mettent en lumière le rôle anti-tumoral des macrophages dans ce contexte qui phagocytent et éliminent plus rapidement les cellules cancéreuses surexprimant cGAS. Des résultats préliminaires *in vitro* (C. Taffoni) suggèrent que cette différence serait dû à l'augmentation de la sécrétion de chimiokines par les cellules de glioblastome surexprimants cGAS comme le CCL3/CCL4 ou CCL5. Ces chimiokines libérées induisent le recrutement les macrophages (CCL3/CCL4, CCL5,) (Cantor and Haskins 2007 ; Unver 2019 ; Hasegawa et al. 2021). Il serait intéressant de confirmer cet effet en utilisant une seconde lignée de glioblastome comme les U87. Nous pouvons également nous interroger sur la spécificité de cet effet et se demander s'il est propre au glioblastome ou plus universel ? Pour répondre à cette question il serait intéressant d'utiliser une autre lignée cellulaire d'un autre type de cancer.

Nous avons également étudié l'effet de cGAS sur la polarisation des macrophages *in vitro* et *in vivo*. Pour cela, nous avons démontré que le milieu conditionné issu de la lignée de glioblastome surexprimant cGAS préalablement stimulé par des doubles brins d'ADN induisait davantage l'expression des marqueurs de polarisation caractéristiques des macrophages M1 (CXCL10, CD197) que la lignée contrôle. De manière similaire, les résultats *in vivo* montrent qu'il existe une augmentation significative des marqueurs de polarisation caractéristiques des macrophages M1 après transplantation des cellules T98G surexprimant cGAS par rapport à la lignée contrôle. Ensemble, ces résultats *in vitro* et *in vivo* confirment le rôle de cGAS dans le recrutement et la polarisation des macrophages en sous-type M1.

Ces résultats sont à mettre en relation avec les données de la littérature et cliniques qui ont montré que de nombreux cancers présentaient une perte d'expression de cGAS (Konno et al. 2018 ; Schadt et al. 2019). Cette perte d'expression de cGAS pourrait ainsi participer à l'échappement tumoral en augmentant l'invasivité des cellules cancéreuses mais aussi en diminuant le recrutement des macrophages et leur polarisation en sous-type M1 (Raaby Gammelgaard et al. 2021).

Effet des doubles brins d'ADN sur la polarisation des macrophages

La mise en place d'un modèle de polarisation des macrophages *in vitro* nous a permis d'étudier l'effet des acides nucléiques et en particulier des doubles brins d'ADN sur la polarisation des macrophages. L'impact de la voie de signalisation cGAS-STING a également pu être explorée. Nous avons démontré que la transfection de doubles brins d'ADN induisait l'augmentation de marqueurs de polarisation caractéristiques des macrophages M1 tant par q-RTPCR, que par cytométrie en flux ou qu'au niveau cytokinique. Ainsi, la combinaison de ces approches tend à montrer que les acides nucléiques doubles brins d'ADN induisent une polarisation des macrophages vers un sous type M1 *in vitro* et que cette polarisation est dépendante de cGAS et de STING. Ces données sont cohérentes avec les travaux publiés précédemment démontrant que l'activation de la voie de signalisation cGAS-STING via l'utilisation d'agonistes de STING comme le DMXAA, les di-nucléotides c-di-GMP ou le cGAMP repolarisent les macrophages associés aux tumeurs M2 vers un phénotype pro-inflammatoire M1 anti-tumoral (Downey et al. 2014 ; Ohkuri et al. 2014, Ohkuri et al. 2017 ; Cheng 2018).

Le fait que la polarisation des macrophages repose sur cGAS et STING est particulièrement intéressante quand on sait que l'expression de cGAS et de STING peut également être altérée dans les PBMC. Gammelgaard et al. ont ainsi pu observer une diminution de l'expression de cGAS dans les PBMC des patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire par rapport aux patients non malades. De plus, l'expression de cGAS et STING était dépendante du stade de la maladie. L'expression de la voie cGAS-STING était significativement diminuée dans les PBMC de patients atteints d'un cancer métastatique (stade III et IV) par rapport aux patients atteints d'un cancer localisé (stade I et II) (Gammelgaard et al. 2021). Ces travaux ainsi que nos résultats semblent suggérer que dans les stades plus avancés, les macrophages sont moins polarisables en sous-type M1 anti-tumoral.

Alors que nous avons étudié l'effet des doubles brins d'ADN *in vitro* sur la polarisation, il aurait été intéressant d'évaluer leurs effets sur un modèle *in vivo* en particulier sur le modèle du poisson-zèbre mis en place à AZELEAD. En effet, l'activation de la voie cGAS-STING joue un rôle crucial à la fois dans les cellules tumorales, les cellules immunitaires (Jiang et al. 2020) et la vascularisation (Baris et al. 2021). Des études récentes ont montré que l'activation de STING semblerait être impliquée dans la normalisation de la vascularisation tumorale en augmentant la couverture des péricytes (Baris et al. 2021). Ainsi, le modèle du poisson-zèbre développé permettant d'étudier simultanément trois populations cellulaires est particulièrement innovant. Il nous permettrait d'étudier les effets anti-tumoraux des doubles brins d'ADN sur les cellules cancéreuses, sur la polarisation des macrophages et sur les vaisseaux sanguins. Grâce à l'imagerie en temps réel, nous pourrions évaluer si les acides nucléiques augmentent le nombre de cellules cancéreuses apoptotiques et ralentissent la prolifération tumorale. En parallèle, nous pourrions étudier l'effet des acides nucléiques sur le recrutement, la dynamique et la

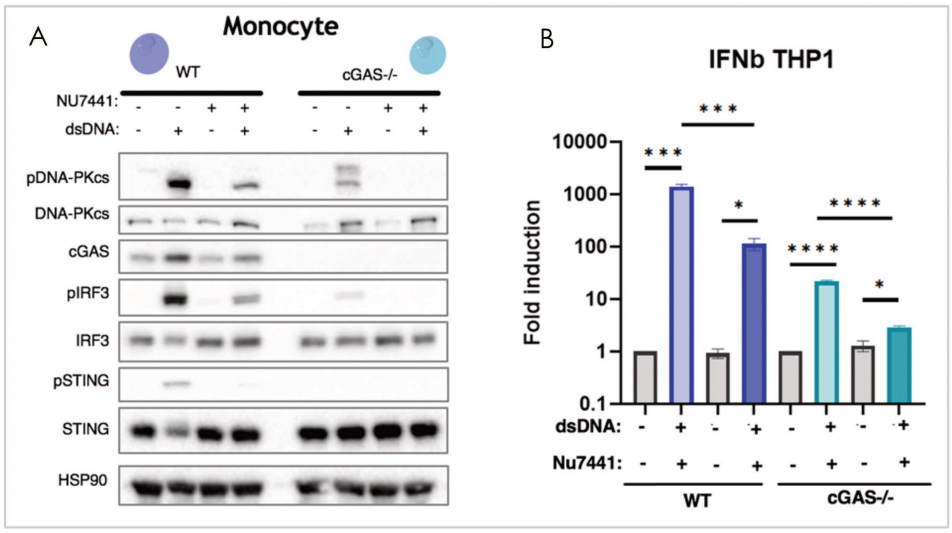
morphologie des macrophages. Enfin, l'effet des acides nucléiques sur les cellules endothéliales vasculaires pourrait également être évalué *in vivo*.

Une des limites de l'utilisation des doubles brins d'ADN concerne la stabilité et leur mode d'administration. En effet, les doubles brins d'ADN cytosoliques peuvent être soumis à la dégradation via des exonucléases intracellulaires telles que TREX1 aussi appelée DNAse III (Lehtinen et al. 2008). Les méthodes traditionnelles utilisent généralement des nanoparticules et des liposomes pour fournir une thérapie ciblée (Han C. 2021). Cependant, les avantages de ces méthodes sont limités en raison de leur faible biodisponibilité, histocompatibilité et sélectivité tumorale (Shobaki et al. 2020 ; Xu et al. 2020 ; Zanganeh et al. 2016). A l'heure actuelle, de nombreux efforts sont faits pour développer des traitements capables de repolariser les macrophages via une formulation sous forme d'exosomes. Les exosomes sont des vésicules extracellulaires (VE) d'origine endosomique d'un diamètre compris entre 30 et 150 nm (Kalluri et al. 2020) qui peuvent contenir de nombreux composants cellulaires comme de l'ADN, des ARN, des lipides et des protéines (Ruivo et al. 2017). Récemment, il a été montré que les exosomes pouvaient moduler le microenvironnement tumoral et influer sur la polarisation des macrophages impactant d'un même coup la progression tumorale (Han C. 2021). Grâce à leur structure en bicouche lipidique qui protège leur contenu des dégradations enzymatiques, les exosomes assurent à leur contenu une meilleure stabilité (Han C et al. 2021). De plus, les exosomes ont une toxicité plus faible, ainsi qu'une meilleure tolérance tissulaire et une meilleure biocompatibilité par rapport aux liposomes. Enfin, il est possible de concevoir et de modifier les exosomes afin de les conjuguer à des anticorps pour cibler davantage les macrophages (Nie et al. 2020). A ce titre, la génération de doubles brins d'ADN formulés au sein d'exosomes ciblant les macrophages pourrait se révéler être une stratégie particulièrement intéressante et prometteuse. Des essais cliniques lancés en septembre 2020 par la société Codiak® sont d'ores et déjà en cours pour étudier l'effet d'agonistes de la voie STING (di-nucléotides cycliques) formulés au sein d'exosomes (Han C et al. 2021). En revanche, l'effet des doubles brins d'ADN n'est pas exploré. Ainsi, il serait intéressant de comparer les différents agonistes de la voie cGAS-STING (cGAMP, di-nucleotides, doubles brins d'ADN) sur le modèle du poisson-zèbre afin d'identifier quel agent possède l'activité anti-tumorale la plus importante et est le plus efficace pour polariser les macrophages vers un sous-type M1.

Un autre senseur cytosolique impliqué dans la polarisation des macrophages ?

De manière intrigante, au cours de nos analyses nous avons observé dans les monocytes et les macrophages prédifférencié n'exprimant pas cGAS que l'interféron était toujours partiellement induit après stimulation avec des doubles brins d'ADN. Cela nous a amené à nous interroger sur la présence d'un autre senseur d'ADN cytosolique dans ces cellules qui pourrait également être impliqué dans la polarisation des macrophages. Dans la littérature, de nombreux autres senseurs impliqués dans la réponse interféron ont déjà décrits

parmi lesquels on retrouve IFI16 (Unterholzner et al 2010), Ku70 (Zhang et al. 2011) ou DNA-PK (Karpova et al. 2002, Ferguson et al. 2012). Grace à des expériences de « pull down » consistant à incuber le lysat protéique issu des cellules avec des billes magnétiques préalablement couplées avec des doubles brins d'ADN biotinylés, nous avons isolé les protéines liants les doubles brins d'ADN dans les monocytes et macrophages prédifférenciés. Ces protéines ont été analysées grâce à la spectrométrie de masse ce qui nous a permis d'obtenir une liste de senseurs d'ADN potentiels dans les macrophages prédifférenciés exprimant ou non cGAS. Similairement à ce qui avait déjà été rapporté précédemment dans la littérature nous avons retrouvé DNA-PK comme protéine capable de lier les acides nucléiques cytosoliques (Karpova et al. 2002, Ferguson et al. 2012 ; Burleigh et al. 2020). Nous avons constaté que DNA-PKcs était la protéine la plus abondamment liées aux doubles brins d'ADN et qu'elle était enrichie dans la lignée n'exprimant pas cGAS. De même, Ku70 et Ku80, l'hétérodimère qui compose aussi DNA-PK était également liés à ces acides nucléiques. Après avoir validés la liaison de DNA-PKcs aux doubles brins d'ADN dans les monocytes et macrophages prédifférenciés, nous avons évalué si DNA-PKcs était impliqué dans la réponse à l'Interféron de type I après stimulation avec des doubles brins d'ADN.



DNA-PK un senseur cytosolique impliqué dans la réponse interféron dans les monocytes
A. Analyse par Western blot de l'activation de la voie de signalisation cGAS-STING et de DNA-PK 6h après stimulation avec des doubles brins d'ADN en présence ou non de l'inhibiteur de DNA-PK (Nu7441). Les échantillons ont été incubés en présence des anticorps indiqués.
B. Analyse représentant l'expression d'IFNb 6h, après stimulation avec des doubles brins d'ADN et l'inhibiteur de DNA-PK (Nu7441) par q-RTPCR. L'analyse des taux d'ARNm est normalisée par rapport au gène de référence GAPDH. Un t-test de Student a été réalisé pour évaluer la significativité * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$. Les datas présentées représentent la moyenne +SEM, n= 3 expériences indépendantes.

Pour cela, nous avons utilisé le Nu7441, un inhibiteur spécifique de DNA-PK d'abord sur les monocytes puis sur les macrophages. Nous avons démontré par q-RTPCR que l'induction

d'interféron-b dépendante des dsDNA était largement diminuée après utilisation de l'inhibiteur de DNA-PK dans les monocytes indépendamment ou non de la présence de cGAS (B). Dans ces cellules, la réponse interféron est dépendante de la voie cGAS-STING mais aussi de DNA-PK. Dans les macrophages, l'effet était moins marqué mais suivait néanmoins la même tendance. L'analyse Western Blot a confirmé l'efficacité de l'inhibiteur, via la diminution de la phosphorylation de DNA-PKcs et nous a permis d'observer qu'une interconnexion existait entre la voie cGAS-STING et DNA-PK (A). En effet, en présence de l'inhibiteur, nous avons observé une diminution de la phosphorylation d'IRF3 et un blocage de la phosphorylation de STING. De même, l'absence de dégradation de STING après stimulation (A) suggère que DNA-PK et la voie cGAS-STING sont intrinsèquement liées. Dans ce contexte, il serait pertinent d'évaluer l'effet de l'inhibiteur de DNA-PK sur la polarisation des macrophages.

Mise au point d'un modèle de glioblastome innovant chez le poisson zèbre

Au cours des dernières décennies, le modèle du poisson zèbre est apparu comme l'un des modèles les plus pertinents pour l'étude du glioblastome (Hamilton et al. 2016, Astell et al. 2017). En parallèle des études *in vitro*, nous avons mis au point un modèle de glioblastome chez le poisson zèbre dans la société AZELEAD. Après de nombreuses étapes d'optimisation portant sur la température d'incubation des embryons, sur le marquage des cellules ou la procédure de xénotransplantation, nous avons mis au point un modèle de glioblastome fiable et reproductible intégrant le microenvironnement tumoral afin d'étudier l'évolution de ce dernier au cours du temps et son impact sur la progression tumorale. Nous avons mis en lumière deux des acteurs majeurs du microenvironnement tumoral que sont les macrophages et les vaisseaux sanguins à l'aide de deux lignées rapportrices transgéniques de poisson zèbre *Tg(mfap4:RFP)* et *Tg(kdrl:gfp)*. Jusqu'alors, la plupart des travaux publiés étudiaient soit les interactions macrophages-cellules cancéreuses soit les interactions vaisseaux-cellules cancéreuses. Cela peut s'expliquer par le fait que les lignées transgéniques disponibles marquant les vaisseaux et les macrophages sont en général m-cherry, RFP ou GFP (Ellett, Pase, Hayman, Andrianopoulos and Lieschke 2011 ; Walton et al. 2015 ; Lawson et Weinstein 2002a) tout comme les lignées stables de glioblastome fluorescentes utilisées (Zeng et al. 2017 ; Hamilton et al. 2016). Alors que les effets néfastes de la lumière ultraviolette (UV) sur les embryons de poissons-zèbre conduisent à une importante phototoxicité (Dong et al. 2007), nos travaux montrent qu'il est techniquement possible de visualiser simultanément trois populations cellulaires en temps réel grâce à la génération d'une lignée fluorescente stable de glioblastome bleue eBFP+.

Parmi les modèles de glioblastome chez le poisson zèbre dans la littérature, aucun n'avait mis au point de modèle basé sur la reconstruction 3D permettant la visualisation des cellules cancéreuses, des macrophages et des vaisseaux de manière simultanée. Notre objectif était de souligner l'apport de cette reconstruction 3D. En effet modéliser en 3D la

masse tumorale permet de rendre compte de son architecture et de sa complexité. La croissance tumorale ainsi que l'invasivité peut aisément être évaluée jour après jour. De plus, la reconstruction 3D permet également de visualiser l'orientation des macrophages, leur recrutement et leur infiltration au sein de la masse tumorale ce qui est difficilement visualisable en 2D. En parallèle, les processus de néovascularisation dans le glioblastome comme des phénomènes d'angiogénèse, de dilatation et de co-optation des vaisseaux déjà observés par plusieures équipes (Umans et al. 2020 ; Zeng et al. 2017 ; Lal et al. 2012 ; Nicoli et al. 2017) ont également été modélisés en 3D. De plus, la conservation de ces événements a confirmé la fiabilité et la pertinence du modèle poisson zèbre pour étudier le GBM *in vivo* et ouvre donc la voix à une meilleure compréhension de ce type de cancer.

Caractérisation du rôle des macrophages dans le glioblastome *in vivo* : recrutement, dynamique et morphologie

Dans le glioblastome, les macrophages aussi appelés GAMs (Macrophages associés au glioblastome) représentent la population cellulaire majoritaire et peuvent atteindre jusqu'à la moitié des cellules de la masse tumorale (Hambardzumyan et al. 2016). Suite à la transplantation des cellules humaines de glioblastome, nous avons observé une augmentation significative du nombre de macrophages recrutés autour de la tumeur. Nous avons également constaté une diminution de la motilité des macrophages recrutés autour de la tumeur. De même, la morphologie des macrophages entre les poissons transplantés et contrôles était différente ce qui suggère l'existence d'une communication intense et complexe entre les macrophages et les cellules tumorales. Comme rapporté dans la littérature, les cellules cancéreuses de glioblastome ont développé plusieurs mécanismes pour exploiter la plasticité fonctionnelle intrinsèque des macrophages et de la microglie pour faciliter la croissance tumorale (Hambardzumyan et al., 2016, Prionisti et al., 2019). Dans les modèles de glioblastome chez le poisson zèbre, le rôle pro-tumoral des macrophages a été démontré via l'utilisation d'un inhibiteur de CSF1-R (Hamilton et al. 2016). Cependant, dans ce modèle, les fonctions anti-tumorales des macrophages n'ont pas été démontrées. Ici, nous avons rapporté pour la première fois des preuves d'une fonction phagocytaire antitumorale conservée à un stade précoce du développement tumoral chez le poisson zèbre. Grâce à nos observations, nous avons visualisé l'infiltration d'agrégats macrophagiques et de nombreuses cellules cancéreuses apoptotiques, suggérant que le rôle anti-tumoral de certaines sous-populations de macrophages était conservé à ce stade. Cela nous a amené à considérer les interactions des macrophages avec les cellules GBM comme plus complexes qu'initialement décrites.

Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier l'état de polarisation des macrophages à travers l'identification de différentes sous-populations de macrophages dans le microenvironnement tumoral du GBM. Les macrophages en contact avec les cellules

cancéreuses apoptotiques présentent-ils un statut de type M1 ? L'évaluation du statut de polarisation des macrophages pourrait être réalisé à l'aide de lignées transgéniques de poisson zèbre marquant spécifiquement les macrophages M1 (Nguyen et al. 2015), de méthodes d'hybridation in situ ou par analyse transcriptomique. De même, il serait pertinent d'étudier la proportion de la microglie et des macrophages périphériques autour de la tumeur grâce à l'utilisation de la lignée transgénique *Tg(apoeb :EGFP)* (Peri and Nüsslein-Volhard et al. 2008).

Partie E : PERSPECTIVES & APPLICATIONS FUTURES

Partie E : PERSPECTIVES & APPLICATIONS FUTURES

Le glioblastome (GBM) est la forme de gliome la plus fréquente et la plus agressive du système nerveux central (Gusyatiner et Hegi, 2018). En dépit des progrès thérapeutiques et des prises en charge multimodales, la survie médiane des patients est de 15 mois (Stupp et al. 2005, Thakkar et al. 2014). Comme nous l'avons vu précédemment, le modèle du poisson-zèbre possède des caractéristiques uniques qui en font un outil particulièrement pertinent pour l'étude du glioblastome *in vivo*. Les perspectives futures sont nombreuses et reposent sur 3 applications majeures : une meilleure compréhension des processus cellulaires associés au cancer, le criblage de nouvelles thérapies anti-cancéreuses et un outil au service de la médecine de précision.

Une meilleure **compréhension du microenvironnement tumoral** et des processus cellulaires impliqués dans le glioblastome est primordiale pour identifier de nouvelles cibles et développer de nouveaux traitements. Grâce au modèle 3D de glioblastome développé au cours de la thèse, nous ouvrons la voie à une meilleure connaissance et compréhension du glioblastome en visualisant en temps réel, la coopération de différents types cellulaires que sont les cellules cancéreuses, les macrophages et les vaisseaux sanguins. Cette méthode pourra être implémentée en utilisant par exemple d'autres lignées transgéniques de poisson zèbre pour étudier d'autres acteurs du TME comme la glie ou les neurones (Bernardos et al ; 2006 ; Peri and Nüsslein-Volhard 2008). Cependant des limites techniques sont à considérer pour étudier de manière simultanée quatre à cinq populations cellulaires en temps réel. D'une part, la détection de chacune des sous-populations ne pourrait se faire que si les fluorochromes possèdent un spectre d'émission suffisamment distinct ce qui n'est malheureusement pas toujours possible. En effet, comme mentionné précédemment les lignées transgéniques générées chez le poisson-zèbre sont souvent GFP ou RFP ce qui limite les combinaisons possibles lors de l'imagerie. D'autre part, l'autre limite technique à mentionner concerne le temps d'acquisition des images. En effet, le temps d'acquisition augmente avec le nombre de population cellulaires à imager ce qui limite grandement les analyses de processus cellulaires qui nécessitent des temps courts entre deux acquisitions.

Le poisson zèbre est devenu un modèle préclinique particulièrement utile **pour évaluer l'efficacité de nouveaux médicaments anticancéreux**. En particulier dans le traitement du glioblastome. En effet, les molécules peuvent être directement solubilisées dans l'eau dans lesquels baignent les embryons ce qui rend l'administration chimique simple et non invasive (Drabsch et al. 2013 ; Taylor et Zon 2009 ; Yang et al. 2014). Dans les xénogreffes de glioblastome chez le poisson-zèbre, de nombreuses molécules ont ainsi pu démontrer leur

efficacité comme le témozolomide (Geiger et al. 2013 ; Zeng et al. 2017), l'erlotinb, le 5-FU (Eden et al. 2015) ou l'inhibiteur sélectif de PI3K (Wehmas et al. 2016). De nombreux traitements anti-angiogéniques ont également été validés comme l'axitinib ou le sunitinib (Yang et al. 2014). Le modèle de glioblastome U87 développés au cours de la thèse pourra être utilisé pour cribler de nouvelles thérapies angiogéniques, des agents agissant sur les macrophages et leur repolarisation comme les doubles brins d'ADN caractérisés ou des thérapies anti-cancéreuses au sens plus large. Dans ce cas, une des limites à considérer concerne la barrière hémato-encéphalique chez le poisson zèbre. En effet, même si celle-ci commence à se mettre en place dès 2,5-3 dpf, elle ne devient complètement mature qu'après une dizaine de jours post fécondation (Quinonez-Silvero et al. 2020). L'alternative serait donc de travailler sur ce stade juvénile afin de se rapprocher de la physiologie humaine.

De nombreuses avancées ont été rendues possibles grâce à la découverte de nouveaux biomarqueurs et de voies moléculaires impliquées dans les cellules cancéreuses. De même, la connaissance du microenvironnement tumoral a conduit au développement de nouvelles thérapies ciblées. Les derniers succès de la thérapie ciblée HER2 et la découverte des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires en sont d'excellents exemples (Costa et al. 2020). Malheureusement tous les patients ne répondent pas aux traitements. Plus récemment, le modèle du poisson zèbre est apparu comme pertinent dans le domaine de **la médecine de précision** afin d'aider les cliniciens quant au traitement le plus approprié pour un patient donné (Fior et al., 2017). Dans cette optique, l'objectif est de miniaturiser la tumeur du patient *in vivo*, en transplantant les cellules du patient directement dans l'embryon de poisson zèbre. L'embryon sert alors « d'avatar » et recevra les différents traitements afin d'évaluer lequel est le plus efficace. A terme, les résultats obtenus pourront aider le praticien dans sa décision clinique. Quelques études ont été publiés à ce jour et montrent des résultats prometteurs quant au potentiel prédictif des zPDX (zebrafish Patient Derived Xenograft)(Lin et al. 2016 ; Fior et al. 2017). Au regard du modèle développé au cours de la thèse, l'étape suivante consistera à transplanter des cellules de glioblastome issues de patients dans l'embryon du poisson-zèbre. Il est à noter que la méthode de marquage des cellules cancéreuses mis au point au cours de la thèse ne pourra s'appliquer dans ce cas. En effet, le temps nécessaire pour sélectionner les cellules cancéreuses fluorescentes conduirait à une perte d'hétérogénéité tumorale, Une autre approche consiste à incuber les cellules tumorales en présence d'un colorant fluorescent synthétique capable de marquer les cellules juste avant la transplantation. L'avantage majeur de l'utilisation de ce colorant est la rapidité du marquage puisqu'en général, une trentaine de minutes suffisent à marquer les cellules. Cependant nos expériences préliminaires ont révélé que certains colorants possédaient une stabilité limitée ce qui entravait les analyses au cours du temps. De plus, ces colorants synthétiques peuvent former des agrégats ce qui complexifie l'étude de la prolifération ou de l'invasivité des cellules

cancéreuses (Astell et al. 2017). La seconde alternative consiste à transduire les cellules avant transplantation via l'utilisation d'un système lentivirus. Cette technique efficace déjà mise au point part d'autres équipes (Hanna et al. 2016) permet d'obtenir des cellules marquées en quatre jours seulement.

Enfin, ce modèle pourra s'appliquer à d'autres types de cancers en faisant varier la nature des cellules cancéreuses et le site d'injection. A terme, ce modèle *in vivo* rapide et fiable pourra permettre de sélectionner le médicament le plus efficace et le moins toxique pour un patient donné.

Partie F : MATERIEL ET METHODES

Partie F : MATERIELS ET METHODES

Le matériel et méthodes concernant les deux articles présentés précedemment ne sont pas inclus dans cette partie.

A) *Expériences in-vitro*

Lignées cellulaires et culture

Les lignées cellulaires humaines de glioblastome T98G empty, T98G CGASOE (F/HA-cGAS) ont été générées au sein du laboratoire de N. Laguette par C. Taffoni et K.Polak. Les T98G surexprimant cGAS et la lignée cellulaire CTL (T98G empty) ont été générées en transduisant la lignée T98G parentale (obtenue à partir de C. Goujon IRIM) avec des particules virales produites en utilisant respectivement les constructions pOZ-F/HAcGAS et pOZ-F/HA. Les lignées ont ensuite été sélectionnées avec de la puromycine. Les lignées cellulaires T98G IRF3$^{-/-}$ et contrôles ont été générées à l'aide du système LenticrisprV2-GFP. Les lignées cellulaires T98G ont été cultivées dans des milieux DMEM supplémentés en L-glutamine (1 %), Pen/strep (1 %) et SVF (10 %).

Les lignées cellulaires monocytaires, THP1 WT, THP1 CGAS$^{-/-}$, THP1 STING$^{-/-}$ proviennent de S. Paludan et cultivées en milieu RPMI supplémenté en L-Glutamine (1%), Pen/Strep (1%) et FBS (10%). Les cellules ont été comptées et maintenues en culture en suspension entre 0,3 et 1x10^{6} cellules/mL.

Plasmides & clonage

Les plasmides LentiCRISPRv2GFP-CTL, LentiCRISPRv2GFP-IRF3, LentiCRISPRv2GFP-DNAPK ont été générés à partir du plasmide LenticrisprV2-GFP. Le plasmide LentiCRISPRv2GFP a été obtenu grâce à David Feldser (plasmide Addgene # 82416). Les oligos guides ont été hybridés selon le protocole Yamamoto et clonés dans le plasmide. LentiCRIPSPRv2GFP en effectuant la réaction « Golden Gate » (Yamamoto Lab). Les plasmides clonés ont été amplifiés, purifiés et séquencés avant la production des particules lentivirales.

Cibles	Guide 1	Guide 2
Control	CACCGAGCACGTAATGTCCGTGGAT	AAACATCCACGGACATTACGTGCTC
IRF3	CACCGAGCTGACACTCACCTTCCCC	AAACGGGGAAGGTGAGTGTCAGCTC

Production de particules virales et transduction

Pour générer la lignée T98G IRF3$^{-/-}$ et sa lignée contrôle, des particules lentivirales ont été produites par cotransfection de 2 × 10^{6} cellules 293T avec 5 µg de LentiCRISPRv2GFP-IRF3 (ou LentiCRISPRv2GFP-CTL), 5 µg de psPAX2 (GAG-POL) et 1 µg de pMD2.G, en utilisant le protocole standard de transfection au phosphate de calcium. 8 heures après la transfection,

le milieu a été remplacé par un nouveau milieu DMEM et les particules virales ont été collectées et filtrées 48 heures après cette étape.
Pour la génération de lignées cellulaires stables, 6 × 10^5 cellules T98G ont été ensemencées la veille de la transduction. Des particules virales ont été ajoutées le jour suivant et le milieu a été remplacé 24 heures plus tard. 72 heures après transduction, entre 30 000 et 50 000 cellules T98G GFP+ ont été triées à l'aide d'un BD FACS Melody. Les cellules ont ensuite été amplifiées et l'invalidation de l'IRF3 a été vérifiée par analyse Western Blot.

Pré-différenciation des macrophages

Les lignées cellulaires THP1 (WT, CGAS$^{-/-}$ et STING$^{-/-}$) ont été différenciées en macrophages pr-différenciés (M0) à l'aide du PMA (Phorbol 12 myristate 13 acétate) à 150 nM pendant 24h. Après 24h, le milieu a été aspiré puis remplacé par du RPMI frais pendant 24h avant toute stimulation avec du dsDNA ou un cocktail M1/M2.

Génération d'ADN double brins (dsDNA) de 80 pb non biotinylés et biotinylés

Les simples brins d'ADN non biotinylés sens (ssDNA S) ou biotinylés (^{B}ssDNA S) ont été hybridés avec les simples brins d'ADN antisens (ssDNA AS) pour générer un ADN double brin (dsDNA) biotinylé ou non biotinylé. L'hybridation a été réalisé dans un gradient MasterCycler nexus (Eppendorf) dans un tampon d'anneling [300 mM NaCl, 50 mM tris-HCl (pH 7,5), et 1 mM EDTA] en utilisant le programme suivant : 30min à 37°C, 5min à 95°C, 4min 85°C, (4min 82°C)x3, 4min à 75°C, 4min à 72°C, 10min à 70°C, (1min à 69°C)x57, et refroidissement jusqu'à 10°C. La qualité des doubles brins d'ADN générés a été contrôlé en chargeant 500 ng de dsDNA nouvellement générés sur un gel d'acrylamide 10% non dénaturant en utilisant les ADN simple brin (ssDNA) et double brins (dsDNA) comme témoins.

Oligos (80 paires de bases)	Séquence
ssDNA sense	ACATCTAGTACATGTCTA GTCAGTATCTAGTGATTA TCTAGACATACATGATCT ATGACATATATAGTGGAT AAGTGTGG
ssDNA antisense	CCACACTTATCCACTATA TATGTCATAGATCATGTA TGTCTAGATAATCACTAG ATACTGACTAGACATGTA CTAGATGT
ssDNA Biotinylated Sense (^{B}ssDNA Sense)	Séquence identique au ssDNA sense avec ajout de Biotine en 5'

Différenciation en macrophages M1/M2 à l'aide de cocktails M1/M2

Après prédifférenciation des macrophages et 24h d'incubation avec le milieu RPMI, des cocktails polarisants en macrophages M1 et M2 peuvent être utilisés. Le cocktail M1 est composé de 20ng/mL d'IFNgamma (Peprotech) et de LPS (10pg/mL). Le cocktail M2 est

composé de 20ng/mL d'IL13 (Peprotech) et de 20 ng/mL d'IL4 (Peprotech). Après aspiration du milieu RPMI, ces cocktails ont été ajoutés sur les macrophages prédifférenciés et incubés entre 24 et 72h. Le statut de polarisation des macrophages a ensuite été exploré à 24h et 72h par cytométrie en flux et à 72 heures pour l'analyse des cytokines et de l'expression génique.

Stimulation avec des ADN doubles brins (dsDNA)

Après 24h d'incubation en RPMI des monocytes (THP1) ou des macrophages pré-différenciés, le milieu RPMI a été soigneusement retiré et remplacé par de l'OPTIMEM. Les ADN double brins (dsDNA) ont ensuite été transfectés (4ug ADN/million de cellules) en utilisant du Jetprime (Polyplus transfection®) avec un rapport 1:2 dsDNA/Jetprime. Le milieu optimem a été remplacé par du RPMI 6 heures après la transfection quand l'incubation dépasse les 6 heures. Les cellules et les surnageants ont finalement été collectés 6h, 12h, 24h ou 48h après la transfection. Les cellules ont été lavées (PBS) puis collectées manuellement sur glace à l'aide de grattoirs. Les échantillons cellulaires ont ensuite été préparés pour le Western Blot, la cytométrie en flux ou l'analyse qPCR. Le surnageant a été stocké pour l'analyse ultérieure des cytokines.

RNA extraction and RT-qPCR

L'ARN a été extrait avec le réactif Trizol (Invitrogen). L'ARN a été quantifié avec un spectrophotomètre Nanodrop (ND-1000, Nanodrop Technologies) et traité avec la TURBO™ DNase (Invitrogen AM2238) selon les protocoles du fabricant. L'ARN (2-2,5 g) a été rétrotranscrit en utilisant la transcriptase inverse SuperScript IV (Invitrogen). L'expression d'ARNm a été déterminée avec un LightCycler 480-II (Roche) en utilisant le master mix PCR SYBR Green (Takara). Les réactions ont été réalisées en triplicats techniques et les quantités relatives d'ADNc ont été normalisées par rapport à la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

Les séquences d'amorces RT-qPCR sont synthétisées dans le tableau ci-dessous :

Primers (Human)	Forward	Reverse
IFN-β	GAA TGG GAG GCT TGA ATA CTG CCT	TAG CAA AGA TGT TCT GGA GCA TCT C
CXCL10	GAA AGC AGT TAG CAA GGA AAG GTG	ATG TAG GGA AGT GAT GGG AGA GG
CD197/CCR7	TGG TGG TGG CTC TCC TTG TC	TGT GGT GTT GTC TCC GAT GTA ATC
IL-1β	CAA CAG GCT GCT CTG GGA TT	AAG CCA TCA TTT CAC TGG CG
TNFα	CCC AGG CAG TCA GAT CAT CTT CT	ATG AGG TAC AGG CCC TCT GAT
Fibronectine	ACA AGC ATG TCT CTC TGC CA	CCA GGG TGA TGC TTG GAG AA
CD209	TGC TGA GGA GCA GAA CTT CC	TAC TGC TTG AAG CTG GGC AA
GAPDH	CTG GCG TCT TCA CCA CCA TGG	CAT CAC GCC ACA GTT TCC CGG

Analyse du marqueur membranaire M1 CD197 par cytométrie en flux

Pour évaluer la différenciation des macrophages M1 après un cocktail M1 ou une stimulation d'ADN double brins, les cellules THP1 ont été collectées. Le milieu de culture a été aspiré et les cellules ont été lavées avec du PBS. Les cellules ont ensuite été détachées sur de la glace à l'aide d'une solution de détachement (PBS/EDTA 0,5M) et de grattoirs. Les cellules ont été sédimentées par centrifugation à 1200rpm pendant 4 minutes. Les cellules ont ensuite été remises en suspension dans du tampon de lavage (PBS/BSA 0,5%) et incubées avec l'anticorps FcBlock (Biolegend) pendant 15 minutes sur glace. Les cellules ont ensuite été centrifugées et incubées avec l'anticorps CD197-FITC pendant 15 minutes sur glace à l'abri de la lumière. Enfin, les cellules ont été lavées à deux reprises avec le tampon de lavage et remises en suspension dans du PBS. L'acquisition de la fluorescence a été réalisée grâce au cytomètre en flux Milteny MACS Quant (plateforme MRI). Les analyses ont été réalisées sur le logiciel FlowJo.

Anticorps de référence : Anticorps Alexa Fluor® 488 anti-humain CD197/CCR7 (Biolegend – 353205)

Analyse des cytokines

Les surnageants issues des cellules différenciées à l'aide des cocktails M1/M2 ou des doubles brins d'ADN ont été collectés et congelés à -80°C. La quantification des cytokines M1 telles que le CXCL10, IL-1β et la quantification de la cytokine M2 CCL17 (TARC) a été évaluée à l'aide du kit LEGENDplex™ Human M1/M2 Macrophage Panel (Biolegend). La quantification des cytokines a été réalisée selon le protocole du fabricant.

Préparation des extraits cellulaires totaux et analyse Western Blot

Les cellules ont été lysées pendant 30 min à 4°C dans 5 volumes de TENTG-150 (20 mM de trisHCl pH 7,4, 0,5 mM d'EDTA, 150 mM de NaCl, 10 mM de KCl, 0,5 % de Triton X-100, 1,5 mM de MgCl2 et 10 % de glycérol) additionné de 10mM de β-mercaptoéthanol mM, PMSF 0,5 mM. Pour l'analyse des protéines phosphorylées, le tampon a été additionné de PhosphoSTOP (Roche). Les lysats cellulaires ont ensuite été centrifugés à 13 000rpm pendant 30 min à 4°C et les surnageants ont été collectés. Les protéines ont ensuite été quantifiées à l'aide de la méthode de Bradford et préparées dans du tampon Laemmli avant le chargement dans le gel. Les protéines (15-30 ug) ont été analysées sur des gels SDS-PAGE à 10 % ou 12 % (Invitrogen Novex Tris-glycine) ou sur gels gradients 4-12% NuPAGE™ (Invitrogen). Une fois la migration terminée, les gels ont été transférés sur membrane de nitrocellulose et incubés avec des anticorps primaires et secondaires. Tous les anticorps secondaires anti-HRP de souris et anti-HRP de lapin (Cell Signaling) ont été utilisés à une dilution de 1:2000. Les protéines ont été visualisées par chimioluminescence (SuperSignal West Pico ou Femto Thermo Scientific). Les images ont été acquises sur un ChemiDoc (Bio-Rad).

Primary Antibodies	Reference	dilution
anti-phospho IRF3 S386	Abcam EPR2346	1:1000
anti-IRF3	Cell Signaling D6I4C	1:1000
anti-phospho TBK1	Cell Signaling D52C2	1:1000
anti-TBK1	Cell Signaling D1B4	1:1000
anti-STING	Cell Signaling D2P2F	1:1000
anti-phospho STING **anti phospho-STING S366**	Cell Signaling D8F4W Cell signaling D7C3S	1:1000
anti- GAPDH	Proteintech Europe 800004-1-Ig	1:5000
anti-HSP90	Cell Signaling C45G5	1:1000
cGAS	Cell signaling - D1D3G	1:1000
P-DNA-PKcs S2056	Abcam – EPR5670	1:1000
DNA-PKcs	Bethyl - A300-517AT	1:500
Ku70	Cell signaling V540	1:1000
Ku80	Cell signaling 2753S	1:1000

Inhibition de DNA-PK

L'inhibiteur de DNA-PK, Nu7441 a été utilisé en culture cellulaire 2D sur les monocytes (THP1- et sur les macrophages prédifférenciés à une concentration de 2 microM, 1 heure avant stimulation avec les doubles brins d'ADN. D'autres doses ont été testées en modèle 3D sur les T98G comme indiqués dans les figures.

Etablissement de cultures sphéroïdes tridimensionnelles (3D) de glioblastome.

Pour la formation de sphéroïdes, des plaques 96 puits à fond rond Ultra-low Attachment (Corning) ont été utilisées. Des cellules humaines de glioblastome T98G empty et T98G cGASOE ont été ensemencées à une densité de 600 cellules par puit. La plaque à 96 puits a ensuite été centrifugée deux fois pendant 2 min à 200g. Trois jours après l'ensemencement, les sphéroïdes ont été traités ou non avec de la camptothécine et/ou un inhibiteur de DNA-PK (Nu7441). Les sphéroïdes ont été incubés à 37°C et scannés au cytomètre d'imagerie Celligo (Nexcelom) de J1 à J8 à l'IRCM (Plateforme MRI). L'évolution du volume des sphéroïdes a été estimé à l'aide du logiciel Celligo. A J8, les sphéroïdes ont été dissociés à la pipette et un test de viabilité cellulaire a été réalisé à l'aide du kit CellTiter-Glo® (Promega). La luminescence est mesurée à l'aide d'un luminomètre (TriStar LB 941).

Polarisation *in vitro* des macrophages à l'aide de milieux conditionnés de cellules de glioblastome

Pour évaluer l'effet des milieux T98G empty et cGASOE sur la polarisation des macrophages, les cellules THP-1 WT ont été ensemencées et prédifférenciées en utilisant du PMA (150 nM) pendant 24h. Après 24h, le milieu a été aspiré puis remplacé par du RPMI frais pendant 48h. En parallèle, des cellules T98G empty et cGASOE ont été ensemencées. Les milieux conditionnés issus des T98G empty et T98G cGASOE ont ensuite été collectés et filtrés. Le milieu conditionné frais a ensuite été dilué dans un nouveau milieu DMEM (2:1) et ajouté directement sur des macrophages prédifférenciés. Après 24h d'incubation, les cellules ont été collectées et une analyse qPCR a été effectuée pour évaluer l'expression des marqueur de polarisation des macrophages M1/M2.

B) *Expériences in-vivo*

Conditions d'élevage des poissons-zèbres

Les lignées de poisson zèbre (Danio rerio) ont été élevées au sein de l'animalerie d'AZELEAD dans des conditions standard d'élevage. Les poissons zèbres adultes (Danio rerio) ont été maintenus sur un cycle lumière/obscurité de 12/12h dans un système à recirculation partielle et nourris 3 fois/jour. Le croisement de la lignée de poisson zèbre transgénique homozygote tg(mfap4:RFP) marquant les macrophages totaux a été utilisé pour réaliser les expériences de transplantations présentées. Toutes les procédures expérimentales sur le poisson zèbre ont été réalisées dans l'animalerie d'AZELEAD conformément aux directives et réglementations européennes sur la protection des animaux du ministère français de la Santé (F341725).

Génération de lignées cellulaires cancéreuses humaines fluorescentes stables utilisées pour expériences sur le poisson zèbre

Pour obtenir les lignées de glioblastome fluorescentes T98G empty-GFP+ et T98G CGASOE GFP+, les lignées originales ont été transfectées de manière stable avec le plasmide sfGFP-N1 en utilisant du phosphate de calcium. Le plasmide sfGFP-N1 a été obtenu grâce à Michael Davidson et Geoffrey Waldo (plasmide Addgene #54737). Après la transfection du plasmide, les cellules fluorescentes ont été sélectionnées à l'aide de Geneticin (800 µg/mL) avant de pouvoir réaliser les expériences de transplantation sur le poisson zèbre.

Préparation des embryons et des cellules avant la xénotransplantation

Les embryons ont été initialement maintenus à 28 °C à une densité maximale de 50 embryons par boîte de Pétri dans de l'eau additionnée de 0,0002 % de bleu de méthylène (Sigma) utilisé comme agent antifongique. Après 24 heures, les embryons ont été placés dans de l'eau contenant 200 µM de phénylthiourée (PTU) pour empêcher la pigmentation des embryons.

Des cellules de glioblastome (T98G empty-GFP et T98G cGASOE-GFP) ont été récoltées à partir d'une boîte de Pétri de 100 mm le jour de la transplantation de xénogreffe. Les cellules ont été lavées avec du PBS et détachées à l'aide de Trypsine-Versene EDTA (Eurobio Scientific) à 37°C pendant 5 min. La trypsine-versène a été inactivée par l'ajout du milieu DMEM complet. Les cellules ont été centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min puis lavées avec du PBS. Enfin, les cellules ont été remises en suspension dans 50 à 100 µL de PBS pour assurer une suspension cellulaire hautement concentrée.

Xenotransplantation des cellules cancéreuses

Des capillaires en verre borosilicaté (D.E. : 1 mm, D.I. : 0,75 mm, Sutter Instrument) ont été préparés à l'aide d'une étireuse de micropipette en verre (Sutter Instrument). Les capillaires ont été remplis de 10 µL de suspension de cellules. L'injection a été réalisée sous un stéréomicroscope (microscope à zoom stéréo Leica M80) en utilisant un micromanipulateur (Narishige) et un microinjecteur manuel à huile (Cell Tram Vario Eppendorf). Avant la xénogreffe, les embryons ont été anesthésiés dans 0,16 mg/ml de PBS/Tricaine (MS-222) puis soigneusement alignés dorsalement afin de réaliser la transplantation. Les embryons ont été maintenus en place pendant l'injection à l'aide d'une pince. Les cellules de glioblastome ont été transplantées dans la région du mésencéphale. Entre 50 et 100 cellules ont été transplantées par embryon. Après xénotransplantation, chaque embryon a été placé dans un moule adapté dans une plaque 96 puits (conçus par la société AZELEAD). Les embryons transplantés ont été maintenus à 33°C dans de l'eau contenant du PTU.

Acquisition d'images par microscopie

Les embryons avec une masse tumorale fluorescente dans le cerveau ont été sélectionnés pour l'acquisition d'images. Les embryons ont été imagés individuellement du jour de la transplantation (J0) à J2. Chaque jour, les embryons transplantés ont été anesthésiés dans les plaques 96 puits et positionnés manuellement en orientation dorsale dans le moule. Les images du Z-stack (98 µm) ont été acquises via un système Cell Discoverer 7 (Zeiss) avec un intervalle entre chaque z de 2 µm. L'objectif utilisé était de 5x/Zoom 2x). Les LED 470 et 567nm ont été utilisées avec les filtres appropriés.

Analyse d'image

Les images ont été traitées en utilisant Fiji. Afin d'estimer la masse tumorale, une projection de l'ensemble du Z a été réalisée à l'aide du logiciel Zen (Zeiss). Un seuil a ensuite été appliqué sur Fiji pour chaque embryon à J0, J1 et J2 pour déterminer l'aire tumorale. L'aire tumorale a ensuite été normalisée au jour de la transplantation (J0) pour évaluer la croissance tumorale des lignées cellulaires T98G empty et T98G cGASOE. Les macrophages recrutés autour du site tumoral ont été comptés manuellement sur Fiji en se déplaçant dans l'ensemble du Z-stack.

Pour caractériser le caractère invasif, les cellules allongées ont été comptées manuellement sur Fiji. Les images ont été préparées à l'aide du programme Fiji en ajustant la luminosité ainsi que le contraste.

Analyse de la polarisation des macrophages à partir d'embryons transplantés de poisson zèbre

Les embryons à 3dpf ont été xénotransplantés avec des cellules T98G empty ou T98G CGASOE. Les embryons contrôles ont été injectés avec du PBS. Le jour suivant (J1) après anesthésie la région de la tête a été isolée manuellement du reste du corps avec une lame stérile sous un stéréomicroscope. 25 têtes d'embryons ont ensuite été regroupées dans un tube de 2mL (SARSTEDT #72.693.465) contenant du trizol et des billes métalliques (2.4mm bead media VWR) et congelé à -80°C. Avant l'extraction d'ARN, les têtes ont été dissociées dans du trizol à l'aide d'un machine de préparation rapide Fastprep 24™ (MP). L'ARN a été extrait selon la technique précédemment décrite. L'expression relative des marqueurs des macrophages du poisson zèbre M1 et M2 a été normalisée à ef1a comme gène de référence. Chaque point représente un pool de 25 embryons. La spécificité des amorces ZF a été évaluée, le Tm a été contrôlé.
Les amorces utilisées sont répertoriées ci-dessous :

Primers	Forward	Reverse
ZF-TNFα	GGA GAG TTG CCT TTA CCG CT	CCT GGG TCT TAT GGA GCG TG
ZF-CXCL11	ACT CAA CAT GGT GAA GCC AGT GCT	CTT CAG CGT GGC TAT GAC TTC CAT
ZF-Arg2	GAA GCC GTT CCT GTC TGC CA	TCG GCC TTT GCT TCC TTG CC
ZF-IL10	TCA GAG CAG GAG AGT CGA ATG CA	CGA TTG GGG TTG TGG AGT GCT T
ZF ef1a	AGA AGG CTG CCA AGA CCA AG	AGA GGT TGG GAA GAA CAC GC

Analyses statistiques

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide de GraphPad Prism version 8. Les tests statistiques appropriés effectués sont indiqués dans les légendes des figures.

Annexe 1

Mini-review publiée dans la revue Frontiers in Immunology – Avril 2021

« Nucleic Acid Immunity and DNA Damage Response : New friends and old foes"

frontiers in Immunology

MINI REVIEW
published: 26 April 2021
doi: 10.3389/fimmu.2021.660560

Nucleic Acid Immunity and DNA Damage Response: New Friends and Old Foes

Clara Taffoni[1*], *Alizée Steer*[1], *Johanna Marines*[1,2], *Hanane Chamma*[1], *Isabelle K. Vila*[1] *and Nadine Laguette*[1*]

[1] Institut de Génétique Humaine, CNRS, Université de Montpellier, Molecular Basis of Inflammation Laboratory, Montpellier, France, [2] Azelead, Montpellier, France

The maintenance of genomic stability in multicellular organisms relies on the DNA damage response (DDR). The DDR encompasses several interconnected pathways that cooperate to ensure the repair of genomic lesions. Besides their repair functions, several DDR proteins have emerged as involved in the onset of inflammatory responses. In particular, several actors of the DDR have been reported to elicit innate immune activation upon detection of cytosolic pathological nucleic acids. Conversely, pattern recognition receptors (PRRs), initially described as dedicated to the detection of cytosolic immune-stimulatory nucleic acids, have been found to regulate DDR. Thus, although initially described as operating in specific subcellular localizations, actors of the DDR and nucleic acid immune sensors may be involved in interconnected pathways, likely influencing the efficiency of one another. Within this mini review, we discuss evidences for the crosstalk between PRRs and actors of the DDR. For this purpose, we mainly focus on cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthetase (cGAS) and Interferon Gamma Inducible Protein 16 (IFI16), as major PRRs involved in the detection of aberrant nucleic acid species, and components of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) complex, involved in the repair of double strand breaks that were recently described to qualify as potential PRRs. Finally, we discuss how the crosstalk between DDR and nucleic acid-associated Interferon responses cooperate for the fine-tuning of innate immune activation, and therefore dictate pathological outcomes. Understanding the molecular determinants of such cooperation will be paramount to the design of future therapeutic approaches.

Keywords: cytosolic nucleic acids, DNA damage responses, inflammation, cGAS-STING, IFI16, DNA-PK, tumorigenesis

OPEN ACCESS

Edited by:
Heiko Mühl,
Goethe University Frankfurt, Germany

Reviewed by:
Michael Paul Gantier,
Hudson Institute of Medical Research, Australia
Patricia Fitzgerald-Bocarsly,
The State University of New Jersey, United States

***Correspondence:**
Clara Taffoni
clara.taffoni@igh.cnrs.fr
Nadine Laguette
nadine.laguette@igh.cnrs.fr

Specialty section:
This article was submitted to Inflammation, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: *29 January 2021*
Accepted: *18 March 2021*
Published: *26 April 2021*

Citation:
Taffoni C, Steer A, Marines J, Chamma H, Vila IK and Laguette N (2021) Nucleic Acid Immunity and DNA Damage Response: New Friends and Old Foes. Front. Immunol. 12:660560. doi: 10.3389/fimmu.2021.660560

INTRODUCTION

Innate immunity, the first line of host defense, is classically triggered in response to pathogen infection or local lesions to promote infection clearance or wound-healing processes. The activation of innate immune responses vastly relies on pattern-recognition receptors (PRRs) that detect danger associated molecular patterns (DAMPs) or pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Upon recognition of PAMPs or DAMPs, PRRs trigger signaling cascades leading to the production of

soluble mediators, such as type I Interferons, cytokines and chemokines. Pathogen-derived nucleic acids constitute major PAMPs that are detected by a vast array of PRRs that operate in specific subcellular localizations. In recent years, self-nucleic acids, originating from replication stress (1), DNA or mitochondrial damage (2), and endogenous retroelement activation (3), have been identified as substrates for cytosolic PRRs, and are thus considered as DAMPs. Because nucleic acids are abundant in cells, the activity of PRRs engaged in their detection is regulated and compartmentalized (4). PRRs dedicated to nucleic acid detection also present substrate specificity, with subclasses dedicated to the detection of particular moieties (5).

A plethora of cytosolic nucleic acid sensors have been described to participate in triggering Interferon responses. Such receptors notably include the ubiquitous DNA-dependent activator of Interferon regulatory factors (DAI) (6), AIM2 (7, 8), Interferon gamma-inducible protein 16 (IFI16) (9), melanoma differentiation factor 5 (MDA5) (10) and retinoic acid-inducible gene (RIG-I) (10). An extensive description of the mechanism of action of the above mentioned PRRs can be found in (11). Among pathways involved in cytosolic nucleic acid detection, the Stimulator of Interferon genes (STING) protein constitutes a central signaling hub (12, 13). Initial reports indicated that STING activation requires detection of cytosolic nucleic acid species such as double strand (dsDNA), single strand (ssDNA), or RNA : DNA species (14–16) by the cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase (cGAS) PRR (14). The main signature of activation of this signaling pathway is the production of type I Interferons that in turn promote the production of interferon-stimulated genes (ISGs). This signaling pathway has attracted tremendous biomedical interest in recent years, notably with observation that agonists of STING can boost antitumoral immunity (17).

However, there is emerging evidence for an intricate signaling network beyond the cGAS-STING cascade, which cannot be overlooked in therapeutic strategies aiming to boost STING activation. Of particular importance is the fact that cGAS and STING have been both described as involved in genotoxic stress response and to participate to the maintenance of genomic integrity. Furthermore, the DNA-PK complex, which is best known for its function in non-homologous end-joining (NHEJ)-mediated repair of dsDNA breaks (DSB), has been shown to serve as an alternative route to stimulate type I Interferon production (18–21). In parallel, the Interferon Gamma Inducible Protein 16 (IFI16) was also reported to detect, in concert or not with cGAS, DNA damage-derived nucleic acid species (9, 22, 23), and to cooperate with DDR proteins to promote STING-dependent immune responses following genotoxic stress (22). Furthermore, cGAS and STING have been shown to control genomic stability (24, 25). Thus, the current literature highlights tight connections between DNA repair processes and nucleic acid-associated inflammatory responses. Indeed, proteins involved in the recognition of abnormal DNA, regardless of their origin, appear to possess common roles in the initiation of inflammatory responses and surveillance of genomic integrity.

In this *mini review*, we discuss this interconnection between DNA repair mechanisms and nucleic acid immunity, by focusing on the cGAS and IFI16 receptors and the way in which they control STING activation. While several DNA repair proteins have been involved in the fine tuning of inflammatory responses (22, 26), here we focus on the DNA-PK complex, responsible for NHEJ, for which a role in controlling nucleic acid-dependent inflammatory responses has been reported (26). We discuss how dissecting these signaling networks will deepen our understanding of Interferon responses, which is likely crucial to the design of therapeutic responses to pathological inflammation.

CYTOSOLIC NUCLEIC ACID DETECTION: STING AS A CENTRAL SIGNALING HUB

The cGAS-STING Pathway

The production of type I Interferons, in the presence of cytosolic nucleic acid species, was initially described to rely mostly on cGAS (14). Indeed, cGAS detects dsDNA, ssDNA, or RNA : DNA species (14–16) in the cytosol and catalyzes the synthesis of cGAMP (**Figure 1A**). Although the binding of cGAS to nucleic acid species is sequence-independent, cGAS activation is increased by longer dsDNA fragments (27, 28), suggesting that portions of chromosomes, such as those arising in the micronucleation process, would serve as potent substrates for cGAS. cGAMP interacts with the endoplasmic reticulum (ER)-resident STING adaptor protein (29, 30), promoting conformational changes (29, 31), oligomerization (32) and translocation to perinuclear compartments, including the Golgi apparatus (12, 33). Subsequent recruitment of the TANK-binding kinase 1 (TBK1) (34), together with transcription factors, such as Nuclear Factor Kappa B (NF-κB) and Interferon Response Factor 3 (IRF3), ultimately leads to the transcription of a repertoire of inflammatory cytokines characterized by a type I Interferon signature (12, 35) (**Figure 1A**). NF-κB activation may also be promoted by IKKε, in addition to TBK1, in macrophages (36). The cGAS-STING cascade is triggered upon cytosolic exposure of foreign nucleic acid species, following pathogen infection, but also by nucleus- and mitochondria-derived self-nucleic acids that leak into the cytosol following various types of stress (2, 37–40) and through DNA recombination processes (41).

Yet, the cGAS-cGAMP-STING signaling axis has recently emerged as far more complex than initially anticipated. First, multiple post-translational modifications influence signaling output (42–44). Second, STING can be directly activated by bacterial cyclic di-nucleotides (45, 46), while its activation is skewed by alternative di-nucleotides (16) or other metabolites (47). Third, co-sensors, co-factors and alternative upstream STING activators have been described, that can operate in cell type-specific manners (23, 48–50). Finally, in addition to the cell-autonomous capacity of cGAMP to activate STING-dependent Interferon responses, cGAS-STING signaling may also be amplified through transfer of cGAMP to neighboring cells

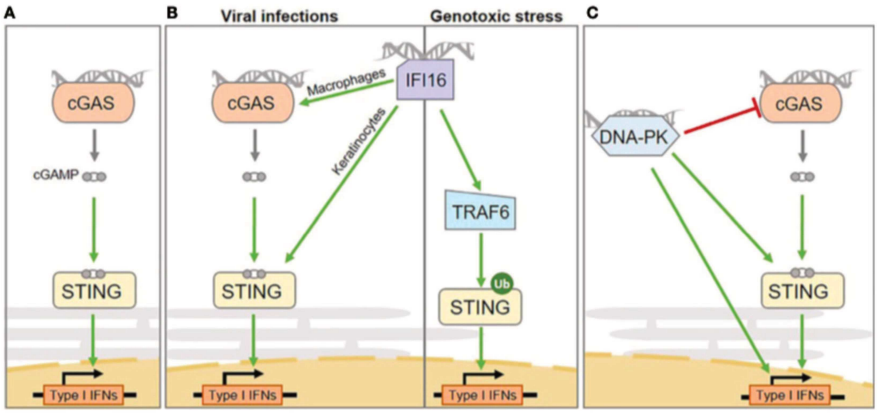


FIGURE 1 | Intertwined cytosolic nucleic acid pathways involved in Interferon and pro-inflammatory cytokine production in human cells. **(A)** The cGAS sensor activates STING *via* the production of the cGAMP second messenger. **(B)** *From left to right:* the IFI16 sensor mediates inflammation through multiple routes: upon viral infection it activates STING in a cell type-specific manner, either enhancing cGAS-dependent cGAMP production in macrophages or by directly activating STING in keratinocytes; upon genotoxic stress it mediates cGAS-independent, but TRAF6-dependent STING activation. **(C)** the DNA-PK DNA repair complex was shown to play a role in inducing type I Interferon production upon cytosolic dsDNA detection. However, multiple downstream mechanisms have been proposed, that require STING activation or not, ultimately leading to the phosphorylation of transcription factors responsible for type I Interferon production. The catalytic subunit of the DNA-PK complex (DNA-PKcs) can also suppress cGAS enzymatic activity, by promoting its phosphorylation. IFNs, Interferons.

through gap junctions (51–53), direct secretion (54) or in vesicles (55).

Below, we focus on IFI16 and DNA-PK as alternative sensors involved in the regulation of STING-dependent Interferon responses.

IFI16: An Alternative Nucleic Acid Sensor

IFI16 is a predominantly nuclear protein that has been described as involved in the induction of innate immune responses upon infection by viruses, including Herpes simplex virus (9), Epstein-Barr virus (56), and Kaposi's sarcoma-associated Herpes virus (57). Indeed, in this context, IFI16 promotes IRF3- and NF-κB-dependent Interferon production *via* STING (9) (**Figure 1B**). Similar to cGAS, IFI16 is capable of detecting self and non-self DNA, and displays a preference for long non-self dsDNA (58). Unlike cGAS, IFI16 operates mostly in a cell-type-dependent manner (23, 50). The interplay between cGAS and IFI16 has been explored, revealing cooperation between IFI16 and cGAS upon infection (**Figure 1B**, left). This cooperation relies on cell-type specific molecular mechanisms. Indeed, in both keratinocytes and macrophages, IFI16 cooperates with cGAS for STING activation upon infection (23, 50). However, in macrophages, IFI16 enhances cGAS-dependent cGAMP production (50), while in keratinocytes, IFI16 does not influence cGAMP production, but rather directly activates STING (23). Additionally, IFI16 has been shown to promote inflammasome activation in the nucleus, leading to production of Interleukin-1β (IL-1β), IL-18, and IL-33 cytokines (56, 59).

In contrast, following genotoxic stress, IFI16 triggers cGAS-independent STING activation (**Figure 1B**, right). Indeed, upon etoposide-induced DNA lesions, IFI16, together with DDR proteins, activates STING, promoting the assembly of a non-canonical STING signalosome (22). Within this complex IFI16 promotes TNF Receptor Associated Factor 6 (TRAF6)-dependent STING ubiquitination and activation ultimately leading to the predominant activation of the transcription factor NFκB, rather than IRF3 (22). Therefore, this signaling cascade results in the expression of a repertoire of cytokines that differs from that triggered upon cGAS-mediated detection of dsDNA, including a specific IL-6 and CCL20 signature (22). Yet, most of the described mechanisms were inferred from the study of keratinocytes or myeloid cell lines, leaving uncertainties concerning the activation of IFI16 in cancer cells.

DNA-PK: Bridging DNA Repair and Nucleic Acid Immunity

The DNA-PK complex has been reported to play a role in controlling nucleic acid-dependent inflammation. The DNA-PK complex is a key holoenzyme, composed of $KU70^{XRCC6}$, $KU80^{XRCC5}$ and the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit $DNA\text{-}PKcs^{PRKDC}$, central to the repair of DSBs by NHEJ. NHEJ is involved in the repair of approximately 80% of DSBs and can operate regardless of the cell cycle phase. It promotes relegation of DNA ends without requirement for an intact template (60). KU70/KU80 heterodimers interact directly with damaged DNA ends and are responsible for the recruitment of DNA-PKcs to these lesions. DNA-PKcs bears a kinase activity and promotes both DNA-PKcs autophosphorylation and the phosphorylating-activation of effector proteins required for the NHEJ process. For a complete recent view of NHEJ refer to (61).

Besides its canonical role in NHEJ while it recognizes self dsDNA, there are several reports for a central role of DNA-PK in the detection of exogenous DNA species and interference with

viral life cycles (62). Subunits of the complex have been independently reported to trigger or skew inflammatory responses toward either type I or type III Interferon production in response to non-self dsDNA. Indeed, KU70 triggers DNA-dependent type III Interferon responses through activation of Interferon Regulatory Factor 1 and 7 (IRF1 and IRF7) (19, 63), independently of DNA-PKcs (19).

In contrast, recent reports indicate that the catalytic activity of DNA-PKcs is also crucial for antiviral responses. Indeed, DNA-PKcs promotes IRF3 phosphorylation following infection by DNA and RNA viruses (18, 64) (**Figure 1C**). Interaction between DNA-PKcs and the progenome of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) retrovirus has also been shown, although the link to inflammation is unexplored (65). Interestingly, some DNA viruses have evolved proteins that counteract DNA-PKcs-dependent detection (20) while others hijack NHEJ to the benefit of their replication (66), highlighting the tight interplay between viral life cycles and DDR (67). Yet, there is as of today, limited knowledge concerning the ways in which DNA-PK-dependent inflammatory responses, IFI16- and cGAS-dependent STING activation are orchestrated.

Indeed, whether DNA-PK requires STING for production of Interferons remains debated (18, 20, 68) (**Figure 1C**). It was reported that DNA-PKcs is recruited to dsDNA in the cytoplasm of both human and murine cells through KU80, triggering IRF3-dependent inflammatory responses (18). However, while some reports indicate that the catalytic activity of DNA-PKcs is responsible for direct activating phosphorylation of IRF3 (64), others indicate that the measured Interferon production can occur independently of the catalytic activity of DNA-PKcs (18). In this latter scenario, questions remain open concerning what would trigger IRF3 activation. It has also been proposed that DNA-PKcs would act upstream of TBK1 and IRF3 (18) and that KU70 can form a complex with STING prior to (18), or upon (19) DNA transfection. This notion was comforted by Morchikh et al., in 2017, showing that DNA-PK subunits (DNA-PKcs, KU70 and KU80) are associated with a ribonuclear complex that is remodeled by foreign DNA, leading to enhanced recruitment of STING, activated DNA-PKcs, and IRF3 (68). However, a recent study has shown that DNA-PKcs can also operate independently of STING (20) and that DNA-PKcs can phosphorylate cGAS and suppresses its enzymatic activity (21) (**Figure 1C**). Considering the tight link between DNA-PK activation and cell cycle progression (69), and in view of the recent reports linking cGAS activation and cell cycle stage (70), the crosstalk between DNA-PK and cGAS-STING activation would certainly benefit from integrating the temporality of events to the study. In agreement, it was previously reported that inhibition of NHEJ components reduces Interferon signaling, in a cell cycle progression-dependent manner (71).

Adding a layer of complexity, DNA-PKcs immune signaling appears to be species-specific. Indeed DNA-PKcs can activate innate immune responses independently of STING in human cells, but not in murine cells (20). This is consistent with previous reports that in mouse cell lines, where the immune response is largely dependent on STING, DNA-PKcs would signal through STING (18). Furthermore, the current state-of-the-art does not allow determining whether the role of DNA-PK in inducing type I Interferon responses may be subjected to cell type-specific regulatory mechanisms, as was reported for IFI16. In this respect, how IFI16 activation is regulated in contexts where DNA-PKcs activates inflammatory responses remains to be elucidated.

REGULATION OF THE DNA DAMAGE RESPONSE BY INNATE IMMUNE SENSING PATHWAYS

cGAS Suppresses DNA Damage Responses

The cGAS protein was initially identified as the main receptor for cytosolic nucleic acid moieties that promote type I Interferon responses (14). However, it was recently demonstrated that an abundant pool of cGAS is tethered to the chromatin, in absence of inflammatory stimulus (72–74). Active export of cGAS through the Chromosomal Maintenance 1 (CRM1) exportin was recently demonstrated, suggesting that shuttling of cGAS to the cytosol may be a prerequisite for its activation (75). However, the molecular mechanisms triggering cGAS nuclear export and whether cGAS may also be activated in the nucleus, remains to be clarified. There is evidence for a role of cGAS in the inhibition of Homologous Recombination (HR)-mediated repair of DSB. Contrary to NHEJ, that operates in a cell cycle stage-independent manner, HR requires the presence of the sister chromatid for accurate repair of DNA lesions (76) and therefore operates mostly during the G2/M phase of the cell cycle. HR is a complex, multistep process that can be completed through several interconnected pathways, for which a complete overview can be found in (77). Two mechanisms have been proposed for cGAS-dependent HR inhibition (**Figure 2**, left). On one hand, Liu et al. showed that DNA damage triggers cGAS nuclear translocation and interaction with activated DNA damage-dependent Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP1), which is a first responder in DNA damage detection. Interaction of cGAS with PARP1 prevents the recruitment of proteins required to proceed through HR process and does not require the cGAS DNA-binding domain (79). However, since the majority of cellular cGAS is nuclear (72–74), one may question why the cytosolic rather than the chromatinian pool of cGAS would be mobilized. This may be linked to the high affinity of cGAS for the acidic patch of histones that renders chromatinian cGAS not easily displaceable (73). On the other hand, Jiang et al. observed that the DNA-binding domain of chromatin-bound cGAS is crucial for cGAS oligomerization on DNA, hindering the formation of displacement loops, which are required for HR to proceed (80). Consequently, upon irradiation, cells expressing cGAS present increased accumulation of DSBs as compared to cells that do not express cGAS. Intriguingly, this function is reportedly independent of cGAS-mediated innate immune sensing (80).

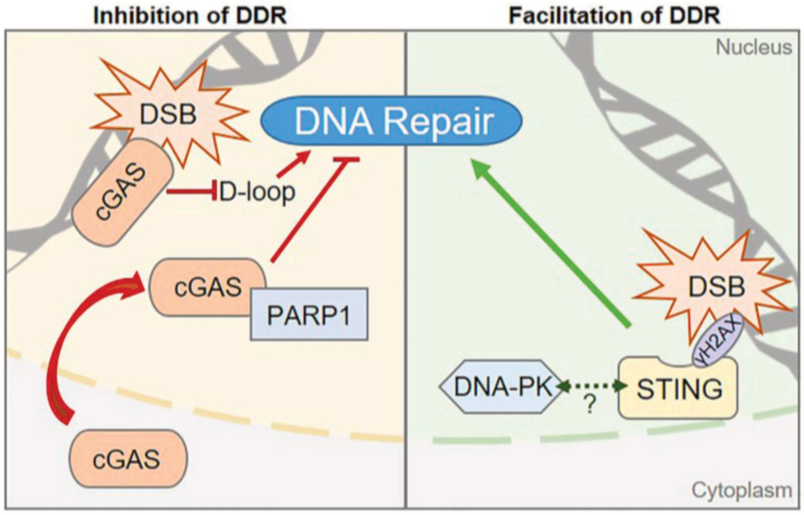


FIGURE 2 | Pattern Recognition Receptors are involved in regulating DNA damage repair processes. *Left*, The cGAS sensor can inhibit DNA Damage Responses (DDR) *via* two distinct mechanisms in human cells: 1) cGAS inhibits the Homologous Recombination (HR) pathway by preventing displacement loop (D-loop) formation. 2) cGAS-PARP1 interaction impedes the formation of a PARP1-based complex required for HR-mediated DNA repair. *Right*, STING promotes DDR in human cells through a yet to be elucidated molecular mechanism, but may rely on the control of components of the Non-Homologous End Joining DNA repair pathway, such as the DNA-PK complex. Dashed arrow between STING and DNA-PK represents the reported interaction between the two proteins (19, 68, 78). Whether this interaction is related to STING-associated DDR control is unknown.

STING as a Promoter of DNA Damage Responses

STING, the major downstream partner of cGAS, has been proposed to promote DDR and to enable cell survival, in an inflammation-independent manner (**Figure 2**, right). An important part of the regulation of STING activation is linked to its subcellular localization, with inactive STING resting in the ER and activation promoting its relocalization to the Golgi apparatus. Interestingly, in certain contexts, such as following chemotherapy regimens, STING colocalizes with γH2AX-positive DNA damage foci, at the inner nuclear membrane (78). In addition, cells knocked-down for STING present accumulation of DNA damage as compared to WT cells (78). No clear molecular mechanism has been proposed yet, although STING has been demonstrated to interact with NHEJ proteins, including DNA-PKcs, KU70 and KU80 (18, 19, 68, 78), suggesting that it may participate directly in the regulation of NHEJ. Moreover, STING overexpression leads to increased binding of DNA-PK to chromatin, suggesting that STING may cooperate with DNA-PK to control NHEJ-mediated DNA repair (78). However, the contribution of STING to NHEJ efficiency was not addressed, calling for further investigation.

Altogether, the subcellular localization of PRRs is central to the regulation of their activity, and determines whether they mediate repair- or immune-related functions. This is similar to what is witnessed for components of DNA-PK that are engaged in DNA repair or innate immune activation, depending on their subcellular localization and interactors. How these pathways cooperate or antagonize each other in given pathological situations, and in particular in the case of genotoxic stress that induces both repair and immune activation, remains to be elucidated.

COOPERATION BETWEEN DDR AND INNATE IMMUNITY IN TUMORIGENESIS

The interplay between innate immune activation and DNA repair pathways is likely to be central to our understanding of several human pathologies. For instance, several cancer susceptibility syndromes, such as Fanconi Anemia, that present with inheritable deficiencies in DNA repair pathways also display hematological disorders, such as bone marrow failure or auto-immunity, together with elevated type I Interferon levels. Mutations in DNA repair proteins are also found in diseases primarily defined as auto-inflammatory as described thoroughly in Ragu et al. (26). Indeed, deficient DDR frequently leads to pathologies, such as Ataxia-Telangiectasia, Werner Syndrome and Bloom Syndrome, in which inflammation plays a great part (81–83). Likewise, chronic inflammation plays an important role in all stages of sporadic cancer, from the onset of neoplastic lesions to metastatic dissemination (84).

Although STING targeting immunotherapies have seen a huge biomedical interest in recent years, the study of the

impact of STING activation on tumorigenesis has revealed an extremely complex relationship with tumor fate. In many cases STING activation has been shown to promote tumor clearance. Nucleic acid substrates for cGAS in tumors can result from the release of chromatin fragments in the cytosol of tumor cells (85), leading to cGAS-STING activation and cell cycle arrest (85–87). In addition, released self-DNA, from dying tumor cells in the tumor microenvironment can be engulfed by intra-tumoral antigen-presenting cells (APCs), such as dendritic cells and macrophages and likely activates the cGAS-STING pathway (88), through mechanisms that are still under debate (89). The resulting cGAS-STING pathway activation promotes maturation and cross-presentation (90), ultimately leading to the recruitment and the infiltration of cytotoxic CD8(+) T cells at the tumor site (91, 92). Moreover, tumor-derived cGAMP promotes immune cells infiltration (52). Importantly, the cGAS-STING pathway was shown to potentiate the response to radiotherapy and chemotherapy (88, 93) and to synergize with checkpoint inhibitors (94, 95). Thus, activating the cGAS-STING axis in combination with chemotherapy and/or immunotherapy appears as a valuable therapeutic strategy.

However, there is evidence that cGAS-STING-dependent inflammation can fuel tumorigenesis (96), promote tolerogenic responses, impair the establishment of long-term immunity (97) and lead to chemoresistance (98, 99). Indeed, transfer of cGAMP from metastatic cells to astrocytes through gap junctions was also shown to support metastatic dissemination and chemoresistance (100). Finally, accumulation of micronuclei in the cytoplasm of cancer cells following ionizing radiation promotes STING-dependent inflammation (40, 71) and metastasis (101). It has been proposed that tumor grade and origin may account for these differential outcomes following cGAS-STING stimulation, calling for stratification strategies to identify patients that would benefit from cGAS-STING targeting immunotherapies.

Moreover, present therapeutic regimens include the use of DDR inhibitors in combination or not with radiotherapy (94, 102–104). Indeed, this approach induces accumulation of inflammatory cytosolic nucleic acids, leading to cGAS-STING pathway activation (95, 105) and promoting T cell infiltration and thus tumor regression (95, 102). Significant tumor regression has also been observed using DNA-PKcs inhibitors in combination with chemotherapy or radiotherapy (69), however the role of inflammation in this process is at present unexplored. Considering the emerging role of DDR proteins in innate immune responses, it is tempting to speculate that upon genotoxic stress, DDR proteins may directly fuel cancer-related inflammatory responses. In addition, numerous tumors down regulate the expression of cGAS and/or STING (106, 107). In these contexts, it would be important to examine if DDR proteins may take over the production of inflammatory cytokines.

Furthermore, STING activation has been shown to promote two distinct transcriptional programs. On one hand, activation of genes under the control IRF-3, leads mostly to the production of type I Interferons that are generally accepted as acting anti-cancer agents (108), while NF-κB activation promotes the production of cytokines that are mostly considered pro-tumorigenic, such as IL-6 (109, 110). Indeed, increased plasma levels of IL-6 generally negatively correlate with patient survival in many cancers (110). It would be crucial to determine whether the differential outcomes of STING activation observed in studies describing STING activation as pro-tumorigenic would result from IL-6 secretion. Ultimately, it would be crucial to determine, in those contexts where alternative receptors to cGAS would potentiate STING-dependent signaling, whether they would lead to skewing of the response toward IL-6 production and promote pathological outcomes.

Reciprocally, regulation of DDR by PRRs is likely to affect tumorigenesis. HR inhibition by chromatin-bound cGAS accelerates genome destabilization and micronuclei generation, leading to cell death both *in vitro* and *in vivo* (80). Thus, cGAS may thereby restrict the propagation of cancer cells. To the contrary, alterations of cGAS shuttling toward the cytosol correlate with poor patient prognosis (79). This suggests that nuclear translocation of cGAS and subsequent HR inhibition may promote tumorigenesis (79), although this may also be linked to defective cGAS-dependent Interferon responses. Furthermore, IFI16 has also been reported to present nuclear functions (57, 111), including a role in regulation of cell cycle arrest (111, 112). Supporting an association between IFI16 and tumorigenesis, IFI16 levels are frequently decreased in breast cancer cell lines (113). Yet, there is as of today no clear implication of IFI16-dependent cytokine production in tumorigenesis. This leaves open the possibility that IFI16 may be mobilized in tumors where cGAS expression is downregulated. Thus, deciphering the molecular cues leading to the mobilization of the different pools of cGAS, or alternative receptors such as IFI16, to detect immune-stimulatory DNA - and the impact of the different PRRs in DNA damage responses - is likely primordial to the understanding of how nucleic acid detection dictates tumor fate.

DISCUSSION

Accumulation of cytosolic nucleic acids, including ssDNA, dsDNA and RNA : DNA hybrids, has been documented in several etiologically distinct human pathologies that present with pathological type I Interferon responses (114). Importantly, the range of symptoms experienced by patients is broad, and as of today not fully understood.

Much attention was brought to the cGAS-STING axis, notably because it was shown that cGAS is non-dispensable for STING activation *in vivo*. Indeed, in cells, including dendritic cells, macrophages or fibroblasts, from cGAS-deficient mice, nucleic acid-dependent STING activation was abolished (115). Yet, recent research has underlined the existence of species-specificities in innate immune detection of nucleic acids (116). Thus, although the cGAS-STING cascade represents a crucial cytosolic dsDNA detection route, a more complex picture is currently emerging. In addition to the many direct regulators of the cGAS-STING pathway, alternative receptors such as IFI16 and DNA-PK, may mediate stimulus-specific Interferon

responses. Therefore, previously overlooked nucleic acid sensors should be re-examined (117). In particular, the recently uncovered cooperation between DDR and nucleic acid immunity can be expected to contribute to the health alterations witnessed in patients presenting with chronic inflammation while feeding cancer susceptibility directly.

Importantly, in inflammatory pathologies, it is generally considered a risky approach to directly act on pathways responsible for Interferon production (118). This is intrinsically linked to the duality of the impacts of Interferons, that can either be beneficial or promote cytopathic effects, depending on multiple parameters that are as of today poorly understood. Several chronic inflammatory pathologies, presenting with type I Interferon overproduction, such as type I Interferonopathies, or Aicardi-Goutières Syndromes are treated with inhibitors of the Janus kinase 1, 2 and 3 (119). This treatment, rather that halting Interferon production, prevents the induction of ISGs following the interaction of Interferons with its cognate receptor. However, such disruption of immune pathways comes at the expense of increased risk of infection (119). Identification of pathways responsible for activation of pathological immune responses and the design of specific targeting strategies may be valuable in these pathologies. Addressing whether DDR proteins are involved in the inflammatory signature present in these diseases is thus important.

Altogether, the current state-of-the-art supports that STING is an attractive target for the treatment of autoimmune, inflammatory diseases and cancer (17, 120). However, emerging regulators, cell type specific or stimulus specific responses, together with alternative functions of STING and its activators, indicate that our understanding of nucleic acid immunity is still in its infancy. Our view of how immune-stimulatory DNAs are detected is likely grow in complexity, notably with the addition of DNA repair proteins to the list of PRRs. Therefore, the regulatory mechanisms and crosstalk between engaged pathways will surely remain an area of intense research in coming years.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CT, AS, IV, HC, JM, and NL drafted and edited the manuscript. Visualization: IV. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

Work in NL's laboratory is supported by grants from the European Research Council (ERC-Stg CrIC: 637763, ERC-PoC DIM-CrIC: 893772), "LA LIGUE pour la recherche contre le cancer" and the "Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites virales" (ANRS). CT was supported by Merck Sharp and Dohme Avenir (MSD-Avenir – GnoSTic) program, followed by an ANRS fellowship (ECTZ119088). JM was supported by a "Conventions Industrielles de Formation par la Recherche" (CIFRE) fellowship from the "Agence Nationale de Recherche Technologie" (ANRT). AS is supported by the ERC-PoC DIM-CrIC (893772). IV was supported by the European Research Council (637763) followed by the Prix Roger PROPICE pour la recherche sur le cancer du pancréas of the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, ARF20170938586). HC is supported by a PhD Fellowship from "La Ligue contre le cancer" (TAGQ21108). We acknowledge the SIRIC Montpellier Cancer Grant INCa_Inserm_DGOS_12553 for support.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Langevin for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Coquel F, Silva MJ, Techer H, Zadorozhny K, Sharma S, Nieminuszczy J, et al. SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction. *Nature* (2018) 557:57–61. doi: 10.1038/s41586-018-0050-1
2. Rongvaux A, Jackson R, Harman CC, Li T, West AP, de Zoete MR, et al. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell* (2014) 159:1563–77. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.037
3. Bregnard C, Guerra J, Dejardin S, Passalacqua F, Benkirane M, Laguette N. Upregulated LINE-1 Activity in the Fanconi Anemia Cancer Susceptibility Syndrome Leads to Spontaneous Pro-inflammatory Cytokine Production. *EBioMedicine* (2016) 8:184–94. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.05.005
4. Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* (2009) 9:535–42. doi: 10.1038/nri2587
5. Chuenchor W, Jin T, Ravilious G, Xiao TS. Structures of pattern recognition receptors reveal molecular mechanisms of autoinhibition, ligand recognition and oligomerization. *Curr Opin Immunol* (2014) 26:14–20. doi: 10.1016/j.coi.2013.10.009
6. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* (2007) 448:501–5. doi: 10.1038/nature06013
7. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* (2009) 458:514–8. doi: 10.1038/nature07725
8. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* (2009) 458:509–13. doi: 10.1038/nature07710
9. Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol* (2010) 11:997–1004. doi: 10.1038/ni.1932
10. Jiang X, Kinch LN, Brautigam CA, Chen X, Du F, Grishin NV, et al. Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. *Immunity* (2012) 36:959–73. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.022
11. Unterholzner L. The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors? *Immunobiology* (2013) 218:1312–21. doi: 10.1016/j.imbio.2013.07.007
12. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* (2009) 461:788–92. doi: 10.1038/nature08476
13. Barber GN. STING: infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol* (2015) 15:760–70. doi: 10.1038/nri3921

14. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* (2013) 339:786–91. doi: 10.1126/science.1232458
15. Kranzusch PJ, Lee AS, Berger JM, Doudna JA. Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. *Cell Rep* (2013) 3:1362–8. doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.008
16. Guerra J, Valadao AL, Vlachakis D, Polak K, Vila IK, Taffoni C, et al. Lysyl-tRNA synthetase produces diadenosine tetraphosphate to curb STING-dependent inflammation. *Sci Adv* (2020) 6:eaax3333. doi: 10.1126/sciadv.aax3333
17. Li A, Yi M, Qin S, Song Y, Chu Q, Wu K. Activating cGAS-STING pathway for the optimal effect of cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* (2019) 12:35. doi: 10.1186/s13045-019-0721-x
18. Ferguson BJ, Mansur DS, Peters NE, Ren H, Smith GL. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *Elife* (2012) 1:e00047. doi: 10.7554/eLife.00047
19. Sui H, Zhou M, Imamichi H, Jiao X, Sherman BT, Lane HC, et al. STING is an essential mediator of the Ku70-mediated production of IFN-lambda1 in response to exogenous DNA. *Sci Signal* (2017) 10:488. doi: 10.1126/scisignal.aah5054
20. Burleigh K, Maltbaek JH, Cambier S, Green R, Gale MJr., James RC, et al. Human DNA-PK activates a STING-independent DNA sensing pathway. *Sci Immunol* (2020) 5:43. doi: 10.1126/sciimmunol.aba4219
21. Sun X, Liu T, Zhao J, Xia H, Xie J, Guo Y, et al. DNA-PK deficiency potentiates cGAS-mediated antiviral innate immunity. *Nat Commun* (2020) 11:6182. doi: 10.1038/s41467-020-19941-0
22. Dunphy G, Flannery SM, Almine JF, Connolly DJ, Paulus C, Jonsson KL, et al. Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-kappaB Signaling after Nuclear DNA Damage. *Mol Cell* (2018) 71:745–760 e5. doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.034
23. Almine JF, O'Hare CA, Dunphy G, Haga IR, Naik RJ, Atrih A, et al. IFI16 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes. *Nat Commun* (2017) 8:14392. doi: 10.1038/ncomms14392
24. Basit A, Cho MG, Kim EY, Kwon D, Kang SJ, Lee JH. The cGAS/STING/TBK1/IRF3 innate immunity pathway maintains chromosomal stability through regulation of p21 levels. *Exp Mol Med* (2020) 52:643–57. doi: 10.1038/s12276-020-0416-y
25. Chen H, Chen H, Zhang J, Wang Y, Simoneau A, Yang H, et al. cGAS suppresses genomic instability as a decelerator of replication forks. *Sci Adv* (2020) 6:42. doi: 10.1126/sciadv.abb8941
26. Ragu S, Matos-Rodrigues G, Lopez BS. Replication Stress, DNA Damage, Inflammatory Cytokines and Innate Immune Response. *Genes (Basel)* (2020) 11:4. doi: 10.3390/genes11040409
27. Luecke S, Holleufer A, Christensen MH, Jonsson KL, Boni GA, Sorensen LK, et al. cGAS is activated by DNA in a length-dependent manner. *EMBO Rep* (2017) 18:1707–15. doi: 10.15252/embr.201744017
28. Andreeva L, Hiller B, Kostrewa D, Lassig C, de Oliveira Mann CC, Jan Drexler D, et al. cGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein-DNA ladders. *Nature* (2017) 549:394–8. doi: 10.1038/nature23890
29. Zhang X, Shi H, Wu J, Zhang X, Sun L, Chen C, et al. Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol Cell* (2013) 51:226–35. doi: 10.1016/j.molcel.2013.05.022
30. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* (2013) 339:826–30. doi: 10.1126/science.1229963
31. Gao P, Ascano M, Zillinger T, Wang W, Dai P, Serganov AA, et al. Structure-function analysis of STING activation by cG(2',5')pA(3',5')p. and targeting by antiviral DMXAA. *Cell* (2013) 154:748–62. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.023
32. Shang G, Zhang C, Chen ZJ, Bai XC, Zhang X. Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP-AMP. *Nature* (2019) 567:389–93. doi: 10.1038/s41586-019-0998-5
33. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* (2009) 106:20842–6. doi: 10.1073/pnas.0911267106
34. Tanaka Y, Chen ZJ. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci Signal* (2012) 5:ra20. doi: 10.1126/scisignal.2002521
35. Abe T, Barber GN. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-kappaB activation through TBK1. *J Virol* (2014) 88:5328–41. doi: 10.1128/JVI.00037-14
36. Balka KR, Louis C, Saunders TL, Smith AM, Calleja DJ, D'Silva DB, et al. TBK1 and IKKepsilon Act Redundantly to Mediate STING-Induced NF-kappaB Responses in Myeloid Cells. *Cell Rep* (2020) 31(1):107492. doi: 10.1016/j.celrep.2020.03.056
37. Tan X, Sun L, Chen J, Chen ZJ. Detection of Microbial Infections Through Innate Immune Sensing of Nucleic Acids. *Annu Rev Microbiol* (2018) 72:447–78. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095605
38. Klarquist J, Hennies CM, Lehn MA, Reboulet RA, Feau S, Janssen EM. STING-mediated DNA sensing promotes antitumor and autoimmune responses to dying cells. *J Immunol* (2014) 193:6124–34. doi: 10.4049/jimmunol.1401869
39. Gao D, Li T, Li XD, Chen X, Li QZ, Wight-Carter M, et al. Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* (2015) 112:E5699–705. doi: 10.1073/pnas.1516465112
40. Mackenzie KJ, Carroll P, Martin CA, Murina O, Fluteau A, Simpson DJ, et al. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature* (2017) 548:461–5. doi: 10.1038/nature23449
41. Pepin G, Ferrand J, Honing K, Jayasekara WS, Cain JE, Behlke MA, et al. Cre-dependent DNA recombination activates a STING-dependent innate immune response. *Nucleic Acids Res* (2016) 44:5356–64. doi: 10.1093/nar/gkw405
42. Hopfner KP, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2020) 21:501–21. doi: 10.1038/s41580-020-0244-x
43. Abe T, Shapira SD. Negative Regulation of Cytosolic Sensing of DNA. *Int Rev Cell Mol Biol* (2019) 344:91–115. doi: 10.1016/bs.ircmb.2018.09.002
44. Saeed A, Ruan X, Guan H, Su J, Ouyang S. Regulation of cGAS-Mediated Immune Responses and Immunotherapy. *Adv Sci (Weinh)* (2020) 7:1902599. doi: 10.1002/advs.201902599
45. Ergun SL, Fernandez D, Weiss TM, Li L. STING Polymer Structure Reveals Mechanisms for Activation, Hyperactivation, and Inhibition. *Cell* (2019) 178:290–301 e10. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.036
46. Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* (2011) 478:515–8. doi: 10.1038/nature10429
47. Vila IK, Chamma H, Steer A, Taffoni C, Reinert LS, Turtoi E, et al. Control of polyunsaturated fatty acids desaturation by Sting regulates inflammatory responses. *bioRxiv* (2020). doi: 10.1101/2020.12.22.423950
48. Wang X, Majumdar T, Kessler P, Ozhegov E, Zhang Y, Chattopadhyay S, et al. STING Requires the Adaptor TRIF to Trigger Innate Immune Responses to Microbial Infection. *Cell Host Microbe* (2016) 20:329–41. doi: 10.1016/j.chom.2016.08.002
49. Li Y, James SJ, Wyllie DH, Wynne C, Czibula A, Bukhari A, et al. TMEM203 is a binding partner and regulator of STING-mediated inflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* (2019) 116:16479–88. doi: 10.1073/pnas.1901090116
50. Jonsson KL, Laustsen A, Krapp C, Skipper KA, Thavachelvam K, Hotter D, et al. IFI16 is required for DNA sensing in human macrophages by promoting production and function of cGAMP. *Nat Commun* (2017) 8:14391. doi: 10.1038/ncomms14391
51. Ablasser A, Schmid-Burgk JL, Hemmerling I, Horvath GL, Schmidt T, Latz E, et al. Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. *Nature* (2013) 503:530–4. doi: 10.1038/nature12640
52. Schadt L, Sparano C, Schweiger NA, Silina K, Cecconi V, Lucchiari G, et al. Cancer-Cell-Intrinsic cGAS Expression Mediates Tumor Immunogenicity. *Cell Rep* (2019) 29:1236–1248 e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.09.065
53. Pepin G, De Nardo D, Rootes CL, Ullah TR, Al-Asmari SS, Balka KR, et al. Connexin-Dependent Transfer of cGAMP to Phagocytes Modulates Antiviral Responses. *mBio* (2020) 11. doi: 10.1128/mBio.03187-19

54. Carozza JA, Böhnert V, Nguyen KC, Skariah G, Shaw KE, Brown JA, et al. Extracellular cGAMP is a cancer-cell-produced immunotransmitter involved in radiation-induced anticancer immunity. *Nat Cancer* (2020) 1:184–96. doi: 10.1038/s43018-020-0028-4
55. Gentili M, Kowal J, Tkach M, Satoh T, Lahaye X, Conrad C, et al. Transmission of innate immune signaling by packaging of cGAMP in viral particles. *Science* (2015) 349:1232–6. doi: 10.1126/science.aab3628
56. Ansari MA, Singh VV, Dutta S, Veettil MV, Dutta D, Chikoti L, et al. Constitutive interferon-inducible protein 16-inflammasome activation during Epstein-Barr virus latency I, II, and III in B and epithelial cells. *J Virol* (2013) 87:8606–23. doi: 10.1128/JVI.00805-13
57. Kerur N, Veettil MV, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P, et al. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe* (2011) 9:363–75. doi: 10.1016/j.chom.2011.04.008
58. Morrone SR, Wang T, Constantoulakis LM, Hooy RM, Delannoy MJ, Sohn J. Cooperative assembly of IFI16 filaments on dsDNA provides insights into host defense strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* (2014) 111:E62–71. doi: 10.1073/pnas.1313577111
59. Dutta D, Dutta S, Veettil MV, Roy A, Ansari MA, Iqbal J, et al. BRCA1 Regulates IFI16 Mediated Nuclear Innate Sensing of Herpes Viral DNA and Subsequent Induction of the Innate Inflammasome and Interferon-beta Responses. *PloS Pathog* (2015) 11:e1005030. doi: 10.1371/journal.ppat.1005030
60. Her J, Bunting SF. How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* (2018) 293:10502–11. doi: 10.1074/jbc.TM118.000371
61. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2017) 18:495–506. doi: 10.1038/nrm.2017.48
62. Schwartz C, Rohr O, Wallet C. Targeting the DNA-PK complex: Its rationale use in cancer and HIV-1 infection. *Biochem Pharmacol* (2019) 160:80–91. doi: 10.1016/j.bcp.2018.12.002
63. Zhang X, Brann TW, Zhou M, Yang J, Oguariri RM, Lidie KB, et al. Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN. *J Immunol* (2011) 186:4541–5. doi: 10.4049/jimmunol.1003389
64. Karpova AY, Trost M, Murray JM, Cantley LC, Howley PM. Interferon regulatory factor-3 is an in vivo target of DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99:2818–23. doi: 10.1073/pnas.052713899
65. Cooper A, Garcia M, Petrovas C, Yamamoto T, Koup RA, Nabel GJ. HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration. *Nature* (2013) 498:376–9. doi: 10.1038/nature12274
66. Frost JR, Olanubi O, Cheng SK, Soriano A, Crisostomo L, Lopez A, et al. The interaction of adenovirus E1A with the mammalian protein Ku70/XRCC6. *Virology* (2017) 500:11–21. doi: 10.1016/j.virol.2016.10.004
67. Bregnard C, Benkirane M, Laguette N. DNA damage repair machinery and HIV escape from innate immune sensing. *Front Microbiol* (2014) 5:176. doi: 10.3389/fmicb.2014.00176
68. Morchikh M, Cribier A, Raffel R, Amraoui S, Cau J, Severac D, et al. HEXIM1 and NEAT1 Long Non-coding RNA Form a Multi-subunit Complex that Regulates DNA-Mediated Innate Immune Response. *Mol Cell* (2017) 67:387–399 e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.020
69. Mohiuddin IS, Kang MH. DNA-PK as an Emerging Therapeutic Target in Cancer. *Front Oncol* (2019) 9:635. doi: 10.3389/fonc.2019.00635
70. Li T, Huang T, Du M, Chen X, Du F, Ren J, et al. Phosphorylation and chromatin tethering prevent cGAS activation during mitosis. *Science* (2021) 371. doi: 10.1126/science.abc5386
71. Harding SM, Benci JL, Irianto J, Discher DE, Minn AJ, Greenberg RA. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature* (2017) 548:466–70. doi: 10.1038/nature23470
72. Kujirai T, Zierhut C, Takizawa Y, Kim R, Negishi L, Uruma N, et al. Structural basis for the inhibition of cGAS by nucleosomes. *Science* (2020) 370:455–8. doi: 10.1126/science.abd0237
73. Michalski S, de Oliveira Mann CC, Stafford CA, Witte G, Bartho J, Lammens K, et al. Structural basis for sequestration and autoinhibition of cGAS by chromatin. *Nature* (2020) 587:6780–82. doi: 10.1038/s41586-020-2748-0
74. Pathare GR, Decout A, Gluck S, Cavadini S, Makasheva K, Hovius R, et al. Structural mechanism of cGAS inhibition by the nucleosome. *Nature* (2020) 587:668–72. doi: 10.1038/s41586-020-2750-6
75. Sun H, Huang Y, Mei S, Xu F, Liu X, Zhao F, et al. A Nuclear Export Signal Is Required for cGAS to Sense Cytosolic DNA. *Cell Rep* (2021) 34:108586. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108586
76. Mladenov E, Magin S, Soni A, Iliakis G. DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Front Oncol* (2013) 3:113. doi: 10.3389/fonc.2013.00113
77. Wright WD, Shah SS, Heyer WD. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* (2018) 293:10524–35. doi: 10.1074/jbc.TM118.000372
78. Cheradame L, Guerrera IC, Gaston J, Schmitt A, Jung V, Pouillard M, et al. STING Promotes Breast Cancer Cell Survival by an Inflammatory-Independent Nuclear Pathway Enhancing the DNA Damage Response. *bioRxiv* (2020). doi: 10.1101/2020.07.11.196790
79. Liu H, Zhang H, Wu X, Ma D, Wu J, Wang L, et al. Nuclear cGAS suppresses DNA repair and promotes tumorigenesis. *Nature* (2018) 563:131–6. doi: 10.1038/s41586-018-0629-6
80. Jiang H, Xue X, Panda S, Kawale A, Hooy RM, Liang F, et al. Chromatin-bound cGAS is an inhibitor of DNA repair and hence accelerates genome destabilization and cell death. *EMBO J* (2019) 38:e102718. doi: 10.15252/embj.2019102718
81. Zaki-Dizaji M, Akrami SM, Azizi G, Abolhassani H, Aghamohammadi A. Inflammation, a significant player of Ataxia-Telangiectasia pathogenesis? *Inflamm Res* (2018) 67:559–70. doi: 10.1007/s00011-018-1142-y
82. Davis T, Kipling D. Werner Syndrome as an example of inflamm-aging: possible therapeutic opportunities for a progeroid syndrome? *Rejuvenation Res* (2006) 9:402–7. doi: 10.1089/rej.2006.9.402
83. Gratia M, Rodero MP, Conrad C, Bou Samra E, Maurin M, Rice GI, et al. Bloom syndrome protein restrains innate immune sensing of micronuclei by cGAS. *J Exp Med* (2019) 216:1199–213. doi: 10.1084/jem.20181329
84. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* (2019) 51:27–41. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.025
85. Dou Z, Ghosh K, Vizioli MG, Zhu J, Sen P, Wangensteen KJ, et al. Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* (2017) 550:402–6. doi: 10.1038/nature24050
86. Gluck S, Guey B, Gulen MF, Wolter K, Kang TW, Schmacke NA, et al. Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat Cell Biol* (2017) 19:1061–70. doi: 10.1038/ncb3586
87. Yang H, Wang H, Ren J, Chen Q, Chen ZJ. cGAS is essential for cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci USA* (2017) 114:E4612–20. doi: 10.1073/pnas.1705499114
88. Deng L, Liang H, Xu M, Yang X, Burnette B, Arina A, et al. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* (2014) 41:843–52. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.019
89. Wan D, Jiang W, Hao J. Research Advances in How the cGAS-STING Pathway Controls the Cellular Inflammatory Response. *Front Immunol* (2020) 11:615. doi: 10.3389/fimmu.2020.00615
90. Wang H, Hu S, Chen X, Shi H, Chen C, Sun L, et al. cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* (2017) 114:1637–42. doi: 10.1073/pnas.1621363114
91. Padovan E, Spagnoli GC, Ferrantini M, Heberer M. IFN-alpha2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8+ effector T cells. *J Leukoc Biol* (2002) 71:669–76. doi: 10.1189/jlb.71.4.669
92. Ohkuri T, Kosaka A, Ishibashi K, Kumai T, Hirata Y, Ohara K, et al. Intratumoral administration of cGAMP transiently accumulates potent macrophages for anti-tumor immunity at a mouse tumor site. *Cancer Immunol Immunother* (2017) 66:705–16. doi: 10.1007/s00262-017-1975-1
93. Burnette BC, Liang H, Lee Y, Chlewicki L, Khodarev NN, Weichselbaum RR, et al. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type i interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res* (2011) 71:2488–96. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2820
94. Sheng H, Huang Y, Xiao Y, Zhu Z, Shen M, Zhou P, et al. ATR inhibitor AZD6738 enhances the antitumor activity of radiotherapy and immune checkpoint inhibitors by potentiating the tumor immune microenvironment in hepatocellular carcinoma. *J Immunother Cancer* (2020) 8. doi: 10.1136/jitc-2019-000340

95. Wang L, Yang L, Wang C, Zhao W, Ju Z, Zhang W, et al. Inhibition of the ATM/Chk2 axis promotes cGAS/STING signaling in ARID1A-deficient tumors. *J Clin Invest* (2020) 130:5951–66. doi: 10.1172/JCI130445
96. Ahn J, Xia T, Konno H, Konno K, Ruiz P, Barber GN. Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nat Commun* (2014) 5:5166. doi: 10.1038/ncomms6166
97. Chabanon RM, Muirhead G, Krastev DB, Adam J, Morel D, Garrido M, et al. PARP inhibition enhances tumor cell-intrinsic immunity in ERCC1-deficient non-small cell lung cancer. *J Clin Invest* (2019) 129:1211–28. doi: 10.1172/JCI123319
98. Liang H, Deng L, Hou Y, Meng X, Huang X, Rao E, et al. Host STING-dependent MDSC mobilization drives extrinsic radiation resistance. *Nat Commun* (2017) 8:1736. doi: 10.1038/s41467-017-01566-5
99. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* (2017) 168:707–23. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017
100. Chen Q, Boire A, Jin X, Valiente M, Er EE, Lopez-Soto A, et al. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature* (2016) 533:493–8. doi: 10.1038/nature18268
101. Bakhoum SF, Ngo B, Laughney AM, Cavallo JA, Murphy CJ, Ly P, et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* (2018) 553:467–72. doi: 10.1038/nature25432
102. Sen T, Rodriguez BL, Chen L, Corte CMD, Morikawa N, Fujimoto J, et al. Targeting DNA Damage Response Promotes Antitumor Immunity through STING-Mediated T-cell Activation in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov* (2019) 9:646–61. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1020
103. Dillon MT, Bergerhoff KF, Pedersen M, Whittock H, Crespo-Rodriguez E, Patin EC, et al. ATR Inhibition Potentiates the Radiation-induced Inflammatory Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res* (2019) 25:3392–403. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1821
104. Schoonen PM, Kok YP, Wierenga E, Bakker B, Foijer F, Spierings DCJ, et al. Premature mitotic entry induced by ATR inhibition potentiates olaparib inhibition-mediated genomic instability, inflammatory signaling, and cytotoxicity in BRCA2-deficient cancer cells. *Mol Oncol* (2019) 13:2422–40. doi: 10.1002/1878-0261.12573
105. Kim C, Wang XD, Yu Y. PARP1 inhibitors trigger innate immunity via PARP1 trapping-induced DNA damage response. *Elife* (2020) 9. doi: 10.7554/eLife.60637
106. Xia T, Konno H, Ahn J, Barber GN. Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis. *Cell Rep* (2016) 14:282–97. doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.029
107. Song S, Peng P, Tang Z, Zhao J, Wu W, Li H, et al. Decreased expression of STING predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. *Sci Rep* (2017) 7:39858. doi: 10.1038/srep39858
108. Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* (2016) 16:131–44. doi: 10.1038/nrc.2016.14
109. Xia L, Tan S, Zhou Y, Lin J, Wang H, Oyang L, et al. Role of the NFkappaB-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther* (2018) 11:2063–73. doi: 10.2147/OTT.S161109
110. Chonov DC, Ignatova MMK, Ananiev JR, Gulubova MV. IL-6 Activities in the Tumour Microenvironment. Part 1. *Open Access Maced J Med Sci* (2019) 7:2391–8. doi: 10.3889/oamjms.2019.589
111. Aglipay JA, Lee SW, Okada S, Fujiuchi N, Ohtsuka T, Kwak JC, et al. A member of the Pyrin family, IFI16, is a novel BRCA1-associated protein involved in the p53-mediated apoptosis pathway. *Oncogene* (2003) 22:8931–8. doi: 10.1038/sj.onc.1207057
112. Tawara H, Fujiuchi N, Sironi J, Martin S, Aglipay J, Ouchi M, et al. Loss of p53-regulatory protein IFI16 induces NBS1 leading to activation of p53-mediated checkpoint by phosphorylation of p53 SER37. *Front Biosci* (2008) 13:240–8. doi: 10.2741/2674
113. Fujiuchi N, Aglipay JA, Ohtsuka T, Maehara N, Sahin F, Su GH, et al. Requirement of IFI16 for the maximal activation of p53 induced by ionizing radiation. *J Biol Chem* (2004) 279:20339–44. doi: 10.1074/jbc.M400344200
114. Crowl JT, Gray EE, Pestal K, Volkman HE, Stetson DB. Intracellular Nucleic Acid Detection in Autoimmunity. *Annu Rev Immunol* (2017) 35:313–36. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052331
115. Li XD, Wu J, Gao D, Wang H, Sun L, Chen ZJ. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* (2013) 341:1390–4. doi: 10.1126/science.1244040
116. de Oliveira Mann CC, Orzalli MH, King DS, Kagan JC, Lee ASY, Kranzusch PJ. Modular Architecture of the STING C-Terminal Tail Allows Interferon and NF-kappaB Signaling Adaptation. *Cell Rep* (2019) 27:1165–1175 e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.098
117. Vila IK, Fretaud M, Vlachakis D, Laguette N, Langevin C. Animal Models for the Study of Nucleic Acid Immunity: Novel Tools and New Perspectives. *J Mol Biol* (2020) 432:5529–43. doi: 10.1016/j.jmb.2020.08.016
118. Murira A, Lamarre A. Type-I Interferon Responses: From Friend to Foe in the Battle against Chronic Viral Infection. *Front Immunol* (2016) 7:609. doi: 10.3389/fimmu.2016.00609
119. Schwartz DM, Kanno Y, Villarino A, Ward M, Gadina M, O'Shea JJ. JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* (2017) 17:78. doi: 10.1038/nrd.2017.267
120. Motwani M, Pesiridis S, Fitzgerald KA. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. *Nat Rev Genet* (2019) 20:657–74. doi: 10.1038/s41576-019-0151-1

Conflict of Interest: JM was employed by Azelead.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Taffoni, Steer, Marines, Chamma, Vila and Laguette. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 2

Contribution au sein de l'article « *Sting orchestrates the crosstalk between polyunsaturated fatty acids metabolism and inflammatory response* »

bioRxiv – Janvier 2021

Accepté (Cell Metabolism)

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2020.12.22.423950; this version posted January 29, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Title:

Sting orchestrates the crosstalk between polyunsaturated fatty acids metabolism and inflammatory responses

Authors:

Isabelle K. Vila[1*], Hanane Chamma[1], Alizée Steer[1], Clara Taffoni[1], Line S. Reinert[2], Evgenia Turtoi[3,4], Mathilde Saccas[1], Johanna Marines[1,5], Lei Jin[6], Xavier Bonnefont[7], Soren R. Paludan[2], Dimitrios Vlachakis[8,9,10], Andrei Turtoi[3,4], Nadine Laguette[1*]

Affiliations:

[1] Institut de Génétique Humaine, CNRS, Université de Montpellier, Molecular Basis of Inflammation Laboratory, Montpellier, France

[2] Department of Biomedicine, University of Aarhus, Aarhus, Denmark

[3] Tumor Microenvironment Laboratory, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Université de Montpellier, INSERM U1194, 34000 Montpellier, France

[4] Platform for Translational Oncometabolomics, Biocampus, CNRS, INSERM, Université de Montpellier, Montpellier, France.

[5] Azelead, 377 rue du Pr. Blayac, 34080 Montpellier

[6] Center for Immunology and Microbial Disease, Albany Medical College, Albany, NY 12208

[7] Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF), University Montpellier, CNRS, INSERM, 34094 Montpellier, France

[8] Laboratory of Genetics, Department of Biotechnology, School of Applied Biology and Biotechnology, Agricultural University of Athens, 75 Iera Odos, 11855 Athens, Greece

[9] Division of Endocrinology and Metabolism, Center of Clinical, Experimental Surgery and Translational Research, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 11527 Athens, Greece

[10] University Research Institute of Maternal and Child Health & Precision Medicine, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, 11527 Athens, Greece

* To whom correspondence should be addressed

Corresponding authors: Nadine Laguette (nadine.laguette@igh.cnrs.fr) and Isabelle K. Vila (Isabelle.vila@igh.cnrs.fr)

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2020.12.22.423950; this version posted January 29, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Summary:

Inflammatory disorders are major health issues in which immune function and metabolic homeostasis are concertedly altered. Yet, the molecular mechanisms coordinating innate and metabolic pathways in homeostatic conditions are poorly understood. Here, we unveil a negative regulatory feedback loop involving the Stimulator of interferon genes (Sting) and the Fatty acid desaturase 2 (Fads2). At steady state, Sting regulates FA metabolism by repressing the activity of the Fads2 enzyme responsible for the desaturation of polyunsaturated FAs (PUFAs). Importantly, Sting activation increased Fads2 activity, while antagonizing Fads2 enhanced Sting activation, promoting the establishment of an anti-viral state. Remarkably, the cross-regulation between Sting and Fads2 is mediated by the cyclic GMP-AMP (cGAMP) Sting agonist and PUFAs. Indeed, we found that PUFAs inhibit Sting activation, while Sting agonists bind Fads2. Thus, our study identifies Sting as a master regulator of FA metabolism, and PUFAs as modulators of Sting-dependent inflammation. The interplay between Fads2 and Sting determines the fine-tuning of inflammatory responses, but comes at the expense of metabolic alterations, which are critical to consider in human pathologies associated with aberrant Sting activation.

Introduction:

The endoplasmic-reticulum (ER)-resident Stimulator of interferon genes (Sting) adaptor protein is central to the mounting of inflammatory responses in the presence of pathological nucleic acids, including dsDNA (Ishikawa et al., 2009). Indeed, aberrant dsDNA accumulation under stress conditions (Bai et al., 2017; King et al., 2017) or following pathogen infections (Gao et al., 2013a) can be detected by the cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase (cGAS) (Sun et al., 2013), that catalyzes the production of cGAMP (Ablasser et al., 2013; Gao et al., 2013b). This second messenger interacts with Sting (Zhang et al., 2013), promoting its activation through the recruitment of the Tank binding kinase 1 (Tbk1), resulting in phosphorylation-dependent activation of transcription factors, such as the Interferon regulatory factor 3 (Irf3) (Liu et al., 2015). This signaling pathway triggers the production of inflammatory cytokines and type I Interferons (IFNs) (Ishikawa et al., 2009). Dysregulations of Sting-associated signaling have been reported in a vast array of human pathologies. Yet, Sting function in absence of inflammatory challenge is unknown.

Results:

Absence of STING Leads to Metabolic Improvements *In Vivo*

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2020.12.22.423950; this version posted January 29, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

Because homeostasis requires tight regulation of metabolic and immune pathways (Brestoff and Artis, 2015; Buck et al., 2017), we questioned the impact of Sting ablation on metabolic parameters, at steady-state. Under normal diet, wild-type (WT) and Sting$^{-/-}$ mice do not exhibit spontaneous inflammation (Figure 1A), nor differences in body weight (Figure 1B) and composition (Figure 1C). Yet, Sting$^{-/-}$ mice present increased food intake (Figure 1D) and improved insulin-independent (Figure 1E and S1A) glucose management (Figure 1F), coupled to decreased hepatic gluconeogenesis (Figure 1G). Indirect calorimetry measurements showed that Sting$^{-/-}$ mice consume more oxygen (Figure 1H) and present higher energy expenditure during the light phase (Figure 1I), in absence of change in circadian rhythm (Figure S1B) or spontaneous locomotor activity (Figure 1J). In addition, Sting$^{-/-}$ mice, display increased thermogenesis (Figure 1K). Intriguingly, no significant change was measured in the expression of thermogenic program genes in the brown adipose tissue (Figure S1C), while *Uncoupling Protein 1* (*Ucp1*) and *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha* (*Pgc-1α*) mRNA levels were increased in the visceral white adipose tissue (Figure 1L), reflecting the activation of browning pathways (Seale et al., 2007). Furthermore, the survival of Sting$^{-/-}$ mice is increased as compared to WT mice under high fat diet (Figure 1M). Finally, metabolic phenotyping of cGAS-deficient mice and of conditional myeloid cell-specific Sting$^{-/-}$ mice (Figure S1D-I) confirmed that metabolic alterations witnessed in Sting-deficient mice is independent of its canonical innate immune function. Therefore, absence of Sting is sufficient to cause global metabolic improvements *in vivo*.

Sting interacts with and inhibits the Fatty Acid Desaturase 2

To identify the molecular mechanism through which Sting regulates metabolic homeostasis, we performed tandem-affinity purification of Flag- and HA-tagged Sting (F/HA-Sting) stably expressed in mouse embryonic fibroblasts (MEF) knockout of Sting (MEF$^{Sting-/-}$). Immunopurified material was either silver-stained (Figure 2A) or analyzed by Mass spectrometry to identify Sting protein partners. Besides known Sting interactors, this approach revealed a large number of proteins involved in metabolic pathways (Table S1), notably including the RE-resident Fatty acid desaturase 2 (Fads2). Fads2 is the first, rate-limiting enzyme in the desaturation of linoleic acid [LA (18:2n-6, or Omega-6)] and α-linolenic acid [ALA (18:3n-3, Omega-3)] precursors (Nakamura and Nara, 2004), to generate polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Figure 2B). Precisely, Fads2 catalyses the desaturation of ALA into eicosapentaenoic acid (EPA), and subsequently into docosahexaenoic acid (DHA). Desaturation of LA into Dihomo-γ-linolenic acid (DGLA) also requires Fads2 (Nakamura and Nara, 2004), while further desaturation into arachidonic acid (AA) is catalysed by the Fatty acid

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2020.12.22.423950; this version posted January 29, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

desaturate 1 (Fads1) (Leonard et al., 2000). Dedicated enzymes further process these PUFAs into Oxylipins that influence numerous physiological processes (Gabbs et al., 2015). The interaction between Fads2 and Sting was verified by Western blot (WB) analysis of Flag-immunoprecipitated F/HA-Sting (Figure 2C). Conversely, Flag-immunoprecipitation of Flag-tagged Fads2 (F-Fads2) allowed co-immunoprecipitation of Sting, but not of Tbk1 (Figure 2D). Thus, we show that Fads2 is a protein partner of Sting, independently of Tbk1 and of pro-inflammatory stimulation.

Because PUFAs are ligands of transcription factors that control thermogenesis (Fan et al., 2019), changes in PUFAs levels could be expected to promote the metabolic alterations observed in the absence of Sting (Figure 1). We used liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) to quantify PUFAs and their derivatives in liver and adipose tissue (AT) samples from WT and Sting$^{-/-}$ mice. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) of LC-MS data showed that WT and Sting$^{-/-}$ liver and AT samples are significantly different (Figure S2A-B). Correlation analysis showed a shift in PUFA content, leading to accumulation of Omega-3 derivatives (Figure S2C-D). Although no significant shift in the total Omega-6/Omega-3 ratio was measured (Figure 2E), the total amount of derivatives from the main PUFAs families in mice liver samples showed that absence of Sting leads to significantly increased levels of DGLA and DHA derivatives (Figure 2F), coupled to increased Fads2 activity in Sting$^{-/-}$ mice (Figure 2G). Similar increase in PUFAs deriving from Fads2 activity was measured in MEF$^{Sting-/-}$ as compared to WT-MEFs, but not in MEF$^{cGAS-/-}$ (Figure S2E-F). Importantly, mRNA levels of the *Pgc-1α* and *PR domain containing 16* (*Prdm16*) transcription factors involved in browning (Seale et al., 2007), were upregulation in Sting$^{-/-}$, but not in cGAS$^{-/-}$ MEFs (Figure 2H). This strongly supports that changes in PUFAs pools drive activation of thermogenesis program in absence of Sting.

Sting Activation Promotes Fads2 activity

Because Sting activation leads to its degradation (Konno et al., 2013), we hypothesized that following Sting activation, the block of Fads2 activity would be alleviated. We used dsDNA transfection to activate Sting-dependent signalling (Figure 3A) and Sting degradation (Figure 3B), prior to analysis of PUFAs. We observed an increase in PUFAs deriving from Fads2 activity, including DHA (Figure 3C), accompanied by increased expression of *Pgc-1α* and *Prdm16* (Figure S3A), without significant shift in the Omega-6/Omega-3 balance (Figure 3D). Intriguingly, we also observed decreased Fads2 levels following Sting activation (Figure 3A), independently of type I IFN production (Figure S3B-C). This is in agreement with previous reports that Fads2 levels are decreased following its over-activation (Ralston et al., 2015). Of

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2020.12.22.423950; this version posted January 29, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

note, decreased Fads2 levels were also observed following infection with the Herpes Simplex Virus type I (HSV-1) DNA virus known to promote Sting activation (Figure S3D-F). Thus, acute activation-dependent decrease of Sting levels promotes Fads2 activity and metabolic reprogramming.

To assess the impact of chronic Sting activation on Fads2 activity, we used MEF knockout of the Three prime exonuclease 1 ($MEF^{Trex1-/-}$) that present with spontaneous chronic Sting activation (Ablasser et al., 2014) (Figure 3E). Absence of Trex1 correlates with decreased Fads2 protein levels, in absence of change in Sting protein levels (Figure 3F). Analysis of PUFAs and derivatives in WT and $Trex1^{-/-}$ MEFs showed increased DGLA and DHA levels, indicating increased Fads2 activity (Figure 3G). However, we also measured increased levels of AA in absence of Trex1 (Figure 3G), together with an increased Omega-6/Omega-3 ratio (Figure 3H). While this supports our model whereby Sting activation promotes increased Fads2 activity, this also indicates that Sting degradation is not the sole parameter modulating Fads2 activity upon chronic Sting activation.

cGAMP and PUFAs Orchestrate the Crosstalk Between Fads2 and Sting

Because Sting activation requires its interaction with dinucleotides, we hypothesized that the latter may participate to the control of Fads2 activation. We first tested this hypothesis *in silico* by docking cGAMP and the 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) Sting agonist into Fads2. To this aim, we used the resolved crystal of Sting in complex with cGAMP (PDB ID: 6WD4) and the molecular model of Fads2 as starting biological systems. This predicted that cGAMP and DMXAA can dock into Fads2, adopting similar conformation (Figure 4A, left and right panels), achieving analogous interactions and docking energies (Figure S4A and Table S2). We confirmed the interaction between cGAMP and Fads2 using *in vitro* binding assays (Figure 4B). In addition, we treated $cGas^{-/-}$, $Sting^{-/-}$, and WT-MEF with DMXAA, or performed dsDNA transfection to induce cGAMP production, prior to analysis of Fads2 protein levels. This showed that Fads2 levels are decreased in presence of DMXAA, regardless of the expression of cGas and Sting (Figure 4C), while dsDNA transfection-induced Fads2 degradation was reduced in the absence of cGas (Figure S4B). Thus, altogether these data show that Fads2 is a target of dinucleotides targeting Sting.

Intriguingly, molecular docking analysis between PUFAs and Sting, predict that PUFAs can dock to the cGAMP-binding domain of Sting (Figure 4A, right panels). Indeed, cGAMP, DMXAA and PUFAs, adopt similar conformations in *in silico* docking experiments performed with Sting or Fads2 (Figure S4A), achieving analogous binding energies (Table S2). Furthermore, Sting and Fads2 showed strong structural similarity, both with regards to the 3D

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2020.12.22.423950; this version posted January 29, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

arrangement of the docking site anatomy, and in terms of hydrophobicity, electrostatics and solvent accessibility (Figure S4A). This suggested that PUFAs are potential ligands of Sting. We thus tested the impact of administrating ALA and LA precursors to cells prior to assessment of DMXAA-induced Sting activation. Both treatments decreased DMXAA-dependent expression of *Ifnβ* and of the *Cxcl10* interferon stimulated gene (ISG) (Figure 4D). Consistently, knock-down of Fads2, which caused a global decrease of Fads2 by-products (Figure S4C), led to increased *Ifnβ* and *Cxcl10* expression (Figure 4E-F), together with decreased expression of thermogenesis program genes (Figure S4D). Finally, antagonizing Fads2, using shRNAs or an inhibitor, led to decreased infection by HSV-1 (Figure 4G), consistent with the establishment of an antiviral state. Thus, we establish that PUFAs as inhibitors of Sting. Altogether, we show that Fads2 and Sting cooperate for the maintenance of global homeostasis, through fine-tuning of inflammatory and metabolic pathways (Figure 4H).

Discussion:

Altogether, we uncover a central role of Sting in the regulation of metabolic homeostasis, independently of its reported innate immune function. Indeed, we show that Sting inhibits Fads2 activity, thereby altering PUFAs pools. Absence of Sting thus increases the levels of Omega-3-derived PUFAs that in turn improve glucose handling (Sirtori and Galli, 2002), prevent obesity-associated glucose intolerance (Belchior et al., 2015; Derosa et al., 2016) and increase cardiovascular protection (Gonzalez-Periz et al., 2009). In agreement, we found that absence of Sting leads to better survival of mice under high fat diet. Furthermore, Omega-3-derived PUFAs can promote white adipose tissue browning (Fernández-Galilea et al., 2020), a process in which increased *Ucp1*, *Pgc-1α* and *Prdm16* expression is crucial (Ghandour et al., 2018). We found that absence of Sting promotes Fads2-dependent induction of these thermogenic factors, demonstrating that metabolic remodelling in absence of Sting requires Fads2. In addition, we show that Sting agonists, can directly interact with Fads2 and promote its degradation, establishing Fads2 as a direct target of cGAMP and DMXAA. This implies that in pathologies presenting with chronic Sting activation, Sting-dependent modulation of Fads2 activity may feed metabolic comorbidities such as dyslipidemia (Lira et al., 2014) or cachexia (Baazim et al., 2019). Furthermore, small molecules targeting Sting (Haag et al., 2018; Wu et al., 2020) can be expected to alter Fads2 activity and downstream production of inflammatory lipid mediators.

That PUFAs can inhibit Sting, reveals a previously unappreciated link between fatty acid metabolism and innate immune responses. Indeed, there are indications that diet

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2020.12.22.423950; this version posted January 29, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

intervention and modulation of Omega-3 or Omega-6 intake can impact immune and antiviral responses (DiNicolantonio and O'Keefe, 2018), although the involved molecular mechanism remaining poorly understood. We reveal that Fads2 activity and PUFAs can inhibit Sting activation. While his process may serve in the resolution of Sting-dependent inflammation, dietary habits that impact the substrates provided to Fads2 for desaturation (Galland, 2010; Tosi et al., 2014) may directly influence Sting activation and alter immune function (Sen et al., 2019). In addition, we show that modulating Fads2 activity impacts on the establishment of an antiviral state. This is in agreement with previous reports that PUFAs levels can both influence (Berra et al., 2017) and be influenced by HSV-1 infection (Zhang et al., 2020). Thus, we reveal a novel mechanism through which PUFAs contribute to the fine-tuning of inflammatory responses and identify Sting as a trigger of thermogenic program. Altogether, our findings offer unprecedented insight into the crosstalk between innate immune processes and metabolic regulation. Targeting this crosstalk in pathologies presenting with chronic inflammation, bears the promise to alleviate associated comorbidities.

Acknowledgements: We thank M Benkirane, G Cavalli, J Déjardin and B de Massy for discussions and comments. We acknowledge: the SIRIC Montpellier Cancer Grant (INCa_Inserm_DGOS_12553), Metamus-RAM and iExplore-RAM animal facilities, the "Laboratoire de Mesures Physiques" of the University of Montpellier, for access to the Mass Spectrometry instruments, the MRI imaging facility, member of the national infrastructure France-BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, "Investments for the future") and Ross Tomaino from the "Taplin Mass Spectrometry Facility" of the Harvard Medical School, for Mass Spectrometry analysis. Work in NL's laboratory is supported by the European Research Council (ERC-Stg CrIC: 637763, ERC-PoC DIM-CrIC: 893772), "LA LIGUE pour la recherche contre le cancer" and the "Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites virales" (ANRS). HC is supported by a PhD fellowhip from" LA LIGUE pour la recherche contre le cancer". CT was supported by Merck Sharp and Dohme Avenir (MSD-Avenir – GnoSTic) program, followed by an ANRS fellowship. JM is supported by a "Conventions Industrielles de Formation par la Recherche" (CIFRE) fellowship from the "Agence Nationale de Recherche Technologie" (ANRT). AS is supported by the ERC-PoC DIM-CrIC (893772). IKV was supported by the ERC-Stg CrIC (637763) followed by the Fondation pour la Recherche Médicale (ARF20170938586). Work in SRP's laboratory is supported by the European Research Council (ERC-AdG ENVISION; 786602), The Novo Nordisk Foundation (NNF18OC0030274), and the Lundbeck Foundation

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2020.12.22.423950; this version posted January 29, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

(R198-2015-171; R268-2016-3927). Work in AT's laboratory is supported by a SIRIC Montpellier Cancer Grant INCa_Inserm_DGOS_12553, the Foundation de France (grant no. 00078461) and a LabEx MabImprove Starting Grant. XB is supported by ANR GH-gen (ANR-18-CE14-0017).

Author contributions. IKV and NL conceived the study and designed experiments. IKV, HC, AS, CT, LSR, ET, MS, JM, XB, DV, AT performed experiments. IKV, SRP, DV, AT and NL supervised the study. JL provided mice and mice tissues samples. IKV, DV, AT and NL analyzed data and prepared figures. IKV, DV, AT and NL wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests. The authors declare no competing interest.

Materials & Correspondence. All raw data and materials generated in the course of the present work are available upon request.

Figure & Figure Legends:

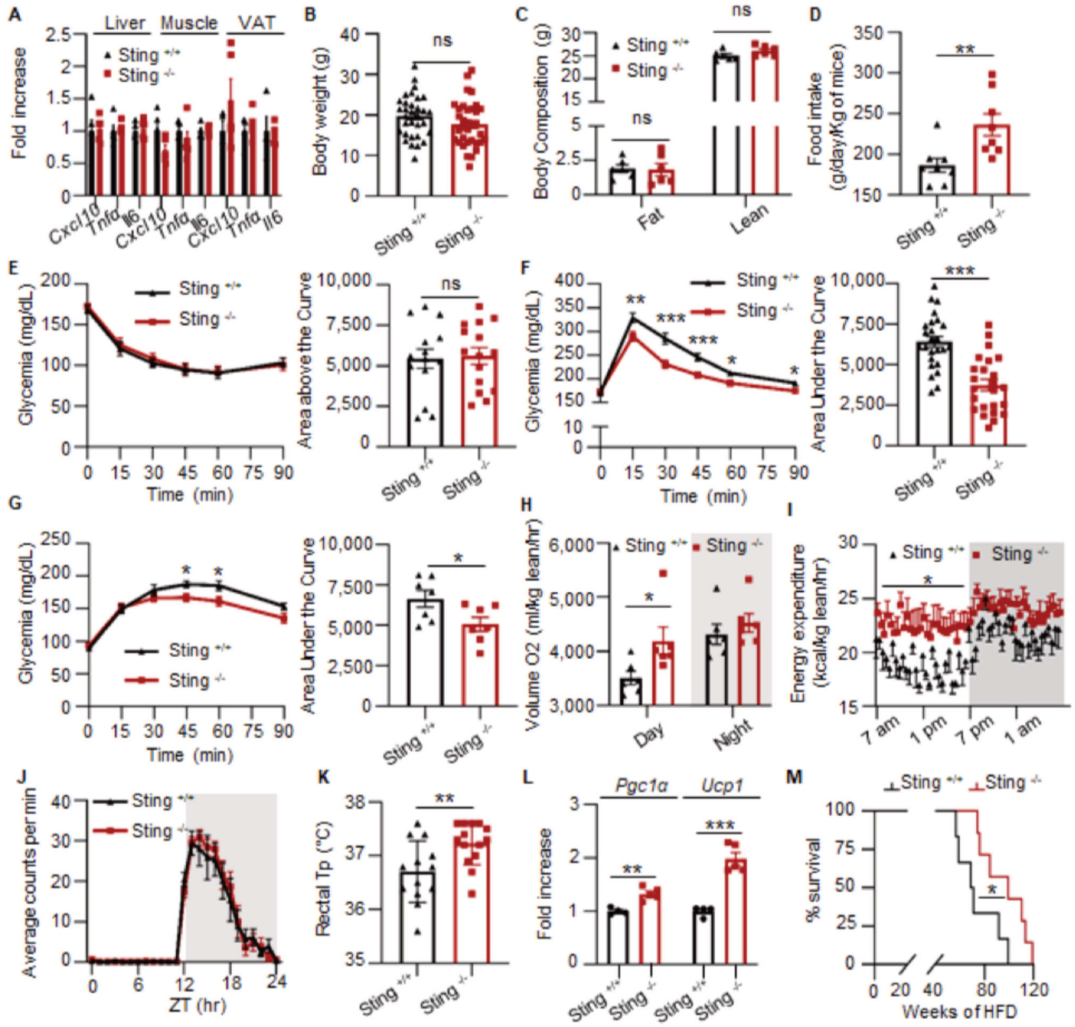


Figure 1: Sting Deficiency Leads to Global Metabolic Improvement.

(A) *Cxcl10*, *Tnf-α* and *Il6* mRNA levels were measured in liver, muscle and visceral fat from Sting$^{+/+}$ (n=5) and Sting$^{-/-}$ (n=5) mice.

(B) Body weight of Sting$^{+/+}$ (n=32) and Sting$^{-/-}$ (n=34) mice under normal diet.

(C) Body composition of Sting$^{+/+}$ (n=6) and Sting$^{-/-}$ (n=6) mice was assessed by EchoMRI.

(D) Food intake of Sting$^{+/+}$ (n=8) and Sting$^{-/-}$ (n=9) mice.

(E) Insulin tolerance test (ITT) in Sting$^{+/+}$ (n=14) and Sting$^{-/-}$ (n=15) mice. Left panel: Glycemia (mg/dL) over time, following a bolus of Insulin. Right panel, area above the curve.

(F) Glucose tolerance test (GTT) was performed in Sting$^{+/+}$ (n=25) and Sting$^{-/-}$ (n=24) mice. Left panel: Glycemia (mg/dL) over time, following a bolus of Glucose. Right panel, area under the curve (AUC).

(G) Pyruvate tolerance test (PTT) was performed in Sting$^{+/+}$ (n=7) and Sting$^{-/-}$ (n=7) mice. Left panel: Glycemia (mg/dL) over time, following a bolus of Pyruvate. Right panel: AUC.

(H) Oxygen consumption of Sting$^{+/+}$ (n=6) and Sting$^{-/-}$ (n=6) mice as determined in metabolic chambers.

(I) Energy expenditure during day (white) and night (grey) was determined as in (H). P-value was determined by One-way Anova.

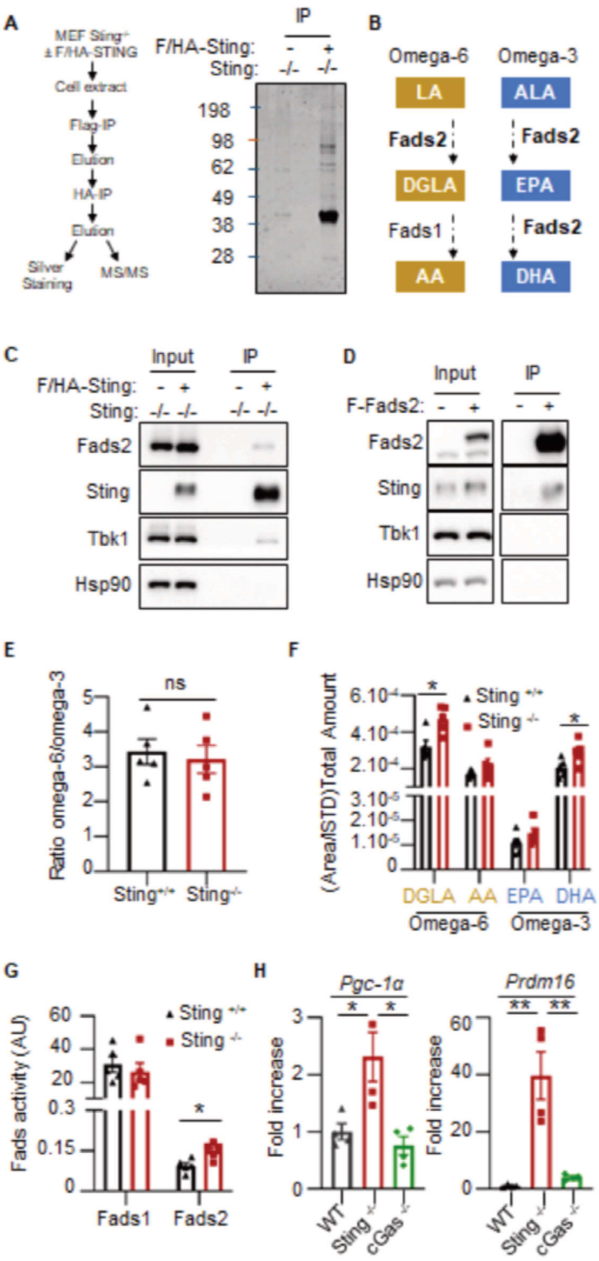
(J) Daily profile of voluntary running-wheel activity of Sting$^{+/+}$ (n=11) and Sting$^{-/-}$ (n=10) mice.

(K) Rectal temperature of Sting$^{+/+}$ (n=13) and Sting$^{-/-}$ (n=14) mice.

(L) *Pgc1α* and *Ucp1* mRNA levels in the white adipose tissue from Sting$^{+/+}$ (n=4) and Sting$^{-/-}$ (n=5) mice.

(M) Survival curve of Sting$^{+/+}$ (n=6) and Sting$^{-/-}$ (n=7) mice under high fat diet (HFD 60%)

All graphs present means ± Standard Error of the Mean (SEM). P-value was determined by Student's t-test, unless otherwise stated. ns: not significant, *: $P < 0.05$, **P: < 0.01, ***P: < 0.001.



281

282 **Figure 2: Sting Interacts with Fads2 and Modulates Polyunsaturated Fatty Acids Pools.**
283 (A) Left: Experimental scheme. Right: silver-staining of immunopurified Flag- and HA-tagged
284 Sting (F/HA-Sting) separated on SDS-PAGE. Numbers on the left: molecular weight in kDa.
285 (B) Schematic representation of the LA (Omega-6, Yellow) and ALA (Omega-3, Blue) fatty
286 acids (FA) desaturation pathway, leading to the generation of polyunsaturated FA (PUFAs).
287 ALA: α-linolenic acid, LA: linoleic acid, DGLA: Dihomo-γ -linolenic acid, AA: arachidonic
288 acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid

289 (C) Inputs and eluates from Flag-immunoprecipitated F/HA-Sting were analyzed by Western
290 Blot (WB) using indicated antibodies.
291 (D) Inputs and eluates from Flag-immunoprecipitated Flag-Fads2 were analyzed by WB using
292 indicated antibodies.
293 (E) Ratio between total Omega-6 and Omega-3 PUFAs and derivatives measured in $Sting^{+/+}$
294 (n=5) and $Sting^{-/-}$ (n=5) mice liver using LC-MS.
295 (F) Sum of indicated PUFA and respective derivatives in samples analysed as in (E).
296 (G) Fads1 and 2 enzyme activity was estimated by calculating the substrate/product ratio of
297 PUFAs measured in (E).
298 All graphs present means ± SEM. P-value was determined by Student's t-test. ns: not
299 significant, *: $P < 0.05$.
300

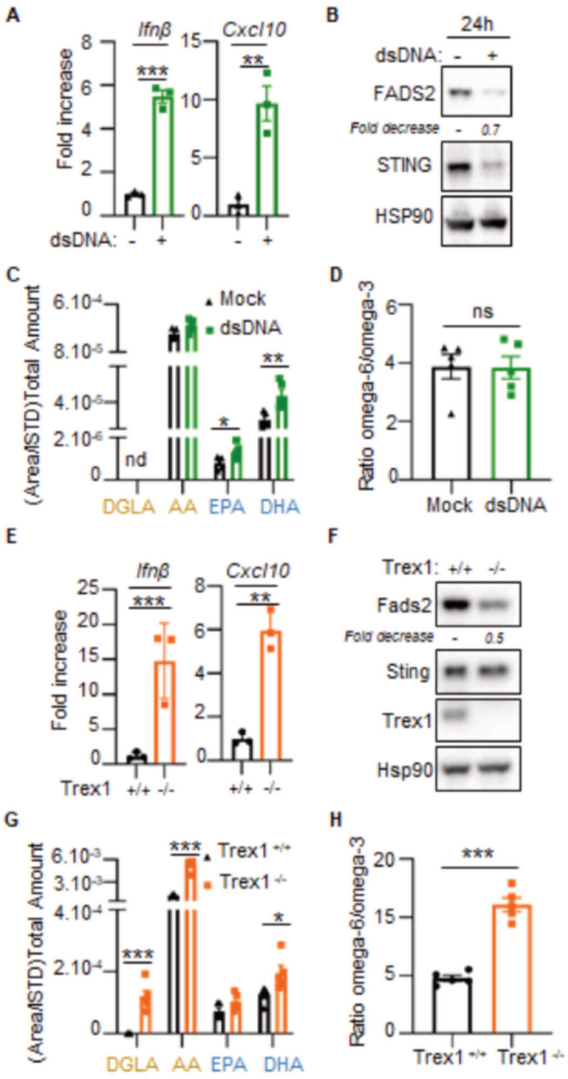


Figure 3: Activation-dependent Sting Degradation Promotes Fads2 Activity.

(A) *Ifnβ* and *Cxcl10* mRNA levels in 293T cells transfected or not with dsDNA for 24h (n=3)

(B) Whole cell extracts (WCE) of cells treated as in (A) were analyzed by WB using indicated antibodies.

(C) Sum of indicated PUFA and derivatives in samples prepared as in (A).

(D) Ratio between total Omega-6 and Omega-3 PUFAs and derivatives in samples from (C).

(E) *Ifnβ* and *Cxcl10* mRNA levels in WT-MEF (n=3) and MEF$^{Trex1-/-}$ (n=3).

(F) WCE from WT-MEF or MEF$^{Trex1-/-}$ were analyzed by WB using indicated antibodies.

(G) Sum of indicated PUFAs and derivatives in WT-MEF or MEF$^{Trex1-/-}$ (n=5).

(H) Ratio between total Omega-6 and Omega-3 PUFAs and derivatives in samples from (G).

All graphs present means ± SEM. P-value was determined by Student's t-test. *: $P < 0.05$, **P: < 0.01, ***P: < 0.001.

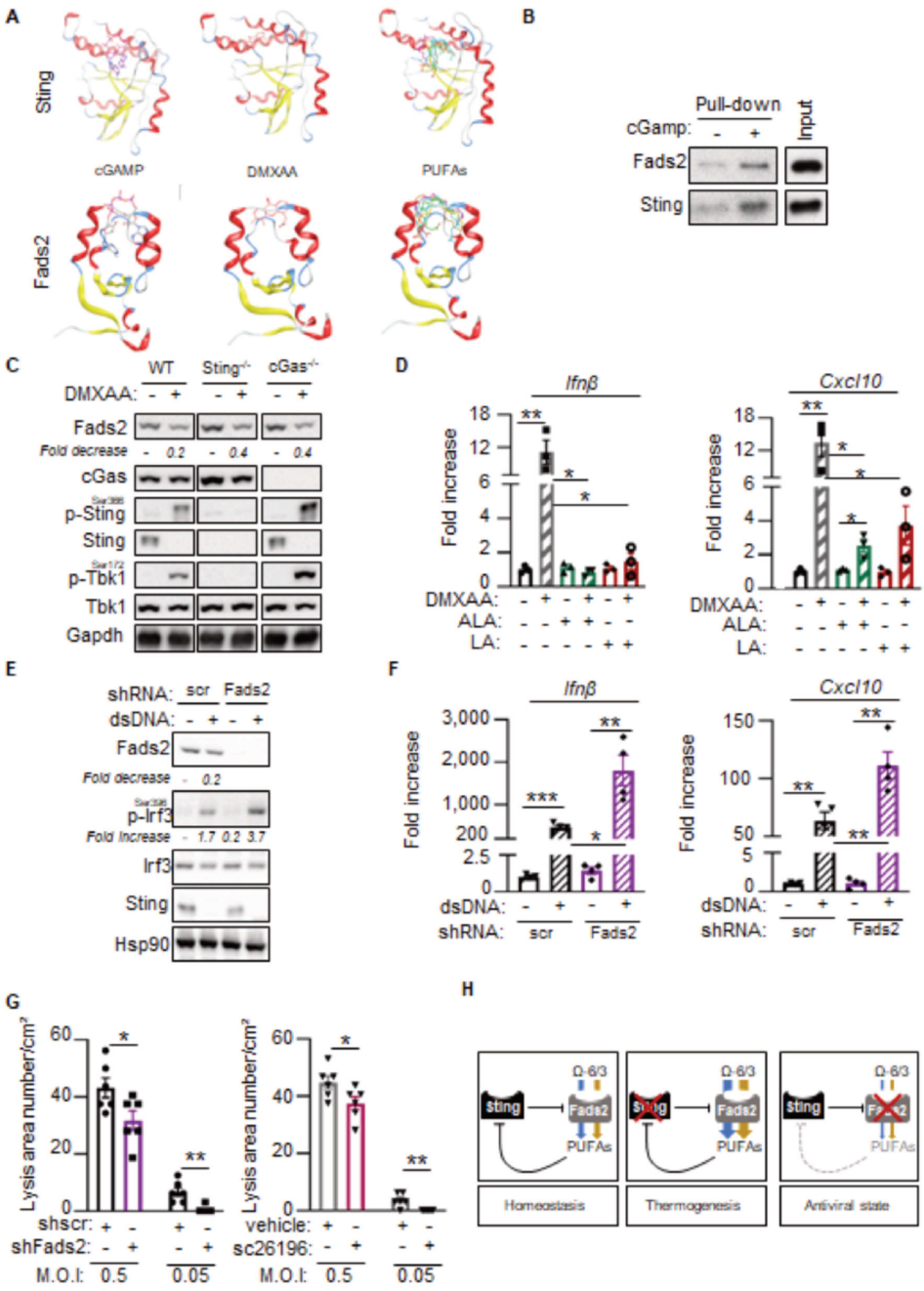


Figure 4: cGAMP and PUFAs Orchestrate the Crosstalk between Fads2 and Sting.

(A) Molecular docking of cGAMP, DMXAA, and 6 PUFAs to STING (top) or FADS2 (bottom). Color coding for ligand: LA in blue, ALA in green, AA in orange, DHA in turquoise, DGLA in brown, and EPA in magenta.

(B) Binding of Flag-purified F-Fads2 or F/HA-Sting to cGAMP was analysed by WB using anti-Sting or anti-Fads2 antibodies.

(C) WCE from WT, Sting$^{-/-}$, or cGas$^{-/-}$ MEF stimulated or not with DMXAA for 2 h were analyzed by WB using indicated antibodies.

(D) *Ifnβ* and *Cxcl10* mRNA levels in WT-MEF stimulated or not with DMXAA in combination or not with ALA or LA (n=3).

(E) WCE from MEF expressing non-targeting (shScr) or Fads2-targetting (shFads2) shRNAs, transfected or not with dsDNA for 6 h, were analyzed by WB using indicated antibodies.

(F) *Ifnβ* and *Cxcl10* mRNA levels in cells expressing Scramble (scr) or Fads2-targeting shRNAs after stimulation or not with dsDNA for 6 h (n=4).

(G) WT-MEF were infected with HSV-KOS64 in presence or not of a Fads2 inhibitor (sc26196). Infection is presented as mean lysis area per cm^2.

(H) Schematic representation of the crosstalk between Sting and Fads2.

All graphs are means ± SEM from at least 3 independent experiments. P-value was determined by Student's t-test.*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$

335 **STAR Methods:**

336 *Animals.* Animal protocols were performed in accordance with French and European Animal
337 Care Facility guidelines. All experiments were approved by the Animal Welfare and Ethical
338 Review Body of Languedoc-Roussillon. Housing and experimental procedures were approved
339 by the French Agriculture and Forestry Ministry (A34-172-13 & 15040-2018050214043878).
340 Males from 8 to 14 weeks of age were used for this study. Mice Sting deficient
341 (Tmem173<tm1Camb>) were provided by Pr. Lei Jin (Jin et al., 2013). cGAS deficient mice
342 line was purchased from the EMMA consortium (Strasbourg, France). Tmem173<tm1Camb>
343 mice (conditional ready) were crossed with mice expressing FLP recombinase to obtain Sting
344 floxed mice. Specific Tmem173 knock out was obtained by crossing homozygous
345 Tmem173fl/fl mice with transgenic LysM-Cre mice (gift from Michael Hahne, IGMM,
346 Montpellier) expressing the Cre recombinase under the control of a myeloid gene promoter.

347 *Mouse studies.* Body weight was measured at 8 weeks of age. Body composition (Fat and lean
348 mass) was evaluated by quantitative nuclear magnetic resonance imaging (EchoMRI 3-in-1
349 system; Echo Medical Systems, Houston, Texas) before metabolic chambers experiments.
350 Metabolic rates in mice were measured by indirect calorimetry using a Comprehensive Lab
351 Animal Monitoring System (CLAMS, Columbus Instruments) as previously described (Vila et
352 al., 2019). Mice were housed individually in metabolic chambers with free access to water and
353 food for 2 days for acclimatization before animals were returned to metabolic chambers and
354 monitored for the next day for oxygen consumption (VO2), carbon dioxide production (VCO2),
355 and food intake. Energy expenditure was calculated using the formula energy expenditure =
356 (3.815 + 1.232 VO2/VCO2) × VO2, and normalized to lean body mass. Body temperature was
357 assessed in mice using a RET-3 rectal probe (Kent Scientific). ITTs and GTTs were performed
358 as previously described (Vila et al., 2014). Briefly, mice were fasted for 6 h with free access to
359 drinking water. For ITTs, insulin was administered intraperitoneally (0.4 mU/g of mice fed
360 normal chow), and blood glucose was measured at various times after injection from the tip of
361 the tail with a Glucometer (Accu-Chek, Roche). For GTTs, d-glucose was administered
362 intraperitoneally (2 g/kg of mice), and blood glucose levels were monitored. At 15 min after
363 glucose injection, blood was collected for insulin quantitation. Serum insulin concentrations
364 were determined by ELISA (Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA, ALPCO Diagnostics). For
365 PTT, mice were fasted for 18 h, followed by intraperitoneal injection of pyruvate (2 g/kg of
366 mice), and blood glucose levels were monitored. To measure spontaneous locomotion and
367 circadian behaviour, mice were housed individually in cages equipped with a running wheel.

Voluntary activity was measured as running wheel revolutions recorded in one-minute bins and analysed with the ClockLab software (Actimetrics). Circadian behaviour was accessed during a period of light/dark cycle and under constant darkness as previously described (Abitbol et al., 2017). HSV-1 brain infections in mice were conducted as previously described (Reinert et al., 2021).

Diets. At the age of 8 weeks mice were fed with HFD (60% energy as fat, Safe Diet).

RNA Extraction and Real-Time PCR. Total RNA from tissues was extracted with Trizol reagent (Invitrogen) and RNA extraction kit (Sigma). RNA was quantified with a Nanodrop spectrophotometer (ND-1000, Nanodrop Technologies). RNA (1-2 µg) was reverse transcribed using SuperScript IV reverse transcriptase (Invitrogen). Expression of specific mRNAs was determined with a LightCycler (Roche) using the SYBR green PCR master mix (Takara). Reactions were performed in duplicate, and relative amounts of cDNA were normalized to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) and/or heat shock protein 90 (Hsp90). RT-qPCR primer sequences are:

Human:
hGapdh: F-CTGGCGTCTTCACCACCATGG; R-CATCACGCCACAGTTTCCCGG;
hIfnβ: F-GAATGGGAGGCTTGAATACTGCCT;
R-TAGCAAAGATGTTCTGGAGCATCTC;

Mouse:
mGapdh: F-TTCACCACCATGGAGAAGGC; R-GGCATCGACTGTGGTCATGA;
mIfnβ: F-CTGCGTTCCTGCTGTGCTTCTCCA; R-TTCTCCGTCATCTCCATAGGGATC;
mCxcl10: F-ATGACGGGCCAGTGAGAATG; R-TCAACACGTGGGCAGGATAG;
mHsp90: F-GTCCGCCGTGTGTTCATCAT; R-GCACTTCTTGACGATGTTCTTGC;
mTnf-α: F-CTGTAGCCCACGTCGTAGC; R-TTGAGATCCATGCCGTTG;
mUcp-1: F-CCTGCCTCTCTCGGAAACAA;R-TGTAGGCTGCCCAATGAACA;
mIl-6: F-GACTTCCATCCAGTTGCCTTCT; R-TCCTCTCCGGACTTGTGAAGTA
mPgc1α: F- AAAGGATGCGCTCTCGTTCA; R- GGAATATGGTGATCGGGAACA
mPrdm16: F-CAGCACGGTGAAGCCATTC; R-GCGTCGATCCGCTTGTG

Western Blot Analysis. Tissues were homogenized using a Fastprep apparatus (MP) in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 10 µl/ml protease inhibitor, 10 µl/ml phosphatase I inhibitor, and 10 µl/ml phosphatase II inhibitor. Cells were lysed in 5 packed cell volume of TENTG-150 [20 mM tris-

HCl (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.5% Triton X-100, 1.5 mM MgCl2, and 10% glycerol, supplemented with 10 mM β-mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF and 1x phosphatase inhibitor] for 30 min at 4°C. Tissue and cell lysates were centrifuged at 14,000 g for 30 min at 4°C, and supernatants were stored at -80°C. Solubilized proteins (20-30 µg) from tissues or cells were run on 10% or 12% SDS-PAGE gels (Invitrogen Novex Tris-glycine) transferred onto nitrocellulose membrane (Biorad Trans blot turbo) and incubated with primary antibodies. Primary antibodies used include: anti-phospho IRF3 (1:500; Cell Signaling 4D4G), anti-IRF3(1:1000; Cell Signaling D6I4C), anti-phospho TBK1 (1:1000; Cell Signaling D52C2), anti-TBK1 (1:1000; Cell Signaling D1B4), anti-STING (1:1000; Cell Signaling D2P2F), anti-phospho STING (1:1000; Cell Signaling D8F4W), anti-glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:5000; Proteintech Europe 800004-1-Ig), anti-TREX-1 (1:250; Santa Cruz Biotechnology C-11 sc133112), mouse specific anti-cGAS (1:1000; Cell Signaling D3080), anti-HSP90 (1:1000; Cell Signaling C45G5), and anti-FADS2 (1:10 000; Invitrogen PA5-87765). All secondary antibodies (Cell Signaling) were used at 1:2000 dilution. Immunoreactive proteins were visualized by chemiluminescence (SuperSignal West Pico or femto Thermo Scientific).

Cells and cell cultures. 293T, T98G, WT-MEF, MEF-Sting$^{-/-}$, MEF-cGas$^{-/-}$ were maintained in DMEM supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin and 1% Glutamine. MEF-Sting$^{-/-}$ overexpressing FLAG- and HA-tagged Sting (F/HA-Sting) were generated by transducing MEF-Sting$^{-/-}$ with retroviral particles packaging the pOZ-F/HA-Sting construct and selection with puromycin. WT-MEF overexpressing FLAG-tagged Fads2 (Flag-Fads2) were generated by transducing WT-MEF with retroviral particles packaging the pOZ-Flag-Fads2 construct and selection with puromycin. The T98G IRF3 and control knockout cell line was generated using LenticrisprV2-GFP system (Plasmid #82416) and cell sorting using a BD FACS Melody. Pooled cells were then amplified and IRF3 invalidation verified by Western Blot analysis.

Cell treatment and transfection. Cells were transfected with JetPrime transfection reagent (Polyplus) at 1:2 ratio with various nucleic acids at 2 µg/ml. DMXAA (Invivogen) was used at 100 or 200 µM in Opti-MEM (Gibco). Sc26196 (Santa Cruz) was used at 2 µM.

HSV-KOS64 amplification. HSV KOS-64-GFP strain was a gift from S. Paludan. The virus was amplified in Vero cells. Briefly, Vero cells were plated in T175 and infected with HSV KOS-64-GFP virus during 30 min. Media was subsequently replaced and cells were collected 72 h after infection for viral extraction using 3 freeze-thaw cycles. Two centrifugations steps were

performed and concentrated virus was resuspended before storage at -80°C. 10^3 cells were seeded in 96-wells plate for lysis area number or 2.10^5 6-wells plate for western blot 16h prior infection. Cells were infected with HSV KOS-64-GFP for 90min on presence or not of Fads2 inhibitor (2µM). Medium was replaced with DMEM/Human serum 2% medium for 16h. For lysis area number assessment, medium was replaced with DMEM/FBS 10% medium for 32h.

Immunoprecipitation and mass spectrometry analysis. MEF-Sting$^{-/-}$ overexpressing F/HA-Sting were lysed in 5 packed cell volume of TENTG-150. The first immunoprecipitation used an anti-FLAG antibody, followed by the elution using an excess of FLAG peptide. Eluates were subsequently used as input material for immunoprecipitation using an anti-HA antibody. Sting protein partners were eluted using an excess of HA peptide. Part of the FLAG and HA immunoprecipitated material was silver-stained and the remainder Coomassie-stained. Portions of the Coomassie-stained gel were excised and analyzed by Mass Spectrometry.

In vitro pull-down using biotinylated cGAMP. Pull-down was carried out using 30 µl (0.3mg) of MyOne Streptavidin C1 Dynabeads per condition. An excess of Biotin or cGAMP was coupled to beads according to the manufacturer's instructions. 30 µl of Flag-immunoprecipitated Fads2 or Sting was incubated with beads, on ice for 30 min in low-binding tubes (Axygen). Three consecutive washes were performed in 20 mM tris-HCl (pH 7.4), 10mM KCl, 0.5% Triton, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1.5 mM MgCl2 and 10 mM β-mercaptoethanol, and 0.5 mM PMSF. Tubes were changed at first and last washes. Bound material was eluted in 30 µl of Laemmli buffer.

RNA interference. shRNA targeting Fads2 (Clone ID: NM_019699.1-487s1c1) and scramble (SHC016) were obtained from Sigma-Aldrich. shRNA-expressing lentiviral particles were produced by co-transfection of 2×10^6 293T cells with 5 µg of shFads2, 5 µg of psPAX2 (Gag-Pol), and 1 µg of pMD2G (Env), using the standard calcium-phosphate transfection protocol. Viral particles were harvested 48 h after transfection, filtered with 0.45 µM filters, and used for transduction. For knockdown of Fads2, 10^6 MEF cells were seeded 24 h before transduction. Medium was replaced 10 h after transduction, and 1.5µg/ml puromycin selection was performed 72 h later.

Measurement of PUFAs and oxilipins in biological samples. Snap-frozen tissues samples or 3×10^6 cells were crushed and solubilized (sonicated) in 1 mL of methanol (Wako, Tokyo, Japan). The samples were then spiked with following 16 internal standards (at 30 µM final concentration): tetranor-PGEM-d6, 6-keto-PGF1a-d4, TXB2-d4, PGF2a-d4, PGE2-d4, PGD2-

d4, LTC4-d5, LTB4-d4, 15-HETE-d8, 12-HETE-d8, 5-HETE-d8, PAF-d4, OEA-d4, EPA-d5, DHA-d5, DHA-d5 and AA-d8 (all from Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). The samples were then sonicated for 10 s, then vortexed for 2 min and further incubated for 2h at 4°C. Next, the samples were centrifugated at 15.000g for 10 min, the supernatant was removed and diluted with 4 mL of 0.1 % formic acid. The mix was briefly vortexed and loaded on the solid phase extraction (SPE) column Strata-X (Phenomenex, Torrance, CA, USA) in 1 ml steps. Before loading the sample, the SPE column was washed with 1 mL methanol and equilibrated with 2 mL of 0.1% formic acid. Following sample loading, the SPE column was washed with 1 mL 0.1% formic acid, 1 mL 15% ethanol and the compounds were eluted in 250 µL methanol. The eluate was lyophilized and then solubilized in 20 µL methanol, of which 5 µL sample were injected on UPLC coupled to triple-quadrupole MS (LCMS-8050). The sample was separated using analytical column Kinetex C8 (Cat. # 00F-4497-AN; Phenomenex), mobile phase A 0.1% formic acid (Sigma Aldrich) in water and mobile phase B acetonitrile (Sigma Aldrich). The flow rate was set at 0.4 mL/min, column oven temperature at 40°C. The gradient was: 0 min 90% A, 5 min 75% A, 10 min 65% A, 20 min 25% A, 20.1 – 25 min 5% A, 25.1 min 90% A. MS setting, data acquisition and data analysis were performed according to manufacturer instructions for analyzing Lipid Mediators version 2.0 (Cat. # 225-24873A, Shimadzu).

LC-MS data analysis. Following visual inspection, integration and calculation of peak surface area for all identified compounds, the data were normalized using the internal standards. As outlined in the Lipid Mediators version 2.0 manual, individual compounds were repartitioned in 17 different groups, which were then normalized with 17 internal standards outlined above. Next, for each sample we calculated total metabolite load (TML), which was equal to the sum of individual metabolites measured in the respective sample. For TML calculation, missing values for individual metabolites were imputed by assigning the least possible peak area found in the dataset. The imputation was based on the hypothesis that as long as a given metabolite was present in some of the samples, its absence in other samples was due to the limit of detection of the analysis. All values for all metabolites within a sample were normalized with respect to TML. Once the normalized quantities were calculated, the data were imported in R (4.0.2) [R Core Team (2020)] and analyzed using the MetaboAnalyst package (4.0) (Chong et al., 2019).

Homology Modelling. The homology modelling of the FADS2 was performed using the Molecular Operating Environment (MOE) Suite (Warde-Farley et al., 2010) . The 3OZZ RCSB entry was used as template, which is the crystal structure of the *Bos taurus* cytochrome b5 core-swap mutant. The 3D models were subsequently energetically optimized the AMBER10

forcefield as it is implemented in the MOE Suite. Finally, all 3D models were assessed for their folding via the protein and geometry check of MOE Suite.

Molecular Docking. The docking module of MOE was used for the docking of the 6 PUFAs or cGAMP/DMXAA to STING and the FADS2 model. The 6 PUFAs that were used were namely: linoleic acid (LA), α-linolanic acid (ALA), dihomo-γ-linolenic acid (DGLA), arachidonic acid (AA), docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA). A fast Fourier transformation (FFT) pipeline is utilized by MOE for the docking experiment. The overall score is influenced by the model's packing, electrostatic, solvation and hydrophobic energies. Transient complexes of proteins are kept in a local database and their contact propensities are statistically used for docking. The top hits of the docking experiment were energetically optimized using energy minimization pipelines to relieve the models from any residual geometrical strain. Finally, the Drugster suite was used to perform a final and rapid energy minimization step using AMBER99 forcefield (Vilar et al., 2008), while solvated using an implicit Generalized Born (GB) water model.

Molecular Dynamics. The interaction pattern and overall fold of the final complexes of each one of the 6 PUFAs or cGAMP/DMXAA to either STING and FADS2 model, were subjected to exhaustive molecular dynamics simulations using the DrugOn suite [9]. Molecular dynamics simulations were executed in an explicitly SPC water solvated periodic cube system. Counter-ions were used as required to neutralize the molecular system. Each biological system was subjected to a hundred nanoseconds (100 ns) of molecular dynamics at 300K and at 1 fs step size. The molecular trajectory of each simulation was then imported into a local database for further analysis (Vlachakis et al., 2013).

Supplementary Information

Supplementary figure legends:

Figure S1: Sting Deficiency Leads to Global Metabolic Improvement

(A) Insulinemia was measured 15 min after the injection of glucose during a glucose tolerance test (GTT) in Sting$^{+/+}$ (n=6) and Sting$^{-/-}$ (n=7) mice,

(B) Representative actograms of wheel activity measured under a 12 h light / 12 h dark schedule (yellow), and under constant darkness (blue) in Sting$^{+/+}$ (n=11) and Sting$^{-/-}$ (n=10) mice,

(C) *Ucp1* mRNA levels were measured in the brown adipose tissue from Sting$^{+/+}$ (n=5) and Sting$^{-/-}$ (n=6) mice,

(D) Body weight of cGas$^{+/+}$ (n=6) and cGas$^{-/-}$ (n=7) mice fed normal chow diet at 8 weeks age.

(E) GTT was performed in cGas$^{+/+}$ (n=5) and cGas$^{-/-}$ (n=5) mice,

(F) Rectal temperature was measured in cGas$^{+/+}$ (n=6) and cGas$^{-/-}$ (n=7) mice,

(G) Body weight of Sting-Flox$^{+/+}$ (n=7) and Sting-Flox^{LysM} (n=8) mice fed normal chow diet at 8 weeks of age,

(H) GTT was performed in Sting-Flox$^{+/+}$ (n=7) and Sting-Flox^{LysM} (n = 6) mice,

(I) Rectal temperature of Sting-Flox$^{+/+}$ (n=9) and Sting-Flox^{LysM} (n=8) mice.

All graph present means ± SEM. P-values were determined by Student's t-test. ns: not significant.

Figure S2: Sting Interacts with Fads2 and Modulates Polyunsaturated Fatty Acids Pools

(A) Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) of liver samples from Sting$^{+/+}$ (pink) and Sting$^{-/-}$ (green) mice in which PUFAs and derivatives were measured by LC-MS (n=5 mice per group),

(B) Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) of white visceral adipose tissue samples from Sting$^{+/+}$ (pink) and Sting$^{-/-}$ (green) mice in which PUFAs and derivatives were measured by LC-MS (n=3 mice per group),

(C) Correlation plots of PUFAs and derivatives measured in samples from (A),

(D) Correlation plots of PUFAs and derivatives measured in samples from (B),

(E) Ratio between total Omega-6 and Omega-3 PUFAs and derivatives in WT, Sting-/-, or cGas-/- MEF samples,

(F) PUFAs and derivatives were measured in WT, Sting-/-, or cGas-/- MEF using LC-MS. Graph presents the sum of indicated PUFA and respective derivatives.

In panels (C) and (D) the side bars indicate in green: derivatives of ALA (Omega-3), in red: derivatives from LA (Omega-6), in black: PUFAs that do not vary across the samples, in

yellow: PUFAs and derivatives increased by at least 30%, and in blue: PUFAs decreased by at least 30%.

All graph present means ± SEM. P-values were determined by Student's t-test. ns: not significant. *: P < 0.05, **P: < 0.01, ***P: < 0.001.

Figure S3: Activation-dependent Sting Degradation Promotes Fads2 Activity

(A) *Pgc1α* and *Prdm16* mRNA levels in WT-MEFs cells after stimulation or not with dsDNA (2µg) for 6 h (n=4),

(B) Whole cell extracts (WCE) from control (CTL) or IRF3 knockout T98G cell lines stimulated or not for 6 h with dsDNA were analyzed by WB using indicated antibodies,

(C) *Ifnβ* mRNA levels from samples treated as in (B) were analyzed by RT-qPCR. Graph presents mean fold induction ± SEM, as compared to unstimulated control cells (n=3),

(D) WCE from WT-MEFs, infected or not for 16 h with HSV-KOS64, were analyzed by WB using indicated antibodies. Multiplicity of infection (MOI) scale was from 1.5x10-4 to 1.5,

(E) Left: Representative mice brain samples infected or not for 5 days with the McKrae HSV-1 strain analyzed by WB using indicated antibodies. Right: Quantification of Fads2 protein levels in mice brain extracts following 5 days of infection or not with McKrae HSV1 (n=4),

(F) *Ifnβ* mRNA levels were quantified from mice brain samples treated as in (C)

All graph present means ± SEM. P-values were determined by Student's t-test. ns: not significant. *: P < 0.05, **P: < 0.01, ***P: < 0.001.

Figure S4: cGAMP and PUFAs Orchestrate the Crosstalk between Fads2 and Sting

(A) PUFAs interact with the cGAMP-binding domain of Sting. 2D molecular interaction maps for cGAMP, DMXAA and the 6 PUFAs docked into STING (left column) and FADS2 (right column). LA: linoleic acid, DGLA: Dihomo-γ -linolenic acid, AA: arachidonic acid, ALA: α-linolenic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid,

(B) WCE from WT, Sting-/-, or cGas-/- MEF stimulated or not dsDNA (2µg) for 6h (left) or 24 h (right) were analyzed by WB using indicated antibodies,

(C) PUFAs measured in cells expressing Scramble (scr) or Fads2-targeting shRNAs using LC-MS. Graph presents indicated PUFA,

(D) *Prdm16* mRNA levels in cells expressing Scramble (scr) or Fads2-targeting shRNAs after stimulation or not with dsDNA for 6 h (n=4).

All graph present means ± SEM. P-values were determined by Student's t-test. ns: not significant. *: P < 0.05, **P: < 0.01.

590

591 **Supplementary Tables:**

592 **Table S1.** Major protein partners of Sting identified by Mass Spectrometry. * Unique peptides
593 identified in Mock IP. **: Unique peptides identified in F/HA-Sting IP. MW is in kDa. IP:
594 immunoprecipitation.

Uniprot Reference	Gene Symbol	MW	Mock	IP
sp|Q9WUN2|TBK1_MOUSE	Tbk1	83.37	0	8
sp|Q9Z0R9|FADS2_MOUSE	Fads2	52.35	0	10
sp|Q920L1|FADS1_MOUSE	Fads1	52.29	0	6
sp|Q9D6K9|CERS5_MOUSE	Cers5	48.13	0	5
sp|Q9CY27|TECR_MOUSE	Tecr	36.07	0	5
sp|Q8VCH6|DHC24_MOUSE	Dhcr24	60.07	0	4
sp|Q6NVG1|LPCT4_MOUSE	Lpcat4	57.11	0	4
sp|Q8K2C9|HACD3_MOUSE	Hacd3	43.10	0	2
sp|P47740|AL3A2_MOUSE	Aldh3a2	53.94	0	2

595

596 **Table S2.** Interaction energies of the docked cGAMP, DMXAA and the 6 PUFAs on Sting and
597 Fads2 proteins. Energies are in Kcal/mol.

	STING	FADS2
cGAMP	-34.925	-7.269
DMXAA	-24.400	-51.661
linoleic acid (LA)	-39.483	-57.098
dihomo-γ-linolenic acid (DGLA)	-13.064	-47.331
arachidonic acid (AA)	-42.827	-58.912
α-linolenic acid (ALA)	-43.658	-38.473
eicosapentaenoic acid (EPA)	-24.926	-41.078
docosahexaenoic acid (DHA)	-53.608	-57.339

598

599 **References:**

600 Abitbol, K., Debiesse, S., Molino, F., Mesirca, P., Bidaud, I., Minami, Y., Mangoni, M.E., Yagita, K.,
601 Mollard, P., and Bonnefont, X. (2017). Clock-dependent and system-driven oscillators interact in the
602 suprachiasmatic nuclei to pace mammalian circadian rhythms. PLoS One *12*, e0187001.

603 Ablasser, A., Goldeck, M., Cavlar, T., Deimling, T., Witte, G., Röhl, I., Hopfner, K.P., Ludwig, J., and
604 Hornung, V. (2013). cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates
605 STING. Nature *498*, 380-384.
606 Ablasser, A., Hemmerling, I., Schmid-Burgk, J.L., Behrendt, R., Roers, A., and Hornung, V. (2014). TREX1
607 deficiency triggers cell-autonomous immunity in a cGAS-dependent manner. Journal of immunology
608 (Baltimore, Md. : 1950) *192*, 5993-5997.
609 Baazim, H., Schweiger, M., Moschinger, M., Xu, H., Scherer, T., Popa, A., Gallage, S., Ali, A., Khamina,
610 K., Kosack, L., et al. (2019). CD8(+) T cells induce cachexia during chronic viral infection. Nature
611 immunology *20*, 701-710.
612 Bai, J., Cervantes, C., Liu, J., He, S., Zhou, H., Zhang, B., Cai, H., Yin, D., Hu, D., Li, Z., et al. (2017). DsbA-
613 L prevents obesity-induced inflammation and insulin resistance by suppressing the mtDNA release-
614 activated cGAS-cGAMP-STING pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the
615 United States of America *114*, 12196-12201.
616 Belchior, T., Paschoal, V.A., Magdalon, J., Chimin, P., Farias, T.M., Chaves-Filho, A.B., Gorjao, R., St-
617 Pierre, P., Miyamoto, S., Kang, J.X., et al. (2015). Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity,
618 glucose intolerance, and adipose tissue inflammation through PPARgamma-dependent and
619 PPARgamma-independent actions. Mol Nutr Food Res *59*, 957-967.
620 Berra, A., Tau, J., Zapata, G., and Chiaradia, P. (2017). Effects of PUFAs in a Mouse Model of HSV-1
621 Chorioretinitis. Ocul Immunol Inflamm *25*, 844-854.
622 Brestoff, J.R., and Artis, D. (2015). Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease.
623 Cell *161*, 146-160.
624 Buck, M.D., Sowell, R.T., Kaech, S.M., and Pearce, E.L. (2017). Metabolic Instruction of Immunity. Cell
625 *169*, 570-586.
626 Chong, J., Wishart, D.S., and Xia, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative
627 Metabolomics Data Analysis. Curr Protoc Bioinformatics *68*, e86.
628 Derosa, G., Cicero, A.F., D'Angelo, A., Borghi, C., and Maffioli, P. (2016). Effects of n-3 pufas on fasting
629 plasma glucose and insulin resistance in patients with impaired fasting glucose or impaired glucose
630 tolerance. Biofactors *42*, 316-322.
631 DiNicolantonio, J.J., and O'Keefe, J.H. (2018). Importance of maintaining a low omega-6/omega-3 ratio
632 for reducing inflammation. Open Heart *5*, e000946.
633 Fan, R., Koehler, K., and Chung, S. (2019). Adaptive thermogenesis by dietary n-3 polyunsaturated fatty
634 acids: Emerging evidence and mechanisms. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids *1864*, 59-70.
635 Fernández-Galilea, M., Félix-Soriano, E., Colón-Mesa, I., Escoté, X., and Moreno-Aliaga, M.J. (2020).
636 Omega-3 fatty acids as regulators of brown/beige adipose tissue: from mechanisms to therapeutic
637 potential. Journal of physiology and biochemistry *76*, 251-267.
638 Gabbs, M., Leng, S., Devassy, J.G., Monirujjaman, M., and Aukema, H.M. (2015). Advances in Our
639 Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs. Advances in nutrition (Bethesda, Md.) *6*, 513-
640 540.
641 Galland, L. (2010). Diet and inflammation. Nutrition in clinical practice : official publication of the
642 American Society for Parenteral and Enteral Nutrition *25*, 634-640.
643 Gao, D., Wu, J., Wu, Y.T., Du, F., Aroh, C., Yan, N., Sun, L., and Chen, Z.J. (2013a). Cyclic GMP-AMP
644 synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. Science (New York, N.Y.) *341*, 903-
645 906.
646 Gao, P., Ascano, M., Wu, Y., Barchet, W., Gaffney, B.L., Zillinger, T., Serganov, A.A., Liu, Y., Jones, R.A.,
647 Hartmann, G., et al. (2013b). Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] is the metazoan second messenger produced by
648 DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase. Cell *153*, 1094-1107.
649 Ghandour, R.A., Colson, C., Giroud, M., Maurer, S., Rekima, S., Ailhaud, G., Klingenspor, M., Amri, E.Z.,
650 and Pisani, D.F. (2018). Impact of dietary omega3 polyunsaturated fatty acid supplementation on
651 brown and brite adipocyte function. J Lipid Res *59*, 452-461.
652 Gonzalez-Periz, A., Horrillo, R., Ferre, N., Gronert, K., Dong, B., Moran-Salvador, E., Titos, E., Martinez-
653 Clemente, M., Lopez-Parra, M., Arroyo, V., et al. (2009). Obesity-induced insulin resistance and hepatic

steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. FASEB J *23*, 1946-1957.
Haag, S.M., Gulen, M.F., Reymond, L., Gibelin, A., Abrami, L., Decout, A., Heymann, M., van der Goot, F.G., Turcatti, G., Behrendt, R., et al. (2018). Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors. Nature *559*, 269-273.
Ishikawa, H., Ma, Z., and Barber, G.N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. Nature *461*, 788-792.
Jin, L., Getahun, A., Knowles, H.M., Mogan, J., Akerlund, L.J., Packard, T.A., Perraud, A.L., and Cambier, J.C. (2013). STING/MPYS mediates host defense against Listeria monocytogenes infection by regulating Ly6C(hi) monocyte migration. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) *190*, 2835-2843.
King, K.R., Aguirre, A.D., Ye, Y.X., Sun, Y., Roh, J.D., Ng, R.P., Jr., Kohler, R.H., Arlauckas, S.P., Iwamoto, Y., Savol, A., et al. (2017). IRF3 and type I interferons fuel a fatal response to myocardial infarction. Nature medicine *23*, 1481-1487.
Konno, H., Konno, K., and Barber, G.N. (2013). Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling. Cell *155*, 688-698.
Leonard, A.E., Kelder, B., Bobik, E.G., Chuang, L.T., Parker-Barnes, J.M., Thurmond, J.M., Kroeger, P.E., Kopchick, J.J., Huang, Y.S., and Mukerji, P. (2000). cDNA cloning and characterization of human Delta5-desaturase involved in the biosynthesis of arachidonic acid. The Biochemical journal *347 Pt 3*, 719-724.
Lira, F.S., Rosa Neto, J.C., Antunes, B.M., and Fernandes, R.A. (2014). The relationship between inflammation, dyslipidemia and physical exercise: from the epidemiological to molecular approach. Curr Diabetes Rev *10*, 391-396.
Liu, S., Cai, X., Wu, J., Cong, Q., Chen, X., Li, T., Du, F., Ren, J., Wu, Y.T., Grishin, N.V., et al. (2015). Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. Science (New York, N.Y.) *347*, aaa2630.
Nakamura, M.T., and Nara, T.Y. (2004). Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. Annual review of nutrition *24*, 345-376.
Ralston, J.C., Matravadia, S., Gaudio, N., Holloway, G.P., and Mutch, D.M. (2015). Polyunsaturated fatty acid regulation of adipocyte FADS1 and FADS2 expression and function. Obesity (Silver Spring, Md.) *23*, 725-728.
Reinert, L.S., Rashidi, A.S., Tran, D.N., Katzilieris-Petras, G., Hvidt, A.K., Gohr, M., Fruhwurth, S., Bodda, C., Thomsen, M.K., Vendelbo, M.H., et al. (2021). Brain immune cells undergo cGAS/STING-dependent apoptosis during herpes simplex virus type 1 infection to limit type I IFN production. J Clin Invest *131*.
Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., and Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. Cell Metab *6*, 38-54.
Sen, T., Rodriguez, B.L., Chen, L., Corte, C.M.D., Morikawa, N., Fujimoto, J., Cristea, S., Nguyen, T., Diao, L., Li, L., et al. (2019). Targeting DNA Damage Response Promotes Antitumor Immunity through STING-Mediated T-cell Activation in Small Cell Lung Cancer. Cancer Discov *9*, 646-661.
Sirtori, C.R., and Galli, C. (2002). N-3 fatty acids and diabetes. Biomed Pharmacother *56*, 397-406.
Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science (New York, N.Y.) *339*, 786-791.
Tosi, F., Sartori, F., Guarini, P., Olivieri, O., and Martinelli, N. (2014). Delta-5 and delta-6 desaturases: crucial enzymes in polyunsaturated fatty acid-related pathways with pleiotropic influences in health and disease. Advances in experimental medicine and biology *824*, 61-81.
Vila, I.K., Badin, P.M., Marques, M.A., Monbrun, L., Lefort, C., Mir, L., Louche, K., Bourlier, V., Roussel, B., Gui, P., et al. (2014). Immune cell Toll-like receptor 4 mediates the development of obesity- and endotoxemia-associated adipose tissue fibrosis. Cell Rep *7*, 1116-1129.
Vila, I.K., Park, M.K., Setijono, S.R., Yao, Y., Kim, H., Badin, P.M., Choi, S., Narkar, V., Choi, S.W., Chung, J., et al. (2019). A muscle-specific UBE2O/AMPKalpha2 axis promotes insulin resistance and metabolic syndrome in obesity. JCI Insight *4*.

704 Vilar, S., Cozza, G., and Moro, S. (2008). Medicinal chemistry and the molecular operating environment
705 (MOE): application of QSAR and molecular docking to drug discovery. Curr Top Med Chem *8*, 1555-
706 1572.
707 Vlachakis, D., Tsagrasoulis, D., Megalooikonomou, V., and Kossida, S. (2013). Introducing Drugster: a
708 comprehensive and fully integrated drug design, lead and structure optimization toolkit.
709 Bioinformatics *29*, 126-128.
710 Warde-Farley, D., Donaldson, S.L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., Franz, M., Grouios, C.,
711 Kazi, F., Lopes, C.T., et al. (2010). The GeneMANIA prediction server: biological network integration for
712 gene prioritization and predicting gene function. Nucleic Acids Res *38*, W214-220.
713 Wu, J.J., Zhao, L., Hu, H.G., Li, W.H., and Li, Y.M. (2020). Agonists and inhibitors of the STING pathway:
714 Potential agents for immunotherapy. Medicinal research reviews *40*, 1117-1141.
715 Zhang, C., Hu, Z., Wang, K., Yang, L., Li, Y., Schluter, H., Yang, P., Hong, J., and Yu, H. (2020). Lipidomic
716 profiling of virus infection identifies mediators that resolve herpes simplex virus-induced corneal
717 inflammatory lesions. Analyst *145*, 3967-3976.
718 Zhang, X., Shi, H., Wu, J., Zhang, X., Sun, L., Chen, C., and Chen, Z.J. (2013). Cyclic GMP-AMP containing
719 mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. Molecular cell *51*, 226-
720 235.

721

Bibliographie

A

Abe T, Barber GN. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-kappaB activation through TBK1. J Virol 2014. 88:5328–41. doi: 10.1128/ JVI.00037-14

Abe T, Shapira SD. Negative Regulation of Cytosolic Sensing of DNA. Int Rev Cell Mol Biol 2019. 344:91–115. doi: 10.1016/bs.ircmb.2018.09.002

Abels ER, Maas SLN, Tai E, Ting DT, Broekman MLD, Breakefield XO, El Khoury J. GlioM&M: Web-based tool for studying circulating and infiltrating monocytes and macrophages in glioma. Sci Rep 2020 Jun 18;10(1):9898. doi: 10.1038/s41598-020-66728-w

Ablasser A, Schmid-Burgk JL, Hemmerling I, Horvath GL, Schmidt T, Latz E, et al. Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. Nature 2013 503:530–4. doi: 10.1038/ nature12640

Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. Expert Opin Investig Drugs. 2009;18(8):1061-1083. doi:10.1517/13543780903052764

Agarwal N, Carare RO. Cerebral Vessels: An Overview of Anatomy, Physiology, and Role in the Drainage of Fluids and Solutes. Front Neurol. 2021;11:611485. doi:10.3389/fneur.2020.611485

Ager CR, Reilley MJ, Nicholas C, Bartkowiak T, Jaiswal AR, Curran MA. Intratumoral STING Activation with T-cell Checkpoint Modulation Generates Systemic Antitumor Immunity. Cancer Immunol Res. 2017;5(8):676-684. doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0049

Ahir B.K., Engelhard H.H., Lakka S.S. Tumor development and angiogenesis in adult brain tumor: Glioblastoma. Mol. Neurobiol. 2020;57:2461–2478. doi: 10.1007/s12035-020-01892-8.

Ahn J, Xia T, Konno H, et al. Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. Nat Commun 2014 ; 5 : 5166.

Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. Adv Immunol. 2001;78:1-56. doi:10.1016/s0065-2776(01)78001-7

Akter, F.; Simon, B.; de Boer, N.L.; Redjal, N.; Wakimoto, H.; Shah, K. Pre-clinical tumor models of primary brain tumors: Challenges and opportunities. Biochim. Et Biophys. Acta. Rev. Cancer 2021, 1875, 188458.

Allavena P, Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. Clin Exp Immunol. 2012;167(2):195-205. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04515.x

Almine JF, O'Hare CA, Dunphy G, Haga IR, Naik RJ, Atrih A, et al. IFI16 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes. Nat Commun 2017. 8:14392. doi: 10.1038/ ncomms14392

Ammirati M, Galicich JH, Arbit E, Liao Y. Reoperation in the treatment of recurrent intracranial malignant gliomas. Neurosurgery. 1987 Nov;21(5):607-14. doi: 10.1227/00006123-198711000-00001.

Amouzegar A, Chelvanambi M, Filderman JN, Storkus WJ, Luke JJ. STING Agonists as Cancer Therapeutics. Cancers (Basel). 2021;13(11):2695. doi:10.3390/cancers13112695

An X,ZhuY,ZhengT,WangG,ZhangM,LiJ,JiH,LiS,YangS,XuD,etal. An analysis of the expression and association with immune cell infiltration of the cGAS/STING pathway in pan-cancer. Mol Ther Nucleic Acids. 2019;14: 80–9.

Andreeva L, Hiller B, Kostrewa D, Lassig C, de Oliveira Mann CC, Jan Drexler D, et al. cGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein-DNA ladders. Nature 2017. 549:394–8. doi: 10.1038/ nature23890

Anfray C, Ummarino A, Andón FT, Allavena P. Current Strategies to Target Tumor-Associated-Macrophages to Improve Anti-Tumor Immune Responses. Cells. 2019;9(1):46. doi:10.3390/cells9010046

Argyle D., Kitamura T. Targeting Macrophage-Recruiting Chemokines as a Novel Therapeutic Strategy to Prevent the Progression of Solid Tumors. Front. Immunol. 2018. 9:2629. doi: 10.3389/fimmu.2018.02629.

Astell KR, Sieger D. Investigating microglia-brain tumor cell interactions in vivo in the larval zebrafish brain. Methods Cell Biol. 2017;138:593-626. doi:10.1016/bs.mcb.2016.10.001

Azzi S, Hebda JK, Gavard J. Vascular permeability and drug delivery in cancers. Front Oncol. 2013;3:211. doi:10.3389/fonc.2013.00211

B

Babu R, Sharma R, Karikari IO, Owens TR, Friedman AH, Adamson C. Outcome and prognostic factors in adult cerebellar glioblastoma. J Clin Neurosci. 2013. 20(8):1117-1121. doi:10.1016/j.jocn.2012.12.006

Back, M., Rodriguez, M., Jayamanne, D., Khasraw, M., Lee, A. & Wheeler, H. 2018. Understanding the Revised Fourth Edition of the World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System (2016) for Clinical Decision-making: A Guide for Oncologists Managing Patients with Glioma. Clin Oncol (R Coll Radiol), 30, 556-562.

Badie B, Schartner J, Prabakaran S, Paul J, Vorpahl J (2001) Expression of Fas ligand by microglia: possible role in glioma immune evasion. J Neuroimmunol 120(1–2):19–24

Baird JR, Friedman D, Cottam B, et al. Radiotherapy Combined with Novel STING-Targeting Oligonucleotides Results in Regression of Established Tumors. Cancer Res. 2016;76(1):50-61. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3619

Baker G.J., Yadav V.N., Motsch S., Koschmann C., Calinescu A.A., Mineharu Y., Camelo-Piragua S.I., Orringer D., Bannykh S., Nichols W.S., et al. Mechanisms of glioma formation: Iterative perivascular glioma growth and invasion leads to tumor progression, VEGF-independent vascularization, and resistance to antiangiogenic therapy. Neoplasia. 2014;16:543–561. doi: 10.1016/j.neo.2014.06.003

Bakhoum SF, Ngo B, Laughney AM, et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. Nature 2018 ; 553 : 467–472.

Banasavadi-Siddegowda YK, Welker AM, An M, et al. PRMT5 as a druggable target for glioblastoma therapy. Neuro Oncol. 2018;20(6):753-763. doi:10.1093/neuonc/nox206

Barber GN. STING-dependent signaling. Nat Immunol. 2011 Sep 20;12(10):929-30. doi: 10.1038/ni.2118. Erratum in: Nat Immunol. 2012 Feb;13(2):196. PMID: 21934672.

Baris AM, Fraile-Bethencourt E, Anand S. Nucleic Acid Sensing in the Tumor Vasculature. Cancers (Basel). 2021;13(17):4452. doi:10.3390/cancers13174452

Barnett K, Coronas-Serna J, Zhou W, Ernandes M, Cao A, Kranzusch P, et al. Phosphoinositide Interactions Position cGAS at the Plasma Membrane to Ensure Efficient Distinction between Self- and Viral DNA. Cell (2019) 176(6):1432–+. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.049

Bennett CM, Kanki JP, Rhodes J, Liu TX, Paw BH, Kieran MW, Langenau DM, Delahaye-Brown A, Zon LI, Fleming MD and Look AT . (2001). Blood, 98, 643–651.

Berghmans S, Murphey RD, Wienholds E, et al. tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(2):407-412. doi:10.1073/pnas.0406252102

Bernardos RL, Raymond PA. GFAP transgenic zebrafish. Gene Expr Patterns. 2006;6(8):1007-1013. doi:10.1016/j.modgep.2006.04.006

Bertrand JY, Kim AD, Violette EP, Stachura DL, Cisson JL, Traver D. Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. Development. 2007;134(23):4147-4156. doi:10.1242/dev.012385

Bertrand JY, Cisson JL, Stachura DL, Traver D. Notch signaling distinguishes 2 waves of definitive hematopoiesis in the zebrafish embryo. Blood. 2010;115(14):2777-2783. doi:10.1182/blood-2009-09-244590

Beutler BA. TLRs and innate immunity. Blood. 2009;113(7):1399-1407. doi:10.1182/blood-2008-07-019307

Bhatelia K, Singh K, Singh R. TLRs: linking inflammation and breast cancer. Cell Signal. 2014;26(11):2350-2357. doi:10.1016/j.cellsig.2014.07.035

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. J Pathol. 2002;196(3):254-265. doi:10.1002/path.1027

Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nat Immunol. 2010;11(10):889-896. doi:10.1038/ni.1937

Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. J Immunol 2008;180:2011–7.

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

Bohnsack BL, Gallina D, Kahana A. Phenothiourea sensitizes zebrafish cranial neural crest and extraocular muscle development to changes in retinoic acid and IGF signaling. PLoS One. 2011;6(8):e22991. doi:10.1371/journal.pone.0022991

Boimel PJ, Smirnova T, Zhou ZN, et al. Contribution of CXCL12 secretion to invasion of breast cancer cells. Breast Cancer Res. 2012;14(1):R23. doi:10.1186/bcr3108

Bonapace L., Coissieux M.-M., Wyckoff J., Mertz K.D., Varga Z., Junt T., Bentires-Alj M. Cessation of CCL2 Inhibition Accelerates Breast Cancer Metastasis by Promoting Angiogenesis. Nature. 2014;515:130–133. doi: 10.1038/nature13862.

Boutilier AJ, Elsawa SF. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. Int J Mol Sci. 2021;22(13):6995. doi:10.3390/ijms22136995

Brana I, Calles A, LoRusso PM, et al. Carlumab, an anti-C-C chemokine ligand 2 monoclonal antibody, in combination with four chemotherapy regimens for the treatment of patients with solid tumors: an open-label, multicenter phase 1b study. Target Oncol. 2015;10(1):111-123. doi:10.1007/s11523-014-0320-2

Bregnard C, Guerra J, Dejardin S, Passalacqua F, Benkirane M, Laguette N. Upregulated LINE-1 Activity in the Fanconi Anemia Cancer Susceptibility Syndrome Leads to Spontaneous Pro-inflammatory Cytokine Production. EBioMedicine (2016) 8:184–94. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.05.005

Breznik B, Motaln H, Vittori M, Rotter A, Lah Turnšek T. Mesenchymal stem cells differentially affect the invasion of distinct glioblastoma cell lines. Oncotarget. 2017;8(15):25482-25499. doi:10.18632/oncotarget.16041

Brighi, C.; Reid, L.; Genovesi, L.A.; Kojic, M.; Millar, A.; Bruce, Z.; White, A.L.; Day, B.W.; Rose, S.; Whittaker, A.K.; et al. Comparative study of preclinical mouse models of high-grade glioma for nanomedicine research: The importance of reproducing blood-brain barrier heterogeneity. Theranostics 2020, 10, 6361–6371

Brown J.M. Vasculogenesis: A crucial player in the resistance of solid tumours to radiotherapy. Br. J. Radiol. 2014;87:20130686. doi: 10.1259/bjr.20130686

Brown TJ, Brennan MC, Li M, *et al.* Association of the extent of resection with survival in glioblastoma: a systematic review and meta-analysis. JAMA Oncol. 2016;2:1460-1469.

Bruns AM, Horvath CM. LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling. Cytokine. 2015;74(2):198-206. doi:10.1016/j.cyto.2015.02.010

Buonfiglioli A, Hambardzumyan D. Macrophages and microglia: the cerberus of glioblastoma. Acta Neuropathol Commun. 2021;9(1):54. Published 2021 Mar 25. doi:10.1186/s40478-021-01156-z

Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. Nature (2011) 478:515–8. doi: 10.1038/nature10429

Burger MC, Zhang C, Harter PN, et al. CAR-Engineered NK Cells for the Treatment of Glioblastoma: Turning Innate Effectors Into Precision Tools for Cancer Immunotherapy. Front Immunol. 2019;10:2683. Published 2019 Nov 14. doi:10.3389/fimmu.2019.02683

Burleigh K, Maltbaek JH, Cambier S, Green R, Gale M, Jr., James RC, et al. . Human DNA-PK activates a STING-independent DNA sensing pathway. Sci Immunol (2020) 5:43. 10.1126/sciimmunol.aba4219

C

Cabrera AR, Kirkpatrick JP, Fiveash JB, et al. Radiation therapy for glioblastoma: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. Pract Radiat Oncol. 2016;6(4):217-225. doi:10.1016/j.prro.2016.03.007

Canè S., Ugel S., Trovato R., Marigo I., De Sanctis F., Sartoris S., Bronte V. The Endless Saga of Monocyte Diversity. Front. Immunol. 2019;10:1786. doi: 10.3389/fimmu.2019.01786.

Cantor J, Haskins K. Recruitment and activation of macrophages by pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes: evidence for involvement of CCR8 and CCL1. J Immunol. 2007;179(9):5760-5767. doi:10.4049/jimmunol.179.9.5760

Carlsson SK, Brothers SP, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. EMBO Mol Med. 2014;6(11):1359-1370. doi:10.15252/emmm.201302627

Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. Nat Rev Drug Discov. 2011;10(6):417-427. doi:10.1038/nrd3455

Carozza JA, Böhnert V, Nguyen KC, Skariah G, Shaw KE, Brown JA, et al. Extracellular cGAMP is a cancer-cell-produced immunotransmitter involved in radiation-induced anticancer immunity. Nat Cancer (2020) 1:184–96. doi: 10.1038/s43018-020-0028-4

Carter T, Vancurová I, Sun I, Lou W, DeLeon S. A DNA-activated protein kinase from HeLa cell nuclei. Mol Cell Biol. 1990;10(12):6460-6471. doi:10.1128/mcb.10.12.6460-6471.1990

Carson MJ, Crane J, Xie AX. Modeling CNS microglia: the quest to identify predictive models. Drug Discov Today Dis Models. 2008;5(1):19-25. doi:10.1016/j.ddmod.2008.07.006

Carvalho da Fonseca AC, Wang H, Fan H, et al. Increased expression of stress inducible protein 1 in glioma-associated microglia/macrophages. J Neuroimmunol. 2014;274(1-2):71-77. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.06.021

Casano AM, Peri F. Microglia: multitasking specialists of the brain. Dev Cell. 2015;32(4):469-477. doi:10.1016/j.devcel.2015.01.018

Caspani EM, Crossley PH, Redondo-Garcia C, Martinez S. Glioblastoma: a pathogenic crosstalk between tumor cells and pericytes. PLoS One. 2014;9(7):e101402. doi:10.1371/journal.pone.0101402

Castro BA, Flanigan P, Jahangiri A, et al. Macrophage migration inhibitory factor downregulation: a novel mechanism of resistance to anti-angiogenic therapy. Oncogene. 2017;36(26):3749-3759. doi:10.1038/onc.2017.1

Ceradini DJ, Gurtner GC. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. Trends Cardiovasc Med. 2005;15(2):57-63. doi:10.1016/j.tcm.2005.02.002

Cerboni S., Jeremiah N., Gentili M., et al. Intrinsic antiproliferative activity of the innate sensor STING in T lymphocytes. The Journal of Experimental Medicine. 2017;214(6):1769–1785. doi: 10.1084/jem.20161674.

Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, *et al.* Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. Neuro Oncol. 2014;16:113-122.

Chakrabarti I, Cockburn M, Cozen W, Wang YP, Preston-Martin S. A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999. Cancer. 2005;104(12):2798-2806. doi:10.1002/cncr.21539

Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in *vitro* cell model for immune modulation approach. Int Immunopharmacol. 2014;23(1):37-45. doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002

Chazaud B, Chrétien F, Gherardi RK. Les macrophages régulent les différentes phases de la régénération musculaire. Med Sci (Paris) 2007; 23 : 794–7

Chen Q, Boire A, Jin X, et al. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. Nature 2016 ; 533 : 493–498.

Chen YA, Shen YL, Hsia HY, Tiang YP, Sung TL, Chen LY. 2017. Extrachromosomal telomere repeat DNA is linked to ALT development via cGAS-STING DNA sensing pathway. Nat. Struct. Mol. Biol. 24:1124– 31

Chen Z, Feng X, Herting CJ, et al. Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. Cancer Res. 2017;77(9):2266-2278. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2310

Cheng H, Xu Q, Lu X, et al. Activation of STING by cGAMP Regulates MDSCs to Suppress Tumor Metastasis via Reversing Epithelial-Mesenchymal Transition. Front Oncol. 2020;10:896. 11. doi:10.3389/fonc.2020.00896

Cheng N, Watkins-Schulz R, Junkins RD, David CN, Johnson BM, Montgomery SA, Peine KJ, Darr DB, Yuan H, McKinnon KP, Liu Q, Miao L, Huang L, Bachelder EM, Ainslie KM, Ting JP. A nanoparticle-incorporated STING activator enhances antitumor immunity in PD-L1-insensitive models of triple-negative breast cancer. JCI Insight. 2018 Nov 15;3(22):e120638. doi: 10.1172/jci.insight.120638.

Cheradame L, Guerrera IC, Gaston J, Schmitt A, Jung V, Pouillard M, et al. . STING Promotes Breast Cancer Cell Survival by an Inflammatory-Independent Nuclear Pathway Enhancing the DNA Damage Response. bioRxiv (2020). 10.1101/2020.07.11.196790

Chia K, Mazzolini J, Mione M, Sieger D. Tumor initiating cells induce Cxcr4-mediated infiltration of pro-tumoral macrophages into the brain. Elife. 2018;7:e31918. doi:10.7554/eLife.31918

Choucair AK, Levin VA, Gutin PH, et al. Development of multiple lesions during radiation therapy and chemotherapy in patients with gliomas. J Neurosurg. 1986;65(5):654-658. doi:10.3171/jns.1986.65.5.0654

Ciszewski WM, Tavecchio M, Dastych J, Curtin NJ. DNA-PK inhibition by NU7441 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation and doxorubicin. Breast Cancer Res Treat. 2014;143(1):47-55. doi:10.1007/s10549-013-2785-6

Cohen MH, Shen YL, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. Oncologist. 2009;14(11):1131-1138. doi:10.1634/theoncologist.2009-0121

Collins AC, Cai H, Li T, Franco LH, Li XD, Nair VR, Scharn CR, Stamm CE, Levine B, Chen ZJ, Shiloh MU. Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune DNA Sensor for Mycobacterium tuberculosis. Cell Host Microbe. 2015 Jun 10;17(6):820-8. doi: 10.1016/j.chom.2015.05.005

Coniglio SJ, Eugenin E, Dobrenis K, et al. Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling. Mol Med. 2012;18(1):519-527. doi:10.2119/molmed.2011.00217

Conti I, Rollins BJ. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. Semin Cancer Biol. 2004;14(3):149-154. doi:10.1016/j.semcancer.2003.10.009

Coquel F, Silva MJ, Técher H, et al. SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction. Nature. 2018;557(7703):57-61. doi:10.1038/s41586-018-0050-1

Corkery DP, Dellaire G, Berman JN. Leukaemia xenotransplantation in zebrafish--chemotherapy response assay in vivo. Br J Haematol. 2011;153(6):786-789. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08661.x

Corrales L, Glickman LH, McWhirter SM, et al. Direct activation of STING in the tumor microenvironment leads to potent and systemic tumor regression and immunity. Cell Rep 2015 ; 11 : 1018–1030.

Corrales L, McWhirter SM, Dubensky TW Jr, Gajewski TF. The host STING pathway at the interface of cancer and immunity. J Clin Invest. 2016;126(7):2404-2411. doi:10.1172/JCI86892

Cortés M, Sanchez-Moral L, de Barrios O, et al. Tumor-associated macrophages (TAMs) depend on ZEB1 for their cancer-promoting roles. EMBO J. 2017;36(22):3336-3355. doi:10.15252/embj.201797345

Costa B, Estrada MF, Mendes RV, Fior R. Zebrafish Avatars towards Personalized Medicine-A Comparative Review between Avatar Models. Cells. 2020;9(2):293. Published 2020 Jan 25. doi:10.3390/cells9020293

Crocetti E, Trama A, Stiller C, et al. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. Eur J Cancer. 2012;48(10):1532-1542. doi:10.1016/j.ejca.2011.12.013

Cui Y, Yu H, Zheng X, et al. SENP7 Potentiates cGAS Activation by Relieving SUMO-Mediated Inhibition of Cytosolic DNA Sensing. PLoS Pathog. 2017;13(1):e1006156. doi:10.1371/journal.ppat.1006156

D

Dalton HJ, Pradeep S, McGuire M, et al. Macrophages Facilitate Resistance to Anti-VEGF Therapy by Altered VEGFR Expression. Clin Cancer Res. 2017;23(22):7034-7046. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0647

Dansako H, Ueda Y, Okumura N, et al. The cyclic GMP-AMP synthetase-STING signaling pathway is required for both the innate immune response against HBV and the suppression of HBV assembly. FEBS J. 2016;283(1):144-156. doi:10.1111/febs.13563

Davidson AJ, Zon LI. The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis. Oncogene. 2004;23(43):7233-7246. doi:10.1038/sj.onc.1207943

Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013a). Tissue-resident macrophages. Nat. Immunol. 14, 986–995.

Davies, L.C., Rosas, M., Jenkins, S.J., Liao, C.T., Scurr, M.J., Brombacher, F., Fraser, D.J., Allen, J.E., Jones, S.A., and Taylor, P.R. (2013b). Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. Nat Commun 4, 1886.

Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. Clin J Oncol Nurs. 2016;20(5 Suppl):S2-S8. doi:10.1188/16.CJON.S1.2-8

De Vleeschouwer S, Bergers G. Glioblastoma: To Target the Tumor Cell or the Microenvironment? In: De Vleeschouwer S, editor. Glioblastoma. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep 27. Chapter 16. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469984/doi: 10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch16

Dello Russo C, Lisi L, Tentori L, Navarra P, Graziani G, Combs CK. Exploiting Microglial Functions for the Treatment of Glioblastoma. Curr Cancer Drug Targets. 2017;17(3):267-281. doi:10.2174/1568009616666160813191240

Den Hertog J. Tumor Suppressors in Zebrafish: From TP53 to PTEN and Beyond. Adv Exp Med Biol. 2016;916:87-101. doi:10.1007/978-3-319-30654-4_4

Demaria O, et al. STING activation of tumor endothelial cells initiates spontaneous and therapeutic antitumor immunity. Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112(50):15408–15413.

Deng L, Liang H, Xu M, et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced type i interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors. Immunity 2014 ; 41 : 843–852.

DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. Cancer Discov. 2011;1(1):54-67. doi:10.1158/2159-8274.CD-10-0028

Desland FA, Hormigo A. The CNS and the Brain Tumor Microenvironment: Implications for Glioblastoma Immunotherapy. Int J Mol Sci. 2020;21(19):7358. Published 2020 Oct 5. doi:10.3390/ijms21197358

Detrich HW, Kieran MW, Chan FY, et al. Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(23):10713-10717. doi:10.1073/pnas.92.23.10713

Diepenbruck M, Christofori G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe?. Curr Opin Cell Biol. 2016;43:7-13. doi:10.1016/j.ceb.2016.06.002

Dillon MT, Bergerhoff KF, Pedersen M, Whittock H, Crespo-Rodriguez E, Patin EC, et al. . ATR Inhibition Potentiates the Radiation-induced Inflammatory Tumor Microenvironment. Clin Cancer Res (2019) 25:3392–403. 10.1158/1078-0432.CCR-18-1821

Dix AR, Brooks WH, Roszman TL, Morford LA. Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. J Neuroimmunol. 1999;100(1–2):216–32.

Dobes M, Khurana VG, Shadbolt B, et al. Increasing incidence of glioblastoma multiforme and meningioma, and decreasing incidence of Schwannoma (2000-2008): Findings of a multicenter Australian study. Surg Neurol Int. 2011;2:176. doi:10.4103/2152-7806.90696

Döme B., Hendrix M.J., Paku S., Tóvári J., Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. Am. J. Pathol. 2007;170:1–15. doi: 10.2353/ajpath.2007.060302

Dong J, Ren Y, Zhang T, et al. Inactivation of DNA-PK by knockdown DNA-PKcs or NU7441 impairs non-homologous end-joining of radiation-induced double strand break repair. Oncol Rep. 2018;39(3):912-920. doi:10.3892/or.2018.6217

Dong Q, Svoboda K, Tiersch TR, Monroe WT. Photobiological effects of UVA and UVB light in zebrafish embryos: evidence for a competent photorepair system. J Photochem Photobiol B. 2007;88(2-3):137-146. doi:10.1016/j.jphotobiol.2007.07.002

Donier E., Gomez-Sanchez J.A., Grijota-Martinez C., Lakomaá J., Baars S., Garcia-Alonso L., Cadebo H. L1CAM binds ErbB recep- tors through Ig-like domains coupling cell adhesion and neuregu- lin signalling. PLoS ONE. 2012;7:e40674. doi: 10.1371/journal.pone.0040674

Dou Z, Ghosh K, Vizioli MG, Zhu J, Sen P, Wangensteen KJ, et al. Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. Nature (2017) 550:402–6. doi: 10.1038/nature24050

Downey CM, Aghaei M, Schwendener RA, Jirik FR. DMXAA causes tumor site-specific vascular disruption in murine non-small cell lung cancer, and like the endogenous non-canonical cyclic dinucleotide STING agonist, 2'3'-cGAMP, induces M2 macrophage repolarization. PLoS One. 2014;9(6):e99988. doi:10.1371/journal.pone.0099988

Drabsch Y, He S, Zhang L, Snaar-Jagalska BE, ten Dijke P. Transforming growth factor-β signalling controls human breast cancer metastasis in a zebrafish xenograft model. Breast Cancer Res. 2013;15(6):R106. doi:10.1186/bcr3573

Drappatz J, Norden AD, Wen PY. Therapeutic strategies for inhibiting invasion in glioblastoma. Expert Rev Neurother. 2009;9(4):519-534. doi:10.1586/ern.09.10

Du M, Chen ZJ. DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling. Science. 2018;361(6403):704-709. doi:10.1126/science.aat1022

Du, R., Lu, K. V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegue, E., et al. (2008). HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. Cancer Cell 13, 206–220. doi: 10.1016/j.ccr.2008.01.034

E

Ebert RH, Florey HW. The Extravascular Development of the Monocyte Observed In vivo. Br J Exp Pathol. 1939;20(4):342-356.

Eden CJ, Ju B, Murugesan M, et al. Orthotopic models of pediatric brain tumors in zebrafish. Oncogene. 2015;34(13):1736-1742. doi:10.1038/onc.2014.107

Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. J Leukoc Biol. 2006;80(6):1298-1307. doi:10.1189/jlb.0406249

Ellett F, Pase L, Hayman JW, Andrianopoulos A, Lieschke GJ. mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. Blood. 2011;117(4):e49-e56. doi:10.1182/blood-2010-10-314120

Elliott SL, Crawford C, Mulligan E, et al. Mitoxantrone in combination with an inhibitor of DNA-dependent protein kinase: a potential therapy for high risk B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2011;152(1):61-71. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08425.x

Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. Immunity. 2014;41(1):21-35. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.013

Ergun SL, Fernandez D, Weiss TM, Li L. STING Polymer Structure Reveals Mechanisms for Activation, Hyperactivation, and Inhibition. Cell 2019. 178:290–301 e10. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.036 46.

Etzerodt A, Tsalkitzi K, Maniecki M, et al. Specific targeting of CD163+ TAMs mobilizes inflammatory monocytes and promotes T cell-mediated tumor regression. J Exp Med. 2019;216(10):2394-2411. doi:10.1084/jem.20182124

F

Fan Y, Xue W, Schachner M, Zhao W. Honokiol Eliminates Glioma/Glioblastoma Stem Cell-Like Cells Via JAK-STAT3 Signaling and Inhibits Tumor Progression by Targeting Epidermal Growth Factor Receptor. Cancers (Basel). 2018;11(1):22. doi:10.3390/cancers11010022

Fanelli GN, Grassini D, Ortenzi V, et al. Decipher the Glioblastoma Microenvironment: The First Milestone for New Groundbreaking Therapeutic Strategies. Genes (Basel). 2021;12(3):445. doi:10.3390/genes12030445

Fecci PE, Ochiai H, Mitchell DA, et al. Systemic CTLA-4 blockade ameliorates glioma-induced changes to the CD4+ T cell compartment without affecting regulatory T-cell function. Clin Cancer Res. 2007;13(7):2158-2167. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2070

Fedele M, Cerchia L, Pegoraro S, Sgarra R, Manfioletti G. Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma. Int J Mol Sci. 2019;20(11):2746. doi:10.3390/ijms20112746

Ferguson BJ, Mansur DS, Peters NE, Ren H, Smith GL. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. Elife (2012) 1:e00047. 10.7554/eLife.00047

Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. Nature (2009) 458:509–13. doi: 10.1038/nature07710

Ferrero G, Mahony CB, Dupuis E, et al. Embryonic Microglia Derive from Primitive Macrophages and Are Replaced by cmyb-Dependent Definitive Microglia in Zebrafish. Cell Rep. 2018;24(1):130-141. doi:10.1016/j.celrep.2018.05.066

Fior R, Póvoa V, Mendes RV, et al. Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(39):E8234-E8243. doi:10.1073/pnas.1618389114

Fleurence J, Bahri M, Fougeray S, et al. Impairing temozolomide resistance driven by glioma stem-like cells with adjuvant immunotherapy targeting O-acetyl GD2 ganglioside. Int J Cancer. 2020;146(2):424-438. doi:10.1002/ijc.32533

Folkins C., Shaked Y., Man S., Tang T., Lee C.R., Zhu Z., Hoffman R.M., Kerbel R.S. Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. Cancer Res. 2009;69:7243–7251. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0167.

Foote JB, Kok M, Leatherman JM, et al. A STING Agonist Given with OX40 Receptor and PD-L1 Modulators Primes Immunity and Reduces Tumor Growth in Tolerized Mice. Cancer Immunol Res. 2017;5(6):468-479. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0284

Fontana A, Bodmer S, Frei K, Malipiero U, Siepl C. Expression of TGF-beta 2 in human glioblastoma: A role in resistance to immune rejection? Ciba Found Symp. 1991;157:232–8.discussion 8–41.

Francica BJ, Ghasemzadeh A, Desbien AL, et al. TNFa and Radioresistant Stromal Cells Are Essential for Therapeutic Efficacy of Cyclic Dinucleotide STING Agonists in Nonimmunogenic Tumors. Cancer Immunol Res. 2018;6(4):422-433. doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0263

Fu J, Kanne DB, Leong M, et al. STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade. Sci Transl Med. 2015;7(283):283ra52. doi:10.1126/scitranslmed.aaa4306

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes Dev. 2007;21(21):2683-2710. doi:10.1101/gad.1596707

G

Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nat Rev Immunol 2012;12:253–68.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. Cancer Res. 2004;64(19):7011-7021. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1364

Gao P, Ascano M, Zillinger T, Wang W, Dai P, Serganov AA, et al. Structure function analysis of STING activation by cG(2',5')pA(3',5')p. and targeting by antiviral DMXAA. Cell (2013) 154:748–62. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.023

Gao X, Yu T, Xu G, et al. Enhancing the anti-glioma therapy of doxorubicin by honokiol with biodegradable self-assembling micelles through multiple evaluations. Sci Rep. 2017;7:43501. doi:10.1038/srep43501

García-Gómez P, Valiente M. Vascular co-option in brain metastasis. Angiogenesis. 2020;23(1):3-8. doi:10.1007/s10456-019-09693-x

Garcia GR, Noyes PD, Tanguay RL. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. Pharmacol Ther. 2016;161:11-21. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.009

Gaspar LE, Fisher BJ, Macdonald DR, et al. Supratentorial malignant glioma: patterns of recurrence and implications for external beam local treatment. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1992;24(1):55-57. doi:10.1016/0360-3016(92)91021-e

Geiger GA, Fu W, Kao GD. Temozolomide-mediated radiosensitization of human glioma cells in a zebrafish embryonic system. Cancer Res. 2008;68(9):3396-3404. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6396

Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. BMC Cancer. 2015;15:577. doi:10.1186/s12885-015-1546-9

Gentili M, Lahaye X, Nadalin F, Nader GPF, Lombardi EP, Herve S, et al. The N-Terminal Domain of cGAS Determines Preferential Association with Centromeric DNA and Innate Immune Activation in the Nucleus. Cell Rep 2019. 26(13):3798. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.049

Gentili M, Kowal J, Tkach M, Satoh T, Lahaye X, Conrad C, et al. Transmission of innate immune signaling by packaging of cGAMP in viral particles. Science 2015. 349:1232–6. doi: 10.1126/science.aab3628

Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, et al. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. Cancer Cell. 2013;23(2):249-262. doi:10.1016/j.ccr.2013.01.008

Gilroy, D.W., et al. (2004) Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. Nat Rev Drug Discov, 3, 401-416.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science 330, 841–845.

Glass R, Synowitz M. CNS macrophages and peripheral myeloid cells in brain tumours. Acta Neuropathol. 2014;128(3):347-362. doi:10.1007/s00401-014-1274-2

Glück S, Guey B, Gulen MF, et al. Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. Nat Cell Biol. 2017;19(9):1061-1070. doi:10.1038/ncb3586

Gomez-Roca CA, Italiano A, Le Tourneau C, et al. Phase I study of emactuzumab single agent or in combination with paclitaxel in patients with advanced/metastatic solid tumors reveals depletion of immunosuppressive M2-like macrophages. Ann Oncol. 2019;30(8):1381-1392. doi:10.1093/annonc/mdz163

Gonugunta VK, Sakai T, Pokatayev V, et al. Trafficking-Mediated STING Degradation Requires Sorting to Acidified Endolysosomes and Can Be Targeted to Enhance Anti-tumor Response. Cell Rep. 2017;21(11):3234-3242. doi:10.1016/j.celrep.2017.11.061

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol. 2005;5(12):953-964. doi:10.1038/nri1733

Gordon, S. (2007) The macrophage: past, present and future. Eur J Immunol, 37 Suppl 1, S9- 17.

Gore AV, Pillay LM, Venero Galanternik M, Weinstein BM. The zebrafish: A fintastic model for hematopoietic development and disease. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2018;7(3):e312. doi:10.1002/wdev.312

Gramatzki D, Dehler S, Rushing EJ, et al. Glioblastoma in the Canton of Zurich, Switzerland revisited: 2005 to 2009. Cancer. 2016;122(14):2206-2215. doi:10.1002/cncr.30023

Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, et al. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. Scand J Immunol. 2001;53(4):386-392. doi:10.1046/j.1365-3083.2001.00885.x

Gritz, E., and Hirschi, K.K. (2016). Specification and function of hemogenic endothelium during embryogenesis. Cell. Mol. Life Sci. 73, 1547–1567.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell. 2010;140(6):883-899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025

Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. Front Immunol. 2019;10:2759. Published 2019 Dec 13. doi:10.3389/fimmu.2019.02759

Guerra J, Valadao AL, Vlachakis D, Polak K, Vila IK, Taffoni C, et al. LysyltRNA synthetase produces diadenosine tetraphosphate to curb STINGdependent inflammation. Sci Adv (2020) 6:eaax3333. doi: 10.1126/ sciadv.aax3333

Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. Nat Rev Immunol. 2014;14(8):571-578. doi:10.1038/nri3712

Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. J. Exp. Med. 210, 1977–1992.

Gulen MF, Koch U, Haag SM, Schuler F, Apetoh L, Villunger A, Radtke F, Ablasser A Nat Commun. 2017 Sep 5; 8(1):427.

Guo H, König R, Deng M, et al. NLRX1 Sequesters STING to Negatively Regulate the Interferon Response, Thereby Facilitating the Replication of HIV-1 and DNA Viruses. Cell Host Microbe. 2016;19(4):515-528. doi:10.1016/j.chom.2016.03.001

Gusyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: From subclassification to novel treatment options. Semin Cancer Biol. 2018;51:50-58. doi:10.1016/j.semcancer.2017.11.010

Gutierrez A, Grebliunaite R, Feng H, et al. Pten mediates Myc oncogene dependence in a conditional zebrafish model of T cell acute lymphoblastic leukemia. J Exp Med. 2011;208(8):1595-1603. doi:10.1084/jem.20101691

Guyon J, Chapouly C, Andrique L, Bikfalvi A, Daubon T. The Normal and Brain Tumor Vasculature: Morphological and Functional Characteristics and Therapeutic Targeting. Front Physiol. 2021;12:622615. Published 2021 Mar 5. doi:10.3389/fphys.2021.622615

H

Haar CP, Hebbar P, Wallace GC 4th, et al. Drug resistance in glioblastoma: a mini review. Neurochem Res. 2012;37(6):1192-1200. doi:10.1007/s11064-011-0701-1

Halperin EC, Bentel G, Heinz ER, Burger PC. Radiation therapy treatment planning in supratentorial glioblastoma multiforme: an analysis based on post mortem topographic anatomy with CT correlations. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1989;17(6):1347-1350. doi:10.1016/0360-3016(89)90548-8

Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. Nat Neurosci. 2016;19(1):20-27. doi:10.1038/nn.4185

Hamilton L, Astell KR, Velikova G, Sieger D. A Zebrafish Live Imaging Model Reveals Differential Responses of Microglia Toward Glioblastoma Cells In Vivo. Zebrafish. 2016;13(6):523-534. doi:10.1089/zeb.2016.1339

Han C, Zhang C, Wang H, Zhao L. Exosome-mediated communication between tumor cells and tumor-associated macrophages: implications for tumor microenvironment. Oncoimmunology. 2021 Feb 22;10(1):1887552. doi: 10.1080/2162402X.2021.1887552. PMID: 33680573; PMCID: PMC7901554.

Han L, Yang Y, Yue X, et al. Inactivation of PI3K/AKT signaling inhibits glioma cell growth through modulation of β-catenin-mediated transcription. Brain Res. 2010;1366:9-17. doi:10.1016/j.brainres.2010.09.097

Hanna C, Kwok L, Finlay-Schultz J, Sartorius CA, Cittelly DM. Labeling of Breast Cancer Patient-derived Xenografts with Traceable Reporters for Tumor Growth and Metastasis Studies. J Vis Exp. 2016;(117):54944. Published 2016 Nov 30. doi:10.3791/54944

Harding SM, Benci JL, Irianto J, Discher DE, Minn AJ, Greenberg RA. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. Nature (2017) 548:466–70. doi: 10.1038/nature23470

Härtlova A, Erttmann SF, Raffi FA, Schmalz AM, Resch U, Anugula S, Lienenklaus S, Nilsson LM, Kröger A, Nilsson JA, Ek T, Weiss S, Gekara NO. DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. Immunity. 2015 Feb 17;42(2):332-343. doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.012. PMID: 25692705.

Hasegawa T, Venkata Suresh V, Yahata Y, et al. Inhibition of the CXCL9-CXCR3 axis suppresses the progression of experimental apical periodontitis by blocking macrophage migration and activation. Sci Rep. 2021;11(1):2613. Published 2021 Jan 28. doi:10.1038/s41598-021-82167-7

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. Immunity 38, 792–804.

Hason M, Bartůněk P. Zebrafish Models of Cancer-New Insights on Modeling Human Cancer in a Non-Mammalian Vertebrate. Genes (Basel). 2019;10(11):935. Published 2019 Nov 15. doi:10.3390/genes10110935

He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. Annu Rev Cell Dev Biol. 2009;25:377-406. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113248

He S, Tian Y, Feng S, et al. In vivo single-cell lineage tracing in zebrafish using high-resolution infrared laser-mediated gene induction microscopy. Elife. 2020;9:e52024. Published 2020 Jan 6. doi:10.7554/eLife.52024

H.D. Hemmati, I. Nakano, J.A. Lazareff, M. Masterman-Smith, D.H. Geschwind, M. Bronner-Fraser, H.I. Kornblum, Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100 (2003), pp. 15178-15183

Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. Development. 1999;126(17):3735-3745.

Herbomel P, Thisse B, Thisse C. Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina, and epidermis through a M-CSF receptor-dependent invasive process. Dev Biol. 2001;238(2):274-288. doi:10.1006/dbio.2001.0393

Hicks WH, Bird CE, Traylor JI, et al. Contemporary Mouse Models in Glioma Research. Cells. 2021;10(3):712. Published 2021 Mar 23. doi:10.3390/cells10030712

Hirayama D, Iida T, Nakase H. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. Int J Mol Sci. 2017;19(1):92. Published 2017 Dec 29. doi:10.3390/ijms19010092

Ho VK, Reijneveld JC, Enting RH, et al. Changing incidence and improved survival of gliomas. Eur J Cancer. 2014;50(13):2309-2318. doi:10.1016/j.ejca.2014.05.019

Hoffman R. Green fluorescent protein imaging of tumour growth, metastasis, and angiogenesis in mouse models. Lancet Oncol. 2002;3(9):546-556. doi:10.1016/s1470-2045(02)00848-3

Hoong BYD, Gan YH, Liu H, Chen ES. cGAS-STING pathway in oncogenesis and cancer therapeutics. Oncotarget. 2020;11(30):2930-2955. Published 2020 Jul 28. doi:10.18632/oncotarget.27673

Holland E.C., Hively W.P., DePinho R.A., Varmus H.E. A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. Genes Dev. 1998;12:3675–3685. doi: 10.1101/gad.12.23.3675.

Hopfner KP, Hornung V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling. Nat Rev Mol Cell Biol (2020) 21:501–21. doi: 10.1038/s41580-020-0244-x

Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1- activating inflammasome with ASC. Nature (2009) 458:514–8. doi: 10.1038/ nature07725

Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [published correction appears in Nature. 2014 Jan 9;505(7482):248. Cooper, James; Eliott, David; Mortimer, Beverly; Begum, Sharmin; Lloyd, Christine; Lanz, Christa; Raddatz, Günter; Schuster, Ste]. Nature. 2013;496(7446):498-503. doi:10.1038/nature12111

Hsu FM, Zhang S, Chen BP. Role of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in cancer development and treatment. Transl Cancer Res. 2012;1(1):22-34. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2012.04.01

Hu MM, Yang Q, Xie XQ, et al. Sumoylation Promotes the Stability of the DNA Sensor cGAS and the Adaptor STING to Regulate the Kinetics of Response to DNA Virus. Immunity. 2016;45(3):555-569. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.014

Huang, S., Van Arsdall, M., Tedjarati, S., McCarty, M., Wu, W., Langley, R., et al. (2002). Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. J. Natl. Cancer Inst. 94, 1134–1142. doi: 10.1093/jnci/94.15.1134

Hubert,C.G.;Rivera,M.;Spangler,L.C.;Wu,Q.;Mack,S.C.;Prager,B.C.;Couce,M.;McLendon,R.E.;Sloan,A.E.;Rich,J.N.A Three-Dimensional Organoid Culture System Derived from Human Glioblastomas Recapitulates the Hypoxic Gradients and Cancer Stem Cell Heterogeneity of Tumors Found In Vivo. Cancer Res. 2016, 76, 2465–2477.

Hughes R., Qian B.-Z., Rowan C., Muthana M., Keklikoglou I., Olson O.C., Tazzyman S., Danson S., Addison C., Clemons M., et al. Perivascular M2 Macrophages Stimulate Tumor Relapse after Chemotherapy. Cancer Res. 2015;75:3479–3491. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3587.

Huizer K., Sacchetti A., Dik W.A., Mustafa D.A., Kros J.M. Circulating proangiogenic cells and proteins in patients with glioma and acute myocardial infarction: Differences in neovascularization between neoplasia and tissue regeneration. J. Oncol. 2019;2019:3560830. doi: 10.1155/2019/3560830.

I

Iser IC, Lenz G, Wink MR. EMT-like process in glioblastomas and reactive astrocytes. Neurochem Int. 2019;122:139-143. doi:10.1016/j.neuint.2018.11.016

Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling [published correction appears in Nature. 2008 Nov 13;456(7219):274]. Nature. 2008;455(7213):674-678. doi:10.1038/nature07317

Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNAmediated, type I interferon-dependent innate immunity. Nature (2009) 461:788–92. doi: 10.1038/nature08476

Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. Nat Rev Immunol. 2014;14(1):36-49. doi:10.1038/nri3581

Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. Nat Immunol. 2015;16(4):343-353. doi:10.1038/ni.3123

J

Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., et al. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. Immunity 39, 599–610.

Jackson SP, MacDonald JJ, Lees-Miller S, Tjian R. GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. Cell. 1990;63:155–65

Jacob L, Sawma P, Garnier N, et al. Inhibition of PlexA1-mediated brain tumor growth and tumor-associated angiogenesis using a transmembrane domain targeting peptide. Oncotarget. 2016;7(36):57851-57865. doi:10.18632/oncotarget.11072

Jain, R.K.; Tong, R.T.; Munn, L.L. Effect of vascular normalization by antiangiogenic therapy on interstinal hypertension, peritumoral edema, and lymphatic metastasis: Insights from a mathematical model. Cancer Res. 2015, 67, 2729–2735.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 2002;20:197-216. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359

Jetten N, Roumans N, Gijbels MJ, et al. Wound administration of M2-polarized macrophages does not improve murine cutaneous healing responses. PLoS One. 2014;9(7):e102994. Published 2014 Jul 28. doi:10.1371/journal.pone.0102994

Jhaveri N, Chen TC, Hofman FM. Tumor vasculature and glioma stem cells: Contributions to glioma progression. Cancer Lett. 2016;380(2):545-551. doi:10.1016/j.canlet.2014.12.028

Jiang, M., Chen, P., Wang, L. et al. cGAS-STING, an important pathway in cancer immunotherapy. J Hematol Oncol 13, 81 (2020). https://doi.org/10.1186/s13045-020-00916-z

Jiang H, Xue X, Panda S, Kawale A, Hooy R, Liang F, et al. Chromatin-bound cGAS is an inhibitor of DNA repair and hence accelerates genome destabilization and cell death. EMBO J (2019) 38(21):e102718. doi: 10.15252/embj.2019102718

Jiang, M., Chen, P., Wang, L. et al. cGAS-STING, an important pathway in cancer immunotherapy. J Hematol Oncol 13, 81 (2020). https://doi.org/10.1186/s13045-020-00916-z

Jiang X, Kinch LN, Brautigam CA, Chen X, Du F, Grishin NV, et al. Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. Immunity (2012) 36:959–73. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.022

Jiang X, Huang Y, Wang X, et al. Dianhydrogalactitol, a potential multitarget agent, inhibits glioblastoma migration, invasion, and angiogenesis. Biomed Pharmacother. 2017;91:1065-1074. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.025

Jonsson KL, Laustsen A, Krapp C, Skipper KA, Thavachelvam K, Hotter D, et al. IFI16 is required for DNA sensing in human macrophages by promoting production and function of cGAMP. Nat Commun (2017) 8:14391. doi: 10.1038/ncomms14391

Ju B, Spitsbergen J, Eden CJ, Taylor MR, Chen W. Co-activation of hedgehog and AKT pathways promote tumorigenesis in zebrafish. Mol Cancer. 2009;8:40. Published 2009 Jun 25. doi:10.1186/1476-4598-8-40

Ju B, Chen W, Orr BA, et al. Oncogenic KRAS promotes malignant brain tumors in zebrafish. Mol Cancer. 2015;14(1):18. Published 2015 Feb 3. doi:10.1186/s12943-015-0288-2

Jung DW, Oh ES, Park SH, et al. A novel zebrafish human tumor xenograft model validated for anti-cancer drug screening. Mol Biosyst. 2012;8(7):1930-1939. doi:10.1039/c2mb05501e

Jung S, Unutmaz D, Wong P, et al. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. Immunity. 2002;17(2):211-220. doi:10.1016/s1074-7613(02)00365-5

K

Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. Science. 2020;367(6478):eaau6977. doi:10.1126/science.aau6977

Kane JR. The Role of Brain Vasculature in Glioblastoma. Mol Neurobiol. 2019;56(9):6645-6653. doi:10.1007/s12035-019-1561-y

Kanwar J.R., Kanwar R.K., Pandey S., Ching L.M., Krissansen G.W. Vascular attack by 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid combined with B7.1 (CD80)-mediated immunotherapy overcomes immune resistance and leads to the eradication of large tumors and multiple tumor foci. Cancer Res. 2001;61:1948–1956.

Kato K, Omura H, Ishitani R, Nureki O. Cyclic GMP-AMP as an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. Annu Rev Biochem. 2017;86:541-566. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044813

Karpova AY, Trost M, Murray JM, Cantley LC, Howley PM. Interferon regulatory factor-3 is an in vivo target of DNA-PK. Proc Natl Acad Sci USA (2002) 99:2818–23. 10.1073/pnas.052713899

Kawai H, Arata N, Nakayasu H. Three-dimensional distribution of astrocytes in zebrafish spinal cord. Glia. 2001;36(3):406-413. doi:10.1002/glia.1126

Kawane K., Fukuyama H., Kondoh G., Takeda J., Ohsawa Y., Uchiyama Y., Nagata S. Requirement of DNase II for Definitive Erythropoiesis in the Mouse Fetal Liver. Science. 2001; 292:1546–1549. doi: 10.1126/science.292.5521.1546.

Kawasaki T, Kawai T, Akira S. Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. Immunol Rev (2011) 243(1):61–73. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01048.x

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. Physiol Rev. 2011;91(2):461-553. doi:10.1152/physrev.00011.2010

Kim C, Wang XD, Yu Y. PARP1 inhibitors trigger innate immunity via PARP1 trapping-induced DNA damage response. Elife (2020) 9. 10.7554/eLife.60637

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev Dyn. 1995;203(3):253-310. doi:10.1002/aja.1002030302

Kissa K, Herbomel P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. Nature. 2010;464(7285):112-115. doi:10.1038/nature08761

Klarquist J, Hennies CM, Lehn MA, et al. STING-mediated DNA sensing promotes antitumor and autoimmune responses to dying cells. J Immunol 2014 ; 193 : 6124–6134.

Klug F., Prakash H., Huber P.E., Seibel T., Bender N., Halama N., Pfirschke C., Voss R.H., Timke C., Umansky L., et al. Low-Dose Irradiation Programs Macrophage Differentiation to an INOS+/M1 Phenotype That Orchestrates Effective T Cell Immunotherapy. Cancer Cell. 2013;24:589–602. doi: 10.1016/j.ccr.2013.09.014.

Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem cell division. Cell. 2008;132(4):583-597. doi:10.1016/j.cell.2008.02.007

Konantz M, Balci TB, Hartwig UF, et al. Zebrafish xenografts as a tool for in vivo studies on human cancer. Ann N Y Acad Sci. 2012;1266:124-137. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06575.x

Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, et al. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(8):2969-2974. doi:10.1073/pnas.1222694110

Konno H, Konno K, Barber GN. Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling. Cell. 2013;155(3):688-698. doi:10.1016/j.cell.2013.09.049

Konno H, Yamauchi S, Berglund A, Putney RM, Mulé JJ, Barber GN. Suppression of STING signaling through epigenetic silencing and missense mutation impedes DNA damage mediated cytokine production. Oncogene. 2018; 37:2037–2051. 10.1038/s41388-017-0120-0.

Kopitar-Jerala N. The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. Front Immunol. 2017;8:873. Published 2017 Jul 25. doi:10.3389/fimmu.2017.00873

Kranzusch PJ, Lee AS, Berger JM, Doudna JA. Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. Cell Rep (2013) 3:1362–8. doi: 10.1016/j.celrep.2013.05.008

Kujirai T, Zierhut C, Takizawa Y, Kim R, Negishi L, Uruma N, et al. . Structural basis for the inhibition of cGAS by nucleosomes. Science (2020) 370:455–8. 10.1126/science.abd0237

Kulahin N., Li S., Hinsby A., Kiselyov V., Berezin V., Bock E. Fibronectin type III (FN3) modules of the neuronal cell adhesion molecule L1 interact directly with the fibroblast growth factor (FGF) receptor. Mol. Cell Neurosci. 2008;37:528–536. doi: 10.1016/j.mcn.2007.12.001

Kwon J, Bakhoum SF. The Cytosolic DNA-Sensing cGAS-STING Pathway in Cancer. Cancer Discov. 2020;10(1):26-39. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0761

L

Lahaye X, Satoh T, Gentili M, Cerboni S, Conrad C, Hurbain I, El Marjou A, Lacabaratz C, Lelièvre JD, Manel N. The capsids of HIV-1 and HIV-2 determine immune detection of the viral cDNA by the innate sensor

cGAS in dendritic cells. Immunity. 2013 Dec 12;39(6):1132-42. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.002. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24269171.

Lai Y.-J., Tsai J.-C., Tseng Y.-T., Wu M.-S., Liu W.-S., Lam H.-I., Yu J.-H., Nozell S.E., Benveniste E.N. Small G protein Rac GTPases regulate the maintenance of glioblastoma stem-like cells in *vitro* and in vivo. Oncotarget. 2017;8:18031–18049. doi: 10.18632/oncotarget.14949

Lal S, La Du J, Tanguay RL, Greenwood JA. Calpain 2 is required for the invasion of glioblastoma cells in the zebrafish brain microenvironment. J Neurosci Res. 2012;90(4):769-781. doi:10.1002/jnr.22794

Lally BE, Geiger GA, Kridel S, et al. Identification and biological evaluation of a novel and potent small molecule radiation sensitizer via an unbiased screen of a chemical library. Cancer Res. 2007;67(18):8791-8799. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0477

Lam E, Stein S, Falck-Pedersen E. Adenovirus detection by the cGAS/STING/TBK1 DNA sensing cascade. J Virol. 2014 Jan;88(2):974-81. doi: 10.1128/JVI.02702-13. Epub 2013 Nov 6. PMID: 24198409; PMCID: PMC3911663.

Lan T, Zhao Z, Qu Y, et al. Targeting hyperactivated DNA-PKcs by KU0060648 inhibits glioma progression and enhances temozolomide therapy via suppression of AKT signaling. Oncotarget. 2016;7(34):55555-55571. doi:10.18632/oncotarget.10864

Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Nature. 2013;501(7467):373-379. doi:10.1038/nature12517

Langenau DM, Traver D, Ferrando AA, et al. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. Science. 2003;299(5608):887-890. doi:10.1126/science.1080280

Langheinrich U, Hennen E, Stott G, Vacun G. Zebrafish as a model organism for the identification and characterization of drugs and genes affecting p53 signaling. Curr Biol. 2002;12(23):2023-2028. doi:10.1016/s0960-9822(02)01319-2

Lapointe, S., Perry, A. & Butowski, N. A. Primary brain tumours in adults. Lancet 392, 432– 446 (2018).

Lara P.N., Douillard J.Y., Nakagawa K., Von Pawel J., McKeage M.J., Albert I., Losonczy G., Reck M., Heo D.S., Fan X., et al. Randomized phase III placebo-controlled trial of carboplatin and paclitaxel with or without the vascular disrupting agent vadimezan (ASA404) in advanced non-small-cell lung cancer. J. Clin. Oncol. 2011 doi: 10.1200/JCO.2011.35.0660

Larkin B, Ilyukha V, Sorokin M, Buzdin A, Vannier E, Poltorak A. Cutting Edge: Activation of STING in T Cells Induces Type I IFN Responses and Cell Death. J Immunol. 2017;199(2):397-402. doi:10.4049/jimmunol.1601999

Lau L, Gray EE, Brunette RL, et al. DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway. Science 2015 ; 350 : 568–571.

Lawson ND, Weinstein BM. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. Dev Biol. 2002;248(2):307-318. doi:10.1006/dbio.2002.0711

Leblond MM, Pérès EA, Helaine C, et al. M2 macrophages are more resistant than M1 macrophages following radiation therapy in the context of glioblastoma. Oncotarget. 2017;8(42):72597-72612. Published 2017 Aug 7. doi:10.18632/oncotarget.19994

Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. Cancer Cell. 2006;9(5):391-403. doi:10.1016/j.ccr.2006.03.030

Lees-Miller SP, Chen YR, Anderson CW. Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates simian virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen. Mol Cell Biol. 1990;10:6472–81

Lehtinen DA, Harvey S, Mulcahy MJ, Hollis T, Perrino FW. The TREX1 double-stranded DNA degradation activity is defective in dominant mutations associated with autoimmune disease. J Biol Chem. 2008;283(46):31649-31656. doi:10.1074/jbc.M806155200

Lemos H, et al. STING promotes the growth of tumors characterized by low antigenicity via IDO activation. Cancer Res. 2016;76(8):2076–2081.

Lemos H, Ou R, McCardle C, et al. Overcoming resistance to STING agonist therapy to incite durable protective antitumor immunity. J Immunother Cancer. 2020;8(2):e001182. doi:10.1136/jitc-2020-001182
Le Naour J, Zitvogel L, Galluzzi L, Vacchelli E, Kroemer G. Trial watch: STING agonists in cancer therapy. Oncoimmunology. 2020;9(1):1777624. Published 2020 Jun 16. doi:10.1080/2162402X.2020.1777624

Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Sep;3(9):651-62. doi: 10.1038/nrm909. PMID: 12209125

Li D, Li XP, Wang HX, et al. VEGF induces angiogenesis in a zebrafish embryo glioma model established by transplantation of human glioma cells. Oncol Rep. 2012;28(3):937-942. doi:10.3892/or.2012.1861

Li T, Cheng H, Yuan H, et al. Antitumor activity of cGAMP via stimulation of cGAS-cGAMP-STING-IRF3 mediated innate immune response. Sci Rep 2016 ; 6 :

Li W, Graeber MB. The molecular profile of microglia under the influence of glioma. Neuro Oncol. 2012;14(8):958-978. doi:10.1093/neuonc/nos116

Li X, Shu C, Yi G, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization. Immunity. 2013;39(6):1019-1031. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.019

Li Y, James SJ, Wyllie DH, Wynne C, Czibula A, Bukhari A, et al. TMEM203 is a binding partner and regulator of STING-mediated inflammatory signaling in macrophages. Proc Natl Acad Sci USA (2019) 116:16479–88. doi: 10.1073/pnas.1901090116 19049.

Li Z, Liu G, Sun L, et al. PPM1A regulates antiviral signaling by antagonizing TBK1-mediated STING phosphorylation and aggregation. PLoS Pathog. 2015;11(3):e1004783. Published 2015 Mar 27. doi:10.1371/journal.ppat.1004783

Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC and Layton JE . (2001). Blood, 98, 3087–3096.

Lin, E. Y., Li, J. F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik D. A., et al. (2006). Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. Cancer Res. 66, 11238–11246. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1278

Lin J., Zhang W., Zhao J.-J., Kwart A.H., Yang C., Ma D., Ren X., Tai Y.-T., Anderson K.C., Handin R.I., et al. A clinically relevant in vivo zebrafish model of human multiple myeloma to study preclinical therapeutic efficacy. Blood. 2016;128:249–252. doi: 10.1182/blood-2016-03-704460.

Liang H, Deng L, Hou Y, Meng X, Huang X, Rao E, et al. Host STING-dependent MDSC mobilization drives extrinsic radiation resistance. Nat Commun (2017) 8:1736. doi: 10.1038/s41467-017-01566-5

Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? [published correction appears in Trends Biochem Sci. 2016 Mar;41(3):287] [published correction appears in Trends Biochem Sci. 2016 Mar;41(3):287]. Trends Biochem Sci. 2016;41(3):211-218. doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001

Liu D, Wu H, Wang C, et al. STING directly activates autophagy to tune the innate immune response. Cell Death Differ. 2019;26(9):1735-1749. doi:10.1038/s41418-018-0251-z

Liu H, Zhang H, Wu X, Ma D, Wu J, Wang L, et al. Nuclear cGAS suppresses DNA repair and promotes tumorigenesis. Nature (2018) 563:131–6. doi: 10.1038/s41586-018-0629-6

Liu, X., Chen, X., Shi, L. et al. The third-generation EGFR inhibitor AZD9291 overcomes primary resistance by continuously blocking ERK signaling in glioblastoma. J Exp Clin Cancer Res 38, 219 (2019). https://doi.org/10.1186/s13046-019-1235-7

Liu X, et al. CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. Nat Med. 2015;21(10):1209–1215.

Liu XM, Zhang QP, Mu YG, Zhang XH, Sai K, Pang JCS, Ng HK, Chen ZP (2011) Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas. J Neuro-Oncol 105:173–179. https://doi.org/10. 1007/s11060-011-0578-5

Locarno CV, Simonelli M, Carenza C, Capucetti A, Stanzani E, Lorenzi E, Persico P, Della Bella S, Passoni L, Mavilio D, Bonecchi R, Locati M, Savino B. Role of myeloid cells in the immunosuppressive microenvironment in gliomas. Immunobiology. 2020 Jan;225(1):151853. doi: 10.1016/j.imbio.2019.10.002. Epub 2019 Oct 19. PMID: 31703822.

Louis DN, Perry A, Burger P, et al. International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. Brain Pathol. 2014;24(5):429-435. doi:10.1111/bpa.12171

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1

Luecke S, Holleufer A, Christensen MH, Jonsson KL, Boni GA, Sorensen LK, et al. cGAS is activated by DNA in a length-dependent manner. EMBO Rep (2017) 18:1707–15. doi: 10.15252/embr.201744017

Liu W.B., Xu G.L., Jia W.D., Li J.S., Ma J.L., Chen K., Wang Z.H., Ge Y.S., Ren W.H., Yu J.H., et al. Prognostic significance and mechanisms of patterned matrix vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma. Med. Oncol. 2011;28:S228–S238. doi: 10.1007/s12032-010-9706-x.

Liu X.M., Zhang Q.P., Mu Y.G., Zhang X.H., Sai K., Pang J.C., Ng H.K., Chen Z.P. Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas. J. Neuro Oncol. 2011;105:173–179. doi: 10.1007/s11060-011-0578-5

M

Ma J, Chen CC, Li M. Macrophages/Microglia in the Glioblastoma Tumor Microenvironment. Int J Mol Sci. 2021;22(11):5775. Published 2021 May 28. doi:10.3390/ijms22115775

Mackenzie KJ, Carroll P, Martin CA, Murina O, Fluteau A, Simpson DJ, et al. cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. Nature (2017) 548:461–5. doi: 10.1038/nature23449

Maeß MB, Wittig B, Cignarella A, Lorkowski S. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. J Immunol Methods. 2014;402(1-2):76-81. doi:10.1016/j.jim.2013.11.006

Maeda A, Digifico E, Andon FT, Mantovani A, Allavena P. Poly(I:C) stimulation is superior than Imiquimod to induce the antitumoral functional profile of tumor-conditioned macrophages. Eur J Immunol. 2019;49(5):801-811. doi:10.1002/eji.201847888

Maes W, Van Gool SW. Experimental immunotherapy for malignant glioma: lessons from two decades of research in the GL261 model. Cancer Immunol Immunother. 2011;60(2):153-160. doi:10.1007/s00262-010-0946-6

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol. 2002;23(11):549-555. doi:10.1016/s1471-4906(02)02302-5

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. 2004;25(12):677-686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015

Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. Immunity. 2005;23(4):344-346. doi:10.1016/j.immuni.2005.10.001

Mantovani A, Germano G, Marchesi F, Locatelli M, SK. Cancer promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. Eur J Immunol 2011;41:2522–5.

Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. J Pathol 2013;229:176–85.

Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. Nat Rev Clin Oncol. 2017;14(7):399-416. doi:10.1038/nrclinonc.2016.217

Marcus A, Mao AJ, Lensink-Vasan M, Wang L, Vance RE, Raulet DH. Tumor-Derived cGAMP Triggers a STING-Mediated Interferon Response in Non-tumor Cells to Activate the NK Cell Response. Immunity. 2018 Oct 16;49(4):754-763.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2018.09.016. PMID: 30332631; PMCID: PMC6488306.

Margolis SR, Wilson SC, Vance RE. Evolutionary Origins of cGAS-STING Signaling. Trends Immunol. 2017;38(10):733-743. doi:10.1016/j.it.2017.03.004

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. Front Biosci. 2008;13:453-461. Published 2008 Jan 1. doi:10.2741/2692

Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep. 2014;6:13. Published 2014 Mar 3. doi:10.12703/P6-13

Masoud G.N., Li W. HIF-1a pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. Acta Pharm. Sin. B. 2015;5:378–389. doi: 10.1016/j.apsb.2015.05.007

Mayrhofer M, Gourain V, Reischl M, et al. A novel brain tumour model in zebrafish reveals the role of YAP activation in MAPK- and PI3K-induced malignant growth. Dis Model Mech. 2017;10(1):15-28. doi:10.1242/dmm.026500

Medvinsky, A., Dzierzak, E., Ridgeway, T., and Hill, M. (1996). Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region. 86, 1–10.

Medvinsky, A., Rybtsov, S., and Taoudi, S. (2011). Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. Development 138, 1017–1031.

Mercurio L, Ajmone-Cat MA, Cecchetti S, et al. Targeting CXCR4 by a selective peptide antagonist modulates tumor microenvironment and microglia reactivity in a human glioblastoma model. J Exp Clin Cancer Res. 2016;35:55. Published 2016 Mar 25. doi:10.1186/s13046-016-0326-y

Metchnikoff E. L'immunité dans les maladies infectieuses. Semaine médicale, 1892, 12 (59), pp.469-474. ⟨pasteur-00738426⟩

Michalski S, de Oliveira Mann CC, Stafford CA, Witte G, Bartho J, Lammens K, et al. . Structural basis for sequestration and autoinhibition of cGAS by chromatin. Nature (2020) 587:6780–82. 10.1038/s41586-020-2748-0

Mikkola, H.K. a, and Orkin, S.H. (2006). The journey of developing hematopoietic stem cells. Development 133, 3733–3744.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. J Immunol. 2000;164(12):6166-6173. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166

Morchikh M, Cribier A, Raffel R, Amraoui S, Cau J, Severac D, et al. HEXIM1 and NEAT1 Long Non-coding RNA Form a Multi-subunit Complex that Regulates DNA-Mediated Innate Immune Response. Mol Cell (2017) 67:387–399 e5. 10.1016/j.molcel.2017.06.020

Moschetta M., Mishima Y., Sahin I., Manier S., Glavey S., Vacca A., Roccaro A.M., Ghobrial I.M. Role of endothelial progenitor cells in cancer progression. Bioch. Bioph. Acta. 2014;1846:26–39. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.03.005

Mosser DM. The many faces of macrophage activation. J Leukoc Biol. 2003;73(2):209-212. doi:10.1189/jlb.0602325

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation [published correction appears in Nat Rev Immunol.2010 Jun;10(6):460]. Nat Rev Immunol. 2008;8(12):958-969. doi:10.1038/nri2448

Mukai K, Konno H, Akiba T, Uemura T, Waguri S, Kobayashi T, Barber GN, Arai H, Taguchi T. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. Nat Commun. 2016 Jun 21;7:11932. doi: 10.1038/ncomms11932. PMID: 27324217; PMCID: PMC4919521.

Mukherjee B, McEllin B, Camacho CV, Tomimatsu N, Sirasanagandala S, Nannepaga S, Hatanpaa KJ, Mickey B, Madden C, Maher E, Boothman DA, Furnari F, Cavenee WK, Bachoo RM, Burma S Cancer Res. 2009 May 15; 69(10):4252-9.

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity. 2014;41(1):14-20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008

N

Nicoli S, Ribatti D, Cotelli F, Presta M. Mammalian tumor xenografts induce neovascularization in zebrafish embryos. Cancer Res. 2007;67(7):2927-2931. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4268

Nagai A, Nakagawa E, Hatori K, et al. Generation and characterization of immortalized human microglial cell lines: expression of cytokines and chemokines. Neurobiol Dis. 2001;8(6):1057-1068. doi:10.1006/nbdi.2001.0437

Nguyen-Chi M, Laplace-Builhe B, Travnickova J, et al. Identification of polarized macrophage subsets in zebrafish. Elife. 2015;4:e07288. Published 2015 Jul 8. doi:10.7554/eLife.07288

Nie W, Wu G, Zhang J, et al. Responsive Exosome Nano-bioconjugates for Synergistic Cancer Therapy. Angew Chem Int Ed Engl. 2020;59(5):2018-2022. doi:10.1002/anie.201912524

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science. 2005;308(5726):1314-1318. doi:10.1126/science.1110647

Novoa B, Figueras A. Zebrafish: model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases. Adv Exp Med Biol. 2012;946:253-275. doi:10.1007/978-1-4614-0106-3_15

Noorbakhsh A, Tang JA, Marcus LP, *et al.* Gross-total resection outcomes in an elderly population with glioblastoma: a SEER-based analysis. J Neurosurg. 2014;120:31-39.

Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy [published correction appears in Immunity. 2014 Nov 20;41(5):866]. Immunity. 2014;41(1):49-61. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.010

O

Obermajer N, Muthuswamy R, Odunsi K, Edwards RP, Kalinski P. PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. Cancer Res. 2011;71(24):7463-7470. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2449

Oh T., Fakurnejad S., Sayegh E.T., Clark A.J., Ivan M.E., Sun M.Z., Safaee M., Bloch O., James C.D., Parsa A.T. Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. J. Transl. Med. 2014;12:107. doi: 10.1186/1479-5876-12-107

Ohkuri T, Ghosh A, Kosaka A, et al. STING contributes to antiglioma immunity via triggering type I IFN signals in the tumor microenvironment. Cancer Immunol Res. 2014;2(12):1199-1208. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0099

Ohkuri T, Kosaka A, Ishibashi K, Kumai T, Hirata Y, Ohara K, et al. Intratumoral administration of cGAMP transiently accumulates potent macrophages for anti-tumor immunity at a mouse tumor site. Cancer Immunol Immunother (2017) 66:705–16. doi: 10.1007/s00262-017-1975-1

Okude H, Ori D, Kawai T. Signaling Through Nucleic Acid Sensors and Their Roles in Inflammatory Diseases. Front Immunol. 2021;11:625833. Published 2021 Jan 28. doi:10.3389/fimmu.2020.625833

Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. Neuro Oncol. 2014;16(7):896-913. doi:10.1093/neuonc/nou087

Ostrom, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. Neuro. Oncol. 19, v1–v88 (2017).

Ostrom, Q. T., Cote, D. J., Ascha, M., Kruchko, C. & Barnholtz-Sloan, J. S. Adult glioma incidence and survival by race or ethnicity in the United States From 2000 to 2014. JAMA Oncol. 4, 1254 (2018)..

Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2013-2017. Neuro Oncol. 2020;22(12 Suppl 2):iv1-iv96. doi:10.1093/neuonc/noaa200

P

Padovan E, Spagnoli GC, Ferrantini M, Heberer M. IFN-alpha2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8+ effector T cells. J Leukoc Biol(2002) 71:669–76. doi: 10.1189/jlb.71.4.669

Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. Development 126, 5073– 5084.

Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;7(1):a016246. Published 2014 Oct 9. doi:10.1101/cshperspect.a016246

Paolillo M, Comincini S, Schinelli S. In *Vitro* Glioblastoma Models: A Journey into the Third Dimension. Cancers. 2021; 13(10):2449. https://doi.org/10.3390/cancers13102449

Papadavid E, Stratigos AJ, Falagas ME. Imiquimod: an immune response modifier in the treatment of precancerous skin lesions and skin cancer. Expert Opin Pharmacother. 2007;8(11):1743-1755. doi:10.1517/14656566.8.11.1743

Pardoll, D. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 12, 252–264 (2012). https://doi.org/10.1038/nrc3239

Park, Joon-Hyung (2015) *Mécanisme de production des cassures double-brin de l'ADN lors de la transcription en réponse à la camptothécine*. Thèse d'exercice en Thèses > Pharmacie, Université Toulouse III - Paul Sabatier.

Pathare GR, Decout A, Gluck S, Cavadini S, Makasheva K, Hovius R, et al. . Structural mechanism of cGAS inhibition by the nucleosome. Nature (2020) 587:668–72. 10.1038/s41586-020-2750-6

Paul, C.D., Devine, A., Bishop, K. et al. Human macrophages survive and adopt activated genotypes in living zebrafish. Sci Rep 9, 1759 (2019). https://doi.org/10.1038/s41598-018-38186-y

Peng J, Tsang JY, Ho DH, et al. Modulatory effects of adiponectin on the polarization of tumor-associated macrophages. Int J Cancer. 2015;137(4):848-858. doi:10.1002/ijc.29485

Pépin G, Nejad C, Thomas BJ, et al. Activation of cGAS-dependent antiviral responses by DNA intercalating agents. Nucleic Acids Res. 2017;45(1):198-205. doi:10.1093/nar/gkw878

Pepin G, De Nardo D, Rootes CL, Ullah TR, Al-Asmari SS, Balka KR, et al. Connexin-Dependent Transfer of cGAMP to Phagocytes Modulates Antiviral Responses. mBio (2020) 11. doi: 10.1128/mBio.03187-19

Peranzoni E, Lemoine J, Vimeux L, et al. Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(17):E4041-E4050. doi:10.1073/pnas.1720948115

Peri F, Nüsslein-Volhard C. Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in phagosomal fusion in *vivo*. Cell. 2008;133(5):916-927. doi:10.1016/j.cell.2008.04.037

Pervushina O, Scheuerer B, Reiling N, et al. Platelet factor 4/CXCL4 induces phagocytosis and the generation of reactive oxygen metabolites in mononuclear phagocytes independently of Gi protein activation or intracellular calcium transients. J Immunol. 2004;173(3):2060-2067. doi:10.4049/jimmunol.173.3.2060

Perry A, Wesseling P. Histologic classification of gliomas. Handb Clin Neurol. 2016;134:71-95. doi:10.1016/B978-0-12-802997-8.00005-0

Piaggio F, Kondylis V, Pastorino F, et al. A novel liposomal Clodronate depletes tumor-associated macrophages in primary and metastatic melanoma: Anti-angiogenic and anti-tumor effects. J Control Release. 2016;223:165-177. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.037

Piao Y., Liang J., Holmes L., Henry V., Sulman E., de Groot J.F. Acquired resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma is associated with a mesenchymal transition. Clin. Cancer Res. 2013;19:4392–4403. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1557.

Pokatayev V, Yang K, Tu X, et al. Homeostatic regulation of STING protein at the resting state by stabilizer TOLLIP. Nat Immunol. 2020;21(2):158-167. doi:10.1038/s41590-019-0569-9

Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. Nat Rev Cancer. 2004;4(1):71-78. doi:10.1038/nrc1256

Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, et al. Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. Cell Stem Cell. 2009;4(6):568-580. doi:10.1016/j.stem.2009.03.014

Pombo Antunes AR, Scheyltjens I, Duerinck J, Neyns B, Movahedi K, Van Ginderachter JA. Understanding the glioblastoma immune microenvironment as basis for the development of new immunotherapeutic strategies. Elife. 2020;9:e52176. Published 2020 Feb 4. doi:10.7554/eLife.52176

Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. Clin Exp Immunol. 2005;142(3):481-489. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02934.x

Prabakaran T, Bodda C, Krapp C, et al. Attenuation of cGAS-STING signaling is mediated by a p62/SQSTM1-dependent autophagy pathway activated by TBK1. EMBO J. 2018;37(8):e97858. doi:10.15252/embj.201797858

Prionisti I, Bühler LH, Walker PR, Jolivet RB. Harnessing Microglia and Macrophages for the Treatment of Glioblastoma. Front Pharmacol. 2019;10:506. Published 2019 Jun 5. doi:10.3389/fphar.2019.00506

Pu F, Chen F, Liu J, Zhang Z, Shao Z. Immune Regulation of the cGAS-STING Signaling Pathway in the Tumor Microenvironment and Its Clinical Application. Onco Targets Ther. 2021;14:1501-1516. Published 2021 Mar 1. doi:10.2147/OTT.S298958

Pudelko L, Edwards S, Balan M, et al. An orthotopic glioblastoma animal model suitable for high-throughput screenings. Neuro Oncol. 2018;20(11):1475-1484. doi:10.1093/neuonc/noy071

Pudelko L, Rouhi P, Sanjiv K, et al. Glioblastoma and glioblastoma stem cells are dependent on functional MTH1 [published correction appears in Oncotarget. 2020 Feb 25;11(8):827]. Oncotarget. 2017;8(49):84671-84684. Published 2017 Jul 20. doi:10.18632/oncotarget.19404

Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. Nat Med. 2013;19(10):1264-1272. doi:10.1038/nm.3337

Q

Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. Cell. 2010;141(1):39-51. doi:10.1016/j.cell.2010.03.014

Quail DF, Bowman RL, Akkari L, et al. The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas. Science. 2016;352(6288):aad3018. doi:10.1126/science.aad3018

Quail DF, Joyce JA. Molecular Pathways: Deciphering Mechanisms of Resistance to Macrophage-Targeted Therapies. Clin Cancer Res. 2017;23(4):876-884. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0133

Quiñonez-Silvero C, Hübner K, Herzog W. Development of the brain vasculature and the blood-brain barrier in zebrafish. Dev Biol. 2020;457(2):181-190. doi:10.1016/j.ydbio.2019.03.005

R

Raaby Gammelgaard K, Sandfeld-Paulsen B, Godsk SH, et al. cGAS-STING pathway expression as a prognostic tool in NSCLC. Transl Lung Cancer Res. 2021;10(1):340-354. doi:10.21037/tlcr-20-524

Ranoa DRE, Widau RC, Mallon S, et al. STING Promotes Homeostasis via Regulation of Cell Proliferation and Chromosomal Stability. Cancer Res. 2019;79(7):1465-1479. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1972

Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. Front Immunol. 2014;5:532. Published 2014 Oct 27. doi:10.3389/fimmu.2014.00532

Reifenberger, G., Collins, V.P. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. J Mol Med 82, 656–670 (2004). https://doi.org/10.1007/s00109-004-0564-x

Reimunde P, Pensado-López A, Carreira Crende M, et al. Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Glioblastoma and Zebrafish Models for the Discovery of New Treatments. Cancers (Basel). 2021;13(5):1087. Published 2021 Mar 3. doi:10.3390/cancers13051087

Renaud O, Herbomel P, Kissa K. Studying cell behavior in whole zebrafish embryos by confocal live imaging: application to hematopoietic stem cells. Nat Protoc. 2011;6(12):1897-1904. Published 2011 Nov 10. doi:10.1038/nprot.2011.408

Renshaw SA, Trede NS. A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. Dis Model Mech. 2012;5(1):38-47. doi:10.1242/dmm.007138

Reuss DE, Kratz A, Sahm F, . Adult IDH wild type astrocytomas biologically and clinically resolve into other tumor entities. Acta Neuropathol 2015;130:407–17. [Medline]

Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, . IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival : a grading problem for WHO. Acta Neuropathol 2015;129:867–73.

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;5:75. Published 2014 Mar 5. doi:10.3389/fphys.2014.00075

Richmond et al. 2008. : Richmond A., Su Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. Dis. Model. Mech. 2008;1:78–82. doi: 10.1242/dmm.000976.

Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. Neurotoxicol Teratol. 2011;33(6):608-617. doi:10.1016/j.ntt.2011.07.007

Ries C.H., Cannarile M.A., Hoves S., Benz J., Wartha K., Runza V., Rey-Giraud F., Pradel L.P., Feuerhake F., Klaman I., et al. Targeting Tumor-Associated Macrophages with Anti-CSF-1R Antibody Reveals a Strategy for Cancer Therapy. Cancer Cell. 2014;25:846–859. doi: 10.1016/j.ccr.2014.05.016.

Riera Romo M, Pérez-Martínez D, Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview. Immunology. 2016;148(2):125-139. doi:10.1111/imm.12597

Rivera LB, Bergers G. CANCER. Tumor angiogenesis, from foe to friend. Science. 2015;349(6249):694-695. doi:10.1126/science.aad0862

Robertson FL, Marqués-Torrejón MA, Morrison GM, Pollard SM. Experimental models and tools to tackle glioblastoma. Dis Model Mech. 2019 Sep 6;12(9):dmm040386. doi: 10.1242/dmm.040386. PMID: 31519690; PMCID: PMC6765190.

Roesch S, Rapp C, Dettling S, Herold-Mende C. When Immune Cells Turn Bad-Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. Int J Mol Sci. 2018;19(2):436. Published 2018 Feb 1. doi:10.3390/ijms19020436

Rongvaux A, Jackson R, Harman CC, Li T, West AP, de Zoete MR, et al. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. Cell (2014) 159:1563–77. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.037

Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. Nat Rev Immunol. 2007;7(2):105-117. doi:10.1038/nri2024

Rosińska S, Gavard J. Tumor Vessels Fuel the Fire in Glioblastoma. Int J Mol Sci. 2021;22(12):6514. Published 2021 Jun 17. doi:10.3390/ijms22126514

Royet A, Broutier L, Coissieux MM, et al. Ephrin-B3 supports glioblastoma growth by inhibiting apoptosis induced by the dependence receptor EphA4. Oncotarget. 2017;8(14):23750-23759. doi:10.18632/oncotarget.16077

Ruivo CF, Adem B, Silva M, Melo SA. The Biology of Cancer Exosomes: Insights and New Perspectives. Cancer Res. 2017;77(23):6480-6488. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0994

S

Saeed A, Ruan X, Guan H, Su J, Ouyang S. Regulation of cGAS-Mediated Immune Responses and Immunotherapy. Adv Sci (Weinh) (2020) 7:1902599. doi: 10.1002/advs.201902599

Saleem S, Kannan RR. Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery [published correction appears in Cell Death Discov. 2019 Jul 10;5:116]. Cell Death Discov. 2018;4:45. Published 2018 Oct 3. doi:10.1038/s41420-018-0109-7

Sawyer, R.T., Strausbauch, P.H., and Volkman, A. (1982). Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. Lab. Invest. 46, 165–170.

Saydé T, El Hamoui O, Alies B, Gaudin K, Lespes G, Battu S. Biomaterials for Three-Dimensional Cell Culture: From Applications in Oncology to Nanotechnology. Nanomaterials (Basel). 2021;11(2):481. Published 2021 Feb 13. doi:10.3390/nano11020481

Schadt L, Sparano C, Schweiger NA, Silina K, Cecconi V, Lucchiari G, et al. Cancer-Cell-Intrinsic cGAS Expression Mediates Tumor Immunogenicity. Cell Rep (2019) 29:1236–1248 e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.09.065

Schaffenrath J, Wyss T, He L, et al. Blood-brain barrier alterations in human brain tumors revealed by genome-wide transcriptomic profiling [published online ahead of print, 2021 Feb 9]. Neuro Oncol. 2021;noab022. doi:10.1093/neuonc/noab022

Scheurer ME, Etzel CJ, Liu M, et al. Familial aggregation of glioma: a pooled analysis. Am J Epidemiol. 2010; 172: 1099- 1107.

Schmidt R, Strähle U, Scholpp S. Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult. Neural Dev. 2013;8:3. Published 2013 Feb 21. doi:10.1186/1749-8104-8-3

Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. Annu Rev Immunol. 2014;32:513-545. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231

Schoonen PM, Kok YP, Wierenga E, Bakker B, Foijer F, Spierings DCJ, et al. . Premature mitotic entry induced by ATR inhibition potentiates olaparib inhibition-mediated genomic instability, inflammatory signaling, and cytotoxicity in BRCA2-deficient cancer cells. Mol Oncol (2019) 13:2422–40. 10.1002/1878-0261.12573

Schreiber-Agus N, Horner J, Torres R, Chiu FC, DePinho RA. Zebra fish myc family and max genes: differential expression and oncogenic activity throughout vertebrate evolution. Mol Cell Biol. 1993;13(5):2765-2775. doi:10.1128/mcb.13.5.2765-2775.1993

Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E., Pollard, J.W., et al. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. Science 336, 86–90.

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

Sen T, Rodriguez BL, Chen L, Corte CMD, Morikawa N, Fujimoto J, et al. . Targeting DNA Damage Response Promotes Antitumor Immunity through STING-Mediated T-cell Activation in Small Cell Lung Cancer. Cancer Discov (2019) 9:646–61. 10.1158/2159-8290.CD-18-1020

Shang G, Zhang C, Chen ZJ, Bai XC, Zhang X. Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP-AMP. Nature. 2019;567(7748):389-393. doi:10.1038/s41586-019-0998-5

Sharif H, Li Y, Dong Y, Dong L, Wang WL, Mao Y, Wu H. Cryo-EM structure of the DNA-PK holoenzyme. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Jul 11;114(28):7367-7372. doi: 10.1073/pnas.1707386114. Epub 2017 Jun 26. PMID: 28652322; PMCID: PMC5514765.

Shao CJ, Fu J, Shi HL, et al. Activities of DNA-PK and Ku86, but not Ku70, may predict sensitivity to cisplatin in human gliomas. J Neurooncol. 2008;89:27–35.

Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. Cell (2017) 168:707–23. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.017

Shen YJ, Le Bert N, Chitre AA, et al. Genome-derived cytosolic DNA mediates type I interferon-dependent rejection of B cell lymphoma cells. Cell Rep. 2015;11(3):460-473. doi:10.1016/j.celrep.2015.03.041

Sheng H, Huang Y, Xiao Y, Zhu Z, Shen M, Zhou P, et al. . ATR inhibitor AZD6738 enhances the antitumor activity of radiotherapy and immune checkpoint inhibitors by potentiating the tumor immune microenvironment in hepatocellular carcinoma. J Immunother Cancer (2020) 8. 10.1136/jitc-2019-000340

Shete, S. et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma.
Nat. Genet. 41, 899–904 (2009).

Shin J, Padmanabhan A, de Groh ED, et al. Zebrafish neurofibromatosis type 1 genes have redundant functions in tumorigenesis and embryonic development. Dis Model Mech. 2012;5(6):881-894. doi:10.1242/dmm.009779

Shin J, Mishra V, Glasgow E, et al. PRAJA is overexpressed in glioblastoma and contributes to neural precursor development [published correction appears in Genes Cancer. 2017 Sep;8(9-10):745]. Genes Cancer. 2017;8(7-8):640-649. doi:10.18632/genesandcancer.151

Shobaki N, Sato Y, Suzuki Y, Okabe N, Harashima H. Manipulating the function of tumor-associated macrophages by siRNA-loaded lipid nanoparticles for cancer immunotherapy. J Control Release. 2020;325:235–248. doi:10.1016/j.jconrel.2020.07.001.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in *vivo* veritas. J Clin Invest. 2012;122(3):787-795. doi:10.1172/JCI59643

Sieger D, Moritz C, Ziegenhals T, Prykhozhij S, Peri F. Long-range Ca2+ waves transmit brain-damage signals to microglia. Dev Cell. 2012;22(6):1138-1148. doi:10.1016/j.devcel.2012.04.012

S.K. Singh, I.D. Clarke, M. Terasaki, V.E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, P.B. Dirks, Identification of a cancer stem cell in human brain tumors, Cancer Res., 63 (2003), pp. 5821-5828

Song S, Peng P, Tang Z, Zhao J, Wu W, Li H, et al. Decreased expression of STING predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. Sci Rep (2017) 7:39858. doi: 10.1038/srep39858

Srikrishna G, Freeze HH. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. Neoplasia. 2009;11(7):615-628. doi:10.1593/neo.09284

Stafford JH, Hirai T, Deng L, et al. Colony stimulating factor 1 receptor inhibition delays recurrence of glioblastoma after radiation by altering myeloid cell recruitment and polarization. Neuro Oncol. 2016;18(6):797-806. doi:10.1093/neuonc/nov272

Stark GR, Darnell JE Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. Immunity. 2012 Apr 20;36(4):503-14. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.013. PMID: 22520844; PMCID: PMC3909993.

Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. J Exp Med. 1992;176(1):287-292. doi:10.1084/jem.176.1.287

Stern, H., Zon, L. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. Nat Rev Cancer 3, 533–539 (2003). https://doi.org/10.1038/nrc1126

Stoletov K, Montel V, Lester RD, Gonias SL, Klemke R. High-resolution imaging of the dynamic tumor cell vascular interface in transparent zebrafish. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(44):17406-17411. doi:10.1073/pnas.0703446104

Stoletov K, Klemke R. Catch of the day: zebrafish as a human cancer model. Oncogene. 2008;27(33):4509-4520. doi:10.1038/onc.2008.95

Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. J Leukoc Biol. 2004;76(3):509-513. doi:10.1189/jlb.0504272

Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. J Immunol. 2005;175(1):342-349. doi:10.4049/jimmunol.175.1.342

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med. 2005;352(10):987-996. doi:10.1056/NEJMoa043330

Sughrue ME, Yang I, Kane AJ, et al. Immunological considerations of modern animal models of malignant primary brain tumors. J Transl Med. 2009;7:84. Published 2009 Oct 8. doi:10.1186/1479-5876-7-84

Sui H, Zhou M, Imamichi H, Jiao X, Sherman BT, Lane HC, et al. . STING is an essential mediator of the Ku70-mediated production of IFN-lambda1 in response to exogenous DNA. Sci Signal (2017) 10:488. 10.1126/scisignal.aah5054

Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen Z. Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. Science (2013) 339(6121):786–91. doi: 10.1126/science.1232458

Sun H, Huang Y, Mei S, Xu F, Liu X, Zhao F, et al. A Nuclear Export Signal Is Required for cGAS to Sense Cytosolic DNA. Cell Rep (2021) 34:108586. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108586

Sun W, Li Y, Chen L, et al. ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(21):8653-8658. doi:10.1073/pnas.0900850106

Sun X, Liu T, Zhao J, Xia H, Xie J, Guo Y, et al. . DNA-PK deficiency potentiates cGAS-mediated antiviral innate immunity. Nat Commun (2020) 11:6182. 10.1038/s41467-020-19941-0

Svahn AJ, Graeber MB, Ellett F, et al. Development of ramified microglia from early macrophages in the zebrafish optic tectum. Dev Neurobiol. 2013;73(1):60-71. doi:10.1002/dneu.22039

T

Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. Nature (2007) 448:501–5. doi: 10.1038/nature06013

Takeya M., Komohara Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: Friend or foe? Pathol. Int. 2016;66:491–505. doi: 10.1111/pin.12440.
Bingle et al. 2002 ; Li et Graeber 2012

Tamimi AF, Juweid M. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, ed. Glioblastoma. Brisbane (AU): Codon Publications; September 27, 2017.

Tan, AC, Ashley, DM, López, GY, Malinzak, M, Friedman, HS, Khasraw, M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. CA Cancer J Clin. 2020: 70: 299- 312.

Tanaka Y, Chen ZJ. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. Sci Signal (2012) 5:ra20. doi: 10.1126/ scisignal.2002521

Tavian, M., Biasch, K., Sinka, L., Vallet, J., and Péault, B. (2010). Embryonic origin of human hematopoiesis. Int. J. Dev. Biol. 54, 1061–1065

Taylor AM, Zon LI. Zebrafish tumor assays: the state of transplantation. Zebrafish. 2009;6(4):339-346. doi:10.1089/zeb.2009.0607

Terriente J, Pujades C. Use of zebrafish embryos for small molecule screening related to cancer. Dev Dyn. 2013;242(2):97-107. doi:10.1002/dvdy.23912

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014;23(10):1985-1996. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0275

Thomas RP, Nagpal S, Iv M, et al. Macrophage Exclusion after Radiation Therapy (MERT): A First in Human Phase I/II Trial using a CXCR4 Inhibitor in Glioblastoma. Clin Cancer Res. 2019;25(23):6948-6957. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1421

Tsarouchas TM, Wehner D, Cavone L, et al. Dynamic control of proinflammatory cytokines Il-1β and Tnf-a by macrophages in zebrafish spinal cord regeneration. Nat Commun. 2018;9(1):4670. Published 2018 Nov 7. doi:10.1038/s41467-018-07036-w

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). Int J Cancer. 1980;26(2):171-176. doi:10.1002/ijc.2910260208

U

Umans RA, Ten Kate M, Pollock C, Sontheimer H. Fishing for Contact: Modeling Perivascular Glioma Invasion in the Zebrafish Brain. ACS Pharmacol Transl Sci. 2020;4(4):1295-1305. Published 2020 Dec 17. doi:10.1021/acsptsci.0c00129

Unver N. Macrophage chemoattractants secreted by cancer cells: Sculptors of the tumor microenvironment and another crucial piece of the cancer secretome as a therapeutic target. Cytokine Growth Factor Rev. 2019;50:13-18. doi:10.1016/j.cytogfr.2019.05.010

Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. Nat Immunol (2010) 11:997–1004. doi: 10.1038/ni.1932

V

Van Dalen FJ, van Stevendaal MHME, Fennemann FL, Verdoes M, Ilina O. Molecular Repolarisation of Tumour-Associated Macrophages. Molecules. 2018;24(1):9. Published 2018 Dec 20. doi:10.3390/molecules24010009

Van den Bossche J, Saraber DL. Metabolic regulation of macrophages in tissues. Cell Immunol. 2018;330:54-59. doi:10.1016/j.cellimm.2018.01.009

Van den Bossche WBL, Kleijn A, Teunissen CE, Voerman JSA, Teodosio C, Noske DP et al (2018) Oncolytic virotherapy in glioblastoma patients induces a tumor macrophage phenotypic shift leading to an altered glioblastoma microenvironment. Neuro Oncol 20(11):1494–1504

Van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. J. Exp. Med. 128, 415–435.

Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. CA Cancer J Clin. 2010;60(3):166-193. doi:10.3322/caac.20069

Vargas-Patron LA, Agudelo-Dueñas N, Madrid-Wolff J, et al. Xenotransplantation of Human glioblastoma in Zebrafish larvae: in *vivo* imaging and proliferation assessment. Biol Open. 2019;8(5):bio043257. Published 2019 May 13. doi:10.1242/bio.043257

Veinotte CJ, Dellaire G, Berman JN. Hooking the big one: the potential of zebrafish xenotransplantation to reform cancer drug screening in the genomic era. Dis Model Mech. 2014;7(7):745-754. doi:10.1242/dmm.015784

Vila IK, Chamma H, Steer A, Taffoni C, Reinert LS, Turtoi E, et al. Control of polyunsaturated fatty acids desaturation by Sting regulates inflammatory responses. bioRxiv (2020). doi: 10.1101/2020.12.22.423950

Vittori M, Motaln H, Turnšek TL. The study of glioma by xenotransplantation in zebrafish early life stages. J Histochem Cytochem. 2015;63(10):749-761. doi:10.1369/0022155415595670

Vittori M, Breznik B, Gredar T, Hrovat K, Bizjak Mali L, Lah TT. Imaging of human glioblastoma cells and their interactions with mesenchymal stem cells in the zebrafish (Danio rerio) embryonic brain. Radiol Oncol. 2016;50(2):159-167. Published 2016 Mar 26. doi:10.1515/raon-2016-0017

Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1863. Nutr Rev. 1989;47(1):23-25. doi:10.1111/j.1753-4887.1989.tb02747.x

Volkman, A., Chang, N.C., Strausbauch, P.H., and Morahan, P.S. (1983). Differential effects of chronic monocyte depletion on macrophage populations. Lab. Invest. 49, 291–298.

W

Walker DG, Chuah T, Rist MJ, Pender MP (2006) T-cell apoptosis in human glioblastoma multiforme: implications for immunotherapy. J Neuroimmunol 175(1–2):59–68

Walton EM, Cronan MR, Beerman RW, Tobin DM. The Macrophage-Specific Promoter mfap4 Allows Live, Long-Term Analysis of Macrophage Behavior during Mycobacterial Infection in Zebrafish. PLoS One. 2015;10(10):e0138949. Published 2015 Oct 7. doi:10.1371/journal.pone.0138949

Wang H, Hu S, Chen X, Shi H, Chen C, Sun L, et al. cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade. Proc Natl Acad Sci USA (2017) 114:1637–42. doi: 10.1073/pnas.1621363114

Wang L, Yang L, Wang C, Zhao W, Ju Z, Zhang W, et al. . Inhibition of the ATM/Chk2 axis promotes cGAS/STING signaling in ARID1A-deficient tumors. J Clin Invest (2020) 130:5951–66. 10.1172/JCI130445

Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells [published correction appears in Nat Rev Mol Cell Biol. 2011;13(1):12]. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011;12(10):643-655. Published 2011 Sep 2. doi:10.1038/nrm3184

Wang SC, Yu CF, Hong JH, Tsai CS, Chiang CS. Radiation therapy-induced tumor invasiveness is associated with SDF-1-regulated macrophage mobilization and vasculogenesis. PLoS One. 2013;8(8):e69182. Published 2013 Aug 5. doi:10.1371/journal.pone.0069182

Wang X, Majumdar T, Kessler P, Ozhegov E, Zhang Y, Chattopadhyay S, et al. STING Requires the Adaptor TRIF to Trigger Innate Immune Responses to Microbial Infection. Cell Host Microbe (2016) 20:329–41. doi: 10.1016/j.chom.2016.08.002

Wang, X., Lu, J., Guo, G. et al. Immunotherapy for recurrent glioblastoma: practical insights and challenging prospects. Cell Death Dis 12, 299 (2021). https://doi.org/10.1038/s41419-021-03568-0

Wang Y, Kaiser MS, Larson JD, et al. Moesin1 and Ve-cadherin are required in endothelial cells during in *vivo* tubulogenesis. Development. 2010;137(18):3119-3128. doi:10.1242/dev.048785

Wang Y, Lin YX, Qiao SL, An HW, Ma Y, Qiao ZY et al (2017) Polymeric nanoparticles promote macrophage reversal from M2 to M1 phenotypes in the tumor microenvironment. Biomaterials 112:153–163

Wassermann R, Gulen MF, Sala C, Perin SG, Lou Y, Rybniker J, Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Hornung V, Cole ST, Ablasser A. Mycobacterium tuberculosis Differentially Activates cGAS- and Inflammasome-Dependent Intracellular Immune Responses through ESX-1. Cell Host Microbe. 2015 Jun 10;17(6):799-810. doi: 10.1016/j.chom.2015.05.003. Epub 2015 Jun 2. PMID: 26048138.

Watkins S, Robel S, Kimbrough IF, Robert SM, Ellis-Davies G, Sontheimer H. Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. Nat Commun. 2014;5:4196. Published 2014 Jun 19. doi:10.1038/ncomms5196

Watson RO, Bell SL, MacDuff DA, Kimmey JM, Diner EJ, Olivas J, Vance RE, Stallings CL, Virgin HW, Cox JS. The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. Cell Host Microbe. 2015 Jun 10;17(6):811-819. doi: 10.1016/j.chom.2015.05.004. Epub 2015 Jun 2. PMID: 26048136; PMCID: PMC4466081.

Wehmas LC, Tanguay RL, Punnoose A, Greenwood JA. Developing a Novel Embryo-Larval Zebrafish Xenograft Assay to Prioritize Human Glioblastoma Therapeutics. Zebrafish. 2016;13(4):317-329. doi:10.1089/zeb.2015.1170

Welker AM, Jaros BD, An M, Beattie CE. Changes in tumor cell heterogeneity after chemotherapy treatment in a xenograft model of glioblastoma. Neuroscience. 2017;356:35-43. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.05.010

Weller M, van den Bent M, Hopkins K, et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma, Lancet Oncol. 2014;15(9):e395-e403. doi:10.1016/S1470-2045(14)70011-7

Weller, M. et al. Glioma. Nat. Rev. Dis. Prim. 1, 15017 (2015).

Wesolowski R, Sharma N, Reebel L, et al. Phase Ib study of the combination of pexidartinib (PLX3397), a CSF-1R inhibitor, and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. Ther Adv Med Oncol. 2019;11:1758835919854238. Published 2019 Jun 21. doi:10.1177/1758835919854238

White RM, Sessa A, Burke C, et al. Transparent adult zebrafish as a tool for in *vivo* transplantation analysis. Cell Stem Cell. 2008;2(2):183-189. doi:10.1016/j.stem.2007.11.002

Whiteside TL. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. Adv Clin Chem. 2016;74:103-41. doi: 10.1016/bs.acc.2015.12.005. Epub 2016 Apr 7. PMID: 27117662; PMCID: PMC5382933.

Winkler EA, Birk H, Burkhardt JK, et al. Reductions in brain pericytes are associated with arteriovenous malformation vascular instability. J Neurosurg. 2018;129(6):1464-1474. doi:10.3171/2017.6.JNS17860

Winkler F, Osswald M, Wick W. Anti-Angiogenics: Their Role in the Treatment of Glioblastoma. Oncol Res Treat. 2018;41(4):181-186. doi: 10.1159/000488258. Epub 2018 Mar 23. PMID: 29562225.

Woo S-R, Fuertes MB, Corrales L, et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. Immunity 2014 ; 41 : 830–842.

Wolf AA, Yáñez A, Barman PK, Goodridge HS. The Ontogeny of Monocyte Subsets. Front Immunol. 2019;10:1642. Published 2019 Jul 17. doi:10.3389/fimmu.2019.01642

Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. Science (2013) 339:826–30. doi: 10.1126/science.1229963

Wu J, Chen YJ, Dobbs N, et al. STING-mediated disruption of calcium homeostasis chronically activates ER stress and primes T cell death. J Exp Med. 2019;216(4):867-883. doi:10.1084/jem.20182192

Wu MZ, Cheng WC, Chen SF, Nieh S, O'Connor C, Liu CL, Tsai WW, Wu CJ, Martin L, Lin YS, Wu KJ, Lu LF, Izpisua Belmonte JC. miR-25/93 mediates hypoxia-induced immunosuppression by repressing cGAS. Nat Cell Biol. 2017; 19:1286–1296. 10.1038/ncb3615.

Wu X, Wu FH, Wang X, et al. Molecular evolutionary and structural analysis of the cytosolic DNA sensor cGAS and STING. Nucleic Acids Res. 2014;42(13):8243-8257. doi:10.1093/nar/gku569

Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature. 2013;496(7446):445-455. doi:10.1038/nature12034

X

Xia T, Konno H, Barber GN. Recurrent loss of STING signaling in melanoma correlates with susceptibility to viral oncolysis. Cancer Res 2016 ; 76 : 6747–6759.

Xia T, Konno H, Ahn J, et al. Deregulation of STING signaling in colorectal carcinoma constrains DNA damage responses and correlates with tumorigenesis. Cell Rep 2016 ; 14 : 282–297.

Xie C, Liu C, Wu B, et al. Effects of IRF1 and IFN-β interaction on the M1 polarization of macrophages and its antitumor function. Int J Mol Med. 2016;38(1):148-160. doi:10.3892/ijmm.2016.2583

Xu B, Cui Y, Wang W, Li S, Lyu C, Wang S, Bao W, Wang H, Qin M, Liu Z, et al. Immunomodulation-enhanced nanozyme-based tumor catalytic therapy. Adv Mater. 2020;32(33):e2003563. doi:10.1002/adma.202003563

Xu J, Zhu L, He S, et al. Temporal-Spatial Resolution Fate Mapping Reveals Distinct Origins for Embryonic and Adult Microglia in Zebrafish. Dev Cell. 2015;34(6):632-641. doi:10.1016/j.devcel.2015.08.018

Xu MM, Pu Y, Han D, et al. Dendritic cells but not macrophages sense tumor mitochondrial DNA for cross-priming through signal regulatory protein a signaling. Immunity 2017 ; 47 : 363–73.e5.

Xu S, Wei J, Wang F, et al. Effect of miR-142-3p on the M2 macrophage and therapeutic efficacy against murine glioblastoma. J Natl Cancer Inst. 2014;106(8):dju162. Published 2014 Jun 28. doi:10.1093/jnci/dju162

Y

Yan C, Yang Q, Do D, Brunson DC, Langenau DM. Adult immune compromised zebrafish for xenograft cell transplantation studies. EBioMedicine. 2019;47:24-26. doi:10.1016/j.ebiom.2019.08.016

Yanai M, Makino H, Ping B, et al. DNA-PK Inhibition by NU7441 Enhances Chemosensitivity to Topoisomerase Inhibitor in Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells by Blocking DNA Damage Repair. Yonago Acta Med. 2017;60(1):9-15. Published 2017 Mar 9.

Yang H, Wang H, Ren J, Chen Q, Chen ZJ. cGAS is essential for cellular senescence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017; 114:E4612–E4620. 10.1073/pnas.1705499114.

Yang X., Chen G., Yu S., Xu C., Xin Y., Li T., Shi Y., Gu A., Duan J., Qian C. TGF-β1 enhances tumor-induced angiogenesis via JNK pathway and macrophage infiltration in an improved zebrafish embryo/xenograft glioma model. Int. Immunopharmacol. 2013;15:191–198. doi: 10.1016/j.intimp.2012.12.002.

Yang X, Cui W, Yu S, et al. A synthetic dl-nordihydroguaiaretic acid (Nordy), inhibits angiogenesis, invasion and proliferation of glioma stem cells within a zebrafish xenotransplantation model. PLoS One. 2014;9(1):e85759. Published 2014 Jan 15. doi:10.1371/journal.pone.0085759

Yang X.J., Cui W., Gu A., Xu C., Yu S.C., Li T.T., Cui Y.H., Zhang X., Bian X.W. A novel zebrafish xenotransplantation model for study of glioma stem cell invasion. PLoS ONE. 2013;8:e61801. doi: 10.1371/journal.pone.0061801.

Ye XZ, et al. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-β1 signaling pathway. J Immunol. 2012;189:444–453.

Yi L, et al. Glioma-initiating cells: a predominant role in microglia/macrophages tropism to glioma. J Neuroimmunol. 2011;232:75–82.

Yokota, T., Oritani, K., Butz, S., Ewers, S., Vestweber, D., and Kanakura, Y. (2012). Markers for Hematopoietic Stem Cells : Histories and Recent Achievements. In Advances in Hematopoietic Stem Cell Research, R. Pelayo, ed. (InTech), pp. 77–88.

Yona, S., Kim, K.W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. Immunity 38, 79–91.

Yoshida M, Macklin WB. Oligodendrocyte development and myelination in GFP-transgenic zebrafish. J Neurosci Res. 2005;81(1):1-8. doi:10.1002/jnr.20516

Yu, L., Liu, P. Cytosolic DNA sensing by cGAS: regulation, function, and human diseases. Sig Transduct Target Ther 6, 170 (2021). https://doi.org/10.1038/s41392-021-00554-y

Yu J, Zhong B, Jin L, et al. 2-Methoxy-6-acetyl-7-methyljuglone (MAM) induced programmed necrosis in glioblastoma by targeting NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1). Free Radic Biol Med. 2020;152:336-347. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.026

Z

Zanganeh S, Hutter G, Spitler R, Lenkov O, Mahmoudi M, Shaw A, Pajarinen JS, Nejadnik H, Goodman S, Moseley M, et al. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. Nat Nanotechnol. 2016;11(11):986–994. doi:10.1038/nnano.2016.168

Zanin N, Viaris de Lesegno C, Lamaze C, Blouin CM. Interferon Receptor Trafficking and Signaling: Journey to the Cross Roads. Front Immunol. 2021;11:615603. Published 2021 Jan 20. doi:10.3389/fimmu.2020.615603

Zeng A, Ye T, Cao D, et al. Identify a Blood-Brain Barrier Penetrating Drug-TNB using Zebrafish Orthotopic Glioblastoma Xenograft Model. Sci Rep. 2017;7(1):14372. Published 2017 Oct 30. doi:10.1038/s41598-017-14766-2

Zhai H, Heppner FL, Tsirka SE. Microglia/macrophages promote glioma progression. Glia. 2011;59(3):472-485. doi:10.1002/glia.21117

Zhang B, Bailey WM, McVicar AL, Gensel JC. Age increases reactive oxygen species production in macrophages and potentiates oxidative damage after spinal cord injury. Neurobiol Aging. 2016;47:157-167. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2016.07.029

Zhang C, Yang M, Ericsson AC. Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. Front Immunol. 2021;12:620510. Published 2021 Mar 8. doi:10.3389/fimmu.2021.620510

Zhang J, Sarkar S, Cua R, Zhou Y, Hader W, Yong VW. A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. Carcinogenesis 2012;33:312–319

Zhang M, Hutter G, Kahn SA, et al. Anti-CD47 Treatment Stimulates Phagocytosis of Glioblastoma by M1 and M2 Polarized Macrophages and Promotes M1 Polarized Macrophages In *Vivo*. PLoS One. 2016;11(4):e0153550. Published 2016 Apr 19. doi:10.1371/journal.pone.0153550

Zhang, Q.; Mao, Z.; Sun, J. NF-KB Inhibitor, BAY11-7082, Suppresses M2 Tumor-Associated Macrophage Induced EMT Potential via MiR-30a/NF-KB/Snail Signaling in Bladder Cancer Cells. Gene 2019, 710, 91–97.

Zhang X, Brann TW, Zhou M, Yang J, Oguariri RM, Lidie KB, et al. . Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN. J Immunol (2011) 186:4541–5. 10.4049/jimmunol.1003389

Zhang X, Wu J, Du F, et al. The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. Cell Rep. 2014;6(3):421-430. doi:10.1016/j.celrep.2014.01.003

Zhao Y, Thomas HD, Batey MA, Cowell IG, Richardson CJ, Griffin RJ, Calvert AH, Newell DR, Smith GC, Curtin NJ (2006) Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. Cancer Res 66(10):5354–5362

Zheng Z, Jia S, Shao C, Shi Y. Irradiation induces cancer lung metastasis through activation of the cGAS-STING-CCL5 pathway in mesenchymal stromal cells. Cell Death Dis. 2020;11:326.

Zhong B, Zhang L, Lei C, et al. The ubiquitin ligase RNF5 regulates antiviral responses by mediating degradation of the adaptor protein MITA. Immunity. 2009;30(3):397-407. doi:10.1016/j.immuni.2009.01.008

Zhou W, et al. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. Nat Cell Biol. 2015;17:170–182.

Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ et al (2005) The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. Nat Immunol 6(12):1245–1252

Zhu S, Niu M, O'Mary H, Cui Z. Targeting of tumor-associated macrophages made possible by PEG-sheddable, mannose-modified nanoparticles. Mol Pharm. 2013;10(9):3525-3530. doi:10.1021/mp400216r

Zhu, Y.; Herndon, J.M.; Sojka, D.K.; Kim, K.-W.; Knolhoff, B.L.; Zuo, C.; Cullinan, D.R.; Luo, J.; Bearden, A.R.; Lavine, K.J.; et al. Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. Immunity 2017, 47, 323–338.e6.

Zong H, Parada LF, Baker SJ. Cell of origin for malignant gliomas and its implication in therapeutic development. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015;7(5):a020610. Published 2015 Jan 29. doi:10.1101/cshperspect.a020610

RESUME - Impact des acides nucléiques cytosoliques sur l'immunité antitumorale dans un modèle de glioblastome

Les macrophages peuvent se différencier en plusieurs sous-types distincts en réponse aux stimuli extérieurs : principalement en macrophages M1 dits « classiques » et en macrophages M2 dits « alternatifs ». Au sein du microenvironnement tumoral, les macrophages représentent la population cellulaire majoritaire et peuvent compter pour près de la moitié de la masse tumorale. Ce recrutement massif de macrophages, aussi appelés TAM (tumor Associated macrophages) est associé à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers comme le glioblastome. En effet, de nombreuses études ont établi que les macrophages jouaient un rôle clé dans l'évolution du glioblastome via leurs nombreuses fonctions pro-tumorales. D'une manière intéressante, il a été démontré que le phénotype des macrophages évoluait au cours de la tumorigenèse. Ainsi, dans les tumeurs précoces, les macrophages ont un phénotype de type M1 dit « classique » inflammatoire et tumoricide. Les macrophages sont cytotoxiques, phagocytaires et favorisent la présentation antigénique tout en limitant la croissance tumorale. Cependant, à mesure que la tumeur progresse et s'établit, les macrophages s'orientent vers un phénotype M2 dit « alternatif » favorisant un microenvironnement immunosuppressif délétère. Ces macrophages présentent un phénotype pro-tumoral et favorisent l'angiogenèse et inhibent l'activation des lymphocytes T. Récemment, la repolarisation des macrophages M2 en M1 est devenue une nouvelle stratégie thérapeutique. Les mécanismes moléculaires conduisant à la polarisation M1 ou M2 ont été largement étudiés dans différents contextes, mais le rôle joué par la voie de reconnaissance des acides nucléiques cytosoliques cGAS-STING dans la polarisation macrophagique demeure peu explorée. Or, cette voie apparaît comme jouant un rôle déterminant dans l'inflammation associée au cancer.

Ce projet de thèse CIFRE a permis d'étudier l'effet des acides nucléiques cytosoliques et en particulier des doubles brins d'ADN sur la polarisation des macrophages. Les interactions entre les cellules tumorales et les macrophages ont également pu être explorées dans un modèle de glioblastome. Pour cela, deux modèles *in vitro* (développé au sein de l'équipe de Dr. Nadine Laguette à l'IGH) et *in vivo* chez le poisson zèbre (développé au sein de la société AZELEAD) ont été combinés. Le projet s'est articulé autour des axes de recherche suivants : Caractérisation de l'impact des acides nucléiques et exploration de la voie de signalisation cGAS-STING sur la polarisation des macrophages *in vitro*. Mise en place d'un modèle de glioblastome permettant d'étudier et de modéliser en 3D le microenvironnement tumoral associé au glioblastome dans le modèle du poisson-zèbre et caractérisation des interactions entre macrophages et cellules cancéreuses *in vivo*. Enfin, les travaux ont permis d'explorer l'effet de cGAS sur la tumorigénèse, le recrutement et la polarisation des macrophages *in vivo*.

ABSTRACT - Impact of cytosolic nucleic acids on antitumor immunity in a glioblastoma model

Macrophages can differentiate into several distinct subtypes in response to external stimuli : mainly in called "classic" M1 macrophages and in "alternative" M2 macrophages. Within the tumor microenvironment, macrophages represent the majority cell population and can account for nearly half of the tumor mass. This massive recruitment of macrophages, also called TAM (tumor associated macrophages) is associated with a poor prognosis in many cancers such as glioblastoma. Indeed, numerous studies have established that macrophages play a key role in the evolution of glioblastoma through their numerous pro-tumoral functions. Interestingly, the macrophage phenotype has been shown to change during tumorigenesis. Thus, in early tumors, the macrophages have an M1 inflammatory and tumoricidal "classic" phenotype. These macrophages are cytotoxic, phagocytic and promote antigen presentation while limiting tumor growth. However, as the tumor progresses and becomes more established, the macrophages shift towards an "alternative" M2 phenotype that promote a deleterious immunosuppressive microenvironment. These macrophages exhibit a pro-tumoral phenotype that promotes angiogenesis and inhibits T-cell activation. Recently, repolarization of M2 macrophages to M1 has become a new therapeutic strategy. The molecular mechanisms leading to M1 or M2 polarization have been widely studied in different contexts, but the role played by the cytosolic nucleic acid pathway cGAS-STING on macrophage polarization remains poorly explored. However, this pathway appears to play a determining role in the inflammation associated with cancer. This CIFRE thesis project studied the effect of cytosolic nucleic acids and in particular double strands DNA on macrophage polarization. The interactions between tumor cells and macrophages were also explored in a model of glioblastoma. For this purpose, two different models, *in vitro* (developed within the team of Dr. Nadine Laguette at IGH) and *in vivo* on zebrafish embryos (developed within the company AZELEAD) were combined. The project was structured around the following research axes : Characterization of the impact of nucleic acids and exploration of the cGAS-STING signaling pathway on macrophage polarization *in vitro*. Establishment of a zebrafish model to study and model in 3D the tumor microenvironment associated with glioblastoma and characterization of macrophages-cancer cells interactions *in vivo*. Finally, this work explored the effect of cGAS on the tumorigenesis, recruitment and polarization of macrophages *in vivo*.