

UNIVERSITÉ DE LILLE - ÉCOLE DOCTORALE DE BIOLOGIE-SANTÉ

LABORATOIRE PRISM INSERM U1192

THÈSE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du grade Docteur en Sciences de l'Université de Lille

Présentée par

**MÉLANIE ROSE**

## **MACBETH : MACrophages BoostEd THerapy**

Stratégie de réactivation des macrophages au sein de la tumeur *via*  
l'inhibition de proprotéines convertases et la stimulation de TLRs

Soutenue à Lille le 25 septembre 2020

Devant le jury composé de :

Président du jury et rapporteur	Mme Bénédicte MANOURY	Directrice de recherche (CNRS)
Rapporteur	Mr Abdel-Majid KHATIB	Directeur de recherche (Inserm)
Examineur	Mme Chiara GUERRERA	Ingénieure de recherche (Université Paris Descartes)
Examineur	Mme Anne RÉGNIER-VIGOUROUX	Directrice de recherche (Université de Johannes Gutenberg)
Directeur de thèse	Mr Michel SALZET	Professeur (Université de Lille)
Co-encadrant	Mr Franck RODET	Maître de Conférences (Université de Lille)



*"You must do the thing you think you cannot do."*

Eleanor Roosevelt

*« Le meilleur moyen de réaliser l'impossible est de croire que c'est possible. »*

Alice au pays des merveilles, le chapelier fou.



## REMERCIEMENTS

---

La thèse est une expérience de vie qui m'a permis de croiser le chemin de nombreuses personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail. J'adresse mes remerciements à l'ensemble de ces personnes.

Mes premiers remerciements vont au Pr Isabelle Fournier et à mon directeur de thèse, le Pr Michel Salzet. Tu m'as poussée et encouragée vers cette expérience et je t'en remercie. Ton encadrement depuis le master m'a beaucoup apporté et ce travail n'aurait pu être mené à bien sans ton temps, ton investissement et tes conseils.

Je remercie également le Dr Franck Rodet, co-encadrant de ma thèse, pour sa supervision et son implication dans le projet.

Je tiens à exprimer ma gratitude auprès de la région Hauts-de-France, du FEDER et d'OCR pour leur soutien financier.

Merci aux Drs Abdel-Majid Khatib et Bénédicte Manoury qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Je remercie également les Drs Anne Régnier-Vigouroux et Chiara Gerrera pour leur participation à mon jury de thèse. Merci d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier l'ensemble du laboratoire, sans vous, ces trois ans n'auraient pas été les mêmes :

Marie, je tiens à te remercier pour ton investissement et ton aide qui a été très précieuse. Tu as toujours pris le temps de m'aider, quel que soit le problème.

Merci à Annie, la maman du laboratoire, pour tes précieux conseils, ton temps et ta bonne humeur. Ta bienveillance et ton énergie ont été d'un grand soutien pendant toutes ces années. Tu vas nous manquer.

Irène, merci pour tout ce que tu fais au laboratoire. Merci pour nos discussions et tes conseils. Tu as été d'un grand secours dans bien des situations. Reste comme tu es.

Soulaimane, je te l'ai assez dit et je te le redis, ma thèse ne serait pas ce qu'elle est sans toi. Merci pour tout, pour ton aide et tes conseils ainsi que pour ta présence au quotidien.

Antonella et Tristan, je suis heureuse d'avoir croisé votre route. Vous avez été d'une grande aide dans ma vie. Merci Antonella pour tes *peps-talks* qui m'ont motivée et éclairée. Tristan, je comprends maintenant ton intérêt pour le *noise-cancelling*. Merci pour ta bonne humeur et ton humour qui ont grandement participé à la bonne ambiance et à la convivialité dans le bureau.

Étienne et Estelle, ces quelques lignes ne seront jamais suffisantes pour vous témoigner toute ma gratitude. Vos petits gestes au quotidien ont grandement facilité cette dernière année. Merci pour votre générosité, votre humanité et votre présence au quotidien. Vous m'avez offert votre temps, vos conseils et votre énergie et je vous en remercie.

Un grand merci à Flore et Lauranne, mes collègues et amies. Je ne pourrais imaginer vivre une expérience comme celle-ci sans vous. Vous avez été des piliers et je ne pourrais jamais vous remercier assez pour tout ce que vous m'avez apporté. Nos discussions plus ou moins sérieuses aboutissant toujours sur des projets, plus ou moins sérieux, vont me manquer. Vous allez me manquer. J'espère que nous nous retrouverons en mer !

Au terme de ce travail, je remercie celles et ceux qui me sont chers. Je vous ai délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse mais vous m'avez accompagnée tout au long de ces années.

Raphy, même à l'autre bout du monde tu restes présent. Je n'ai pas besoin d'écrire beaucoup pour te remercier : merci d'être Raphy. Je suis sûre que ça suffit !

Guillaume et Marie, vous avez été un vrai soutien moral et ce depuis des années ! Merci pour tous ces souvenirs, passés et à venir.

À toi, j'espère sincèrement que nos chemins coïncideront encore longtemps. Merci pour le soutien, l'énergie et la joie que tu m'apportes au quotidien.

Caro, les mots ne suffisent plus. Peu importe ce que j'écrirai, ce ne sera pas suffisant pour te transmettre ma gratitude. Merci pour ton amour, ta patience et tes encouragements. Ton rire et ton énergie sont un soutien moral et physique ! Merci de faire partie de ma vie.

Enfin, je remercie ma famille. Je ne serais pas là sans vous. Je suis devenue ce que je suis grâce à vous, grâce à votre éducation, à vos paroles et à vos encouragements. Vous avez cru en moi et en mes choix, vous m'avez soutenue tout au long de ma vie et je vous en remercie.

### *Publications*

#### **The role of a proprotein convertases inhibitor in reactivation of tumor associated macrophages and inhibition of glioma growth.**

**Mélanie Rose**<sup>1,2\*</sup>, Marie Duhamel<sup>1\*†</sup>, Soulaïmane Aboulouard<sup>1</sup>, Firas Kobeissy<sup>3</sup>, Emilie Le Rhun<sup>1</sup>, Annie Desmons<sup>1</sup>, Dominique Tierny<sup>2</sup>, Isabelle Fournier<sup>1</sup>, Franck Rodet<sup>1†</sup>, Michel Salzet<sup>1†</sup>.

*1 : Univ. Lille, Inserm, U1192 - Protéomique Réponse Inflammatoire Spectrométrie de Masse - PRISM, F-59000 Lille, France*

*2: Oncovet Clinical Research (OCR), SIRIC ONCOLille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France*

*3: Department of Psychiatry, McKnight Brain Institute, University of Florida, Gainesville, FL, 32611, USA*

Tumors are characterized by the presence of malignant and non- malignant cells, such as immune cells including macrophages which are preponderant. Macrophages impact the efficacy of chemotherapy and may lead to drug resistance. In this context and based on our previous works, we investigated the ability to reactivate macrophages, using a proprotein convertases inhibitor. Proprotein convertases process immature proteins into functional proteins, several of them having a role in immune cells activation and tumorigenesis. Macrophages were treated with a peptidomimetic inhibitor targeting Furin, PC1/3, PC4, PACE4 and PC5/6. Their anti-glioma activity was analyzed by mass spectrometry-based proteomics and viability assays in 2D and 3D in vitro cultures. Comparison with Temozolomide, the drug used for glioma therapy, established that the inhibitor was more efficient for the reduction of cancer cell density. The inhibitor was also able to reactivate macrophages through the secretion of several immune factors with antitumor properties. Moreover, two proteins considered as good glioma patient's survival indicators were also identified in 3D cultures treated with the inhibitor. Finally, we established that the proprotein convertases inhibitor has a dual role as anti-glioma drug and anti-tumoral macrophages' reactivation drug. This strategy could be used together with chemotherapy to increase therapy efficacy in glioma.

*Molecular Therapy: Oncolytics (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.03.005>*

*Couverture du volume 17 de juin 2020*

## **Paclitaxel treatment and PC1/3 knockdown in macrophages is a promising anti-glioma strategy as revealed by proteomics and cytotoxicity studies**

**Mélanie Rose<sup>1,2\*</sup>**, Marie Duhamel<sup>1\*\*</sup>, Franck Rodet<sup>1</sup>, Adriana Nathalia Murgoci<sup>1,7</sup>, Lea Zografidou<sup>3</sup>, Anne Régnier-Vigouroux<sup>3</sup>, Fabien Vanden Abeele<sup>4</sup>, Firas Kobeissy<sup>5</sup>, Serge Nataf<sup>6</sup>, Laurent Pays<sup>6</sup>, Maxence Wisztorski<sup>1</sup>, Dasa Cizkova<sup>7</sup>, Isabelle Fournier<sup>1</sup>, Michel Salzet<sup>1\*\*</sup>

*1 : Inserm U-1192, Laboratoire de Protéomique, Réponse Inflammatoire, Spectrométrie de Masse (PRISM), Université Lille 1, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve D'Ascq, France*

*2 : Oncovet Clinical Research (OCR), SIRIC ONCOLille, Villeneuve d'Ascq, France*

*3 : Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Johann-Joachim-Becher-Weg 15, D-55128 Mainz, Germany*

*4 : Inserm U-1003, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics, Université Lille 1, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France*

*5 : Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, American University of Beirut, 1107 2020 Beirut, Lebanon*

*6 : Inserm U-1060, CarMeN Laboratory, Banque de Tissus et de Cellules des Hospices Civils de Lyon, Université Lyon-1, Hôpital Edouard Herriot, 69437 Lyon cedex 03, France*

*7 : Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, 845 10, Bratislava, Slovak Republic*

High grade gliomas are the most common brain tumors in adult. These tumors are characterized by a high infiltration in microglial cells and macrophages. The immunosuppressive tumor environment is known to orient immune cells toward a pro-tumoral and anti-inflammatory phenotype. Therefore, the current challenge for cancer therapy is to find a way to reorient macrophages toward an antitumoral phenotype. Previously, we demonstrated that macrophages secreted antitumoral factors when they were invalidated for the proprotein convertase 1/3 (PC1/3) and treated with LPS. However, achieving an activation of macrophages via LPS/TLR4/Myd88-dependent pathway appears yet unfeasible in cancer patients. On the contrary, the antitumor drug Paclitaxel is also known to activate the TLR4 MyD88-dependent signaling pathway and mimics LPS action. Therefore, we evaluated if PC1/3 knock-down (KD) macrophages could be activated by Paclitaxel and efficient against glioma. We report here that such a treatment of PC1/3 KD macrophages drove to the overexpression of proteins mainly involved in cytoskeleton rearrangement. In support of this finding, we found that these cells exhibited a Ca<sup>2+</sup> increase after Paclitaxel treatment. This is indicative of a possible depolymerization of microtubules and may therefore



reflect an activation of inflammatory pathways in macrophages. In such a way, we found that PC1/3 KD macrophages displayed a repression of the anti-inflammatory pathway STAT3 and secreted more pro-inflammatory cytokines. Extracellular vesicles isolated from these PC1/3 KD cells inhibited glioma growth. Finally, the supernatant collected from the coculture between glioma cells and PC1/3 KD macrophages contained more antitumoral factors. These findings unravel the potential value of a new therapeutic strategy combining Paclitaxel and PC1/3 inhibition to switch macrophages toward an antitumoral immunophenotype.

*Mol Cell Proteomics*. 2018 Jun;17(6):1126-1143. doi: 10.1074/mcp.RA117.000443

### **Deciphering molecular consequences of the proprotein convertase 1/3 inhibition in macrophages for application in anti-tumour immunotherapy.**

Franck Rodet, Alice Capuz, Tsukasa Hara, Rinaldovan Meel, Marie Duhamel, **Mélanie Rose**, Antonella Raffo-Romero, Isabelle Fournier, Michel Salzet

*Inserm U-1192, Laboratoire de Protéomique, Réponse Inflammatoire, Spectrométrie de Masse (PRISM), Université Lille 1, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve D'Ascq, France*

During tumour development, macrophages are recruited to the tumour site and orientated towards an anti-inflammatory phenotype. Due to their immunosuppressive function, tumour associated macrophages (TAMs) are recognized as major components in tumour progression. Changing these macrophages to a pro-inflammatory phenotype is thus extensively studied as a potential means for developing novel anti-tumour therapy. In this context, we found that the Proprotein convertase 1/3 (PC1/3) is a relevant target. Proteomic analysis reveals that PC1/3 knockdown (KD) macrophages present all the characteristic of activated pro-inflammatory macrophages. Moreover, in PC1/3 KD macrophages, TLR4 and TLR9 signaling pathways can be enhanced leading to the secretion of pro-inflammatory factors and anti-tumour factors. To develop an efficient anti-tumour immunotherapy, we may (i) target TAMs directly inside the tumour site for PC1/3 inhibition and TLR activation and used them as "Trojan macrophages" or (ii) directly take advantage of PC1/3 inhibited macrophages and use them as "drone macrophages" by activating them "at distance" with a TLR ligand. Therefore, PC1/3 inhibited macrophages constitute an innovative cell therapy to treat tumours efficiently.

*J Biotechnol*. 2018 Sep 20;282:80-85. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.002.

### **3D MALDI mass spectrometry imaging reveals specific localization of long-chain acylcarnitines within a 10-day time window of spinal cord injury.**

Jusal Quanico<sup>1</sup>, Lena Hauberg-Lotte<sup>2</sup>, Stephanie Devaux<sup>1</sup>, Zahra Laouby<sup>1</sup>, Celine Meriaux<sup>1</sup>, Antonella Rafo-Romero<sup>1</sup>, **Melanie Rose**<sup>1</sup>, Leia Westerheide<sup>2</sup>, Jost Vehmeyer<sup>2</sup>, Franck Rodet<sup>1</sup>, Peter Maass<sup>2</sup>, Dasa Cizkova<sup>3,4</sup>, Norbert Zilka<sup>4</sup>, Veronika Cubinkova<sup>4</sup>, Isabelle Fournier<sup>1</sup> & Michel Salzet<sup>1</sup>

*1 : Université de Lille, INSERM U1192 - Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM), F-59000, Lille, France.*

*2 : Center for Industrial Mathematics, University of Bremen, Bibliothekstraße 5, 28359, Bremen, Germany.*

*3 : Department of Anatomy, Histology and Physiology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice, Komenskeho 73, 041 81, Kosice, Slovakia.*

*4 : Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Dubravska cesta 9, 845 10, Bratislava, Slovakia.*

We report, for the first time, the detection and specific localization of long-chain acylcarnitines (LC ACs) along the lesion margins in an experimental model of spinal cord injury (SCI) using 3D mass spectrometry imaging (MSI). Acylcarnitines palmitoylcarnitine (AC(16:0)), palmitoleoylcarnitine (AC(16:1)), elaidic carnitine (AC(18:1)) and tetradecanoylcarnitine (AC(14:1)) were detected as early as 3 days post injury, and were present along the lesion margins 7 and 10 days after SCI induced by balloon compression technique in the rat. 3D MSI revealed the heterogeneous distribution of these lipids across the injured spinal cord, appearing well-defined at the lesion margins rostral to the lesion center, and becoming widespread and less confined to the margins at the region located caudally. The assigned acylcarnitines co-localize with resident microglia/macrophages detected along the lesion margins by immunofluorescence. Given the reported pro-inflammatory role of these acylcarnitines, their specific spatial localization along the lesion margin could hint at their potential pathophysiological roles in the progression of SCI.

*Sci Rep. 2018 Oct 31;8(1):16083. doi: 10.1038/s41598-018-34518-0.*

## Publications en préparation

### **Therapeutic anti-glioma effect of the combined action of PCSK inhibitor with the anti-tumoral factors secreted by Poly (I:C)-stimulated macrophages.**

Mélanie Rose<sup>1,2\*</sup>, Marie Duhamel<sup>1\*</sup>, Soulaymane Aboulouard<sup>1</sup>, Firas Kobeissy<sup>3</sup>, Dominique Tierny<sup>2</sup>, Isabelle Fournier<sup>1,4</sup>, Franck Rodet<sup>1</sup>, Michel Salzet<sup>1,4\*\*</sup>

*1 : Univ. Lille, Inserm, U1192 - Protéomique Réponse Inflammatoire Spectrométrie de Masse - PRISM, F-59000 Lille, France*

*2: Oncovet Clinical Research (OCR), SIRIC ONCOLille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France*

*3: Department of Psychiatry, McKnight Brain Institute, University of Florida, Gainesville, FL, 32611, USA*

*4: Institut Universitaire de France, 75000 Paris*

Macrophages plasticity is a key feature in cancer progression. Neoplastic cells can alter their immune functions and orient them into a pro-tumoral phenotype. In this context and based on our previous work, we developed a new therapeutic strategy to switch macrophages phenotype and reactivate their anti-tumoral functions. In this context, we previously showed a dual activity of a proprotein convertases inhibitor as anti-glioma drug and anti-tumoral macrophages' reactivation drug. Proprotein convertases are proteases that cleave proteins into functional proteins. Several of their substrates are involved in tumorigenesis and immunosuppression. In this study, we decided to combine proprotein convertases inhibitor with Poly (I:C), a TLR3 ligand, to increase the anti-tumoral activity of macrophages. With mass spectrometry-based proteomics we could establish that a stimulation of macrophages with Poly (I:C) increased their secretion of pro-inflammatory cytokines and anti-tumoral factors. 3D invasion assay showed the efficacy of these anti-tumoral factors against mixed glioma cells and macrophages spheroids. Besides, immunofluorescence and proliferation assays showed an additive effect of the proprotein convertases inhibitor and the anti-tumoral factors secreted by Poly (I:C)-treated macrophages on both anti-glioma activity and macrophages anti-tumoral orientation leading to an innovative glioma therapy.

*Soumis à Oncogene le 28.07.2020*

## COMMUNICATIONS ORALES

Rose M, Duhamel M, Fournier I, Rodet F, Salzet M. Macrophages reactivation inside glioma microenvironments through PC1/3 inhibition associated with TLR3 activation. **14<sup>ème</sup> journées du Club Jeunes de la SFEAP, Rennes, France, 18-20 Avril 2018.**

Rose M, Duhamel M, Fournier I, Rodet F, Salzet M. Macrophages reactivation inside glioma microenvironments through PC1/3 inhibition associated with TLR3 activation. **EuPA, Saint Jacques de Compostelle, Espagne, 16-20 Juin 2018.**

Rose M, Duhamel M, Fournier I, Rodet F, Salzet M. Macrophages Reactivation in Glioma through Proprotein Convertases inhibition associated with TLR3 activation. **Euron, Université du Luxembourg, Luxembourg, 23-25 Septembre 2019.**

Rose M, Duhamel M, Fournier I, Rodet F, Salzet M. Macrophages Reactivation in Glioma through Proprotein Convertases inhibition associated with TLR3 activation. **Journée André Verbert, Lille, Villeneuve d'Ascq, 10 Septembre 2019.**

## POSTERS

Rose M, Duhamel M, Fournier I, Rodet F, Salzet M. Mixed Spheroid for the Study of Macrophages Reactivation inside Glioma through Proprotein Convertase 1/3 Inhibition Associated with TLR3 Activation. **ITMO, Paris, France, 8-9 Octobre 2018.**

Rose M, Duhamel M, Fournier I, Rodet F, Salzet M. Mixed Spheroid for the Study of Macrophages Reactivation inside Glioma through Proprotein Convertase 1/3 Inhibition Associated with TLR3 Activation. **Journée stratégique de la SFR-TSM, Lille, France, 10 Décembre 2018.**

Rose M, Duhamel M, Fournier I, Rodet F, Salzet M. Mixed Spheroid for the Study of Macrophages Reactivation inside Glioma through Proprotein Convertase 1/3 Inhibition Associated with TLR3 Activation. **Journée stratégique de la SFR-TSM, Lille, France, 9 Décembre 2019.**

## ENSEIGNEMENTS

2018/2019

- 12h de travaux pratiques en Immunologie, licence 3
- 12h de travaux pratiques en Biologie Animale, licence 1

## ENCADREMENTS

Participation à l'encadrement d'étudiants en licence :

- Mélanie Baudart, 2018, stage de 3 mois
- Julie Vernon, 2019, stage de 3 mois

## VIE ASSOCIATIVE

- Vice-présidente du club jeune de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique (SFEAP), année 2018-2019
- Présidente du club jeune de la SFEAP, année 2019-2020
- Organisation des journées du club jeune de la SFEAP, Bordeaux
- Implication dans la gestion de la salle de culture de l'unité PRISM U1192

## TABLE DES MATIERES

---

REMERCIEMENTS .....	III
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES.....	V
TABLE DES MATIERES .....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIV
LISTE DES TABLEAUX .....	XVI
LISTE DES ABREVIATIONS .....	XVII
AVANT-PROPOS.....	XX
ETAT DE L'ART .....	1
1 Les glioblastomes.....	1
1.1 Epidémiologie .....	1
1.2 Physiopathologie .....	2
1.3 Diagnostic .....	4
1.3.1 L'imagerie médicale .....	4
1.3.2 Les marqueurs moléculaires .....	5
1.4 Classification .....	7
1.5 Traitement .....	9
1.6 Nouvelles cibles thérapeutiques .....	11
1.7 L'immunothérapie .....	14
2 La création d'un environnement tumoral immunosuppresseur .....	18
2.1 L'utilisation de l'environnement cérébral par les cellules cancéreuses.....	19
2.2 Le détournement du système immunitaire du système nerveux central.....	22
2.3 L'infiltration de cellules immunitaires et la suppression de leurs fonctions immunologiques.....	24
2.3.1 Les facteurs immunosuppresseurs.....	24
2.3.2 L'inactivation des cellules immunitaires .....	26
2.4 Les macrophages associés à la tumeur .....	28
2.4.1 Généralités sur les macrophages .....	28
2.4.2 Communication entre les macrophages et les cellules cancéreuses.....	35

2.4.3	Opportunité thérapeutique .....	39
3	Les proprotéines convertases (PCs) .....	40
3.1	Généralités.....	41
3.2	Fonctions .....	43
3.2.1	Le développement de modèles murins knockout.....	43
3.2.2	L'implication des proprotéines convertases dans le développement tumoral .	46
3.2.3	Les proprotéines convertases dans l'immunité .....	49
	OBJECTIFS DE LA THESE.....	52
	CHAPITRE I.....	54
	L'INHIBITION DE PC1/3 AU SEIN DE MACROPHAGES ASSOCIEE A UN TRAITEMENT AVEC DU PACLITAXEL EST UNE STRATEGIE THERAPEUTIQUE NOVATRICE DANS LE TRAITEMENT DES GLIOBLASTOMES.....	54
	Introduction.....	54
	Résultats .....	58
	Conclusions et perspectives .....	80
	CHAPITRE II.....	85
	L'INHIBITION DE PROPROTEINES CONVERTASES RALENTIT LE DEVELOPPEMENT TUMORAL ET ORIENTE LES MACROPHAGES VERS UN PHENOTYPE PRO-INFLAMMATOIRE ET ANTI-TUMORAL.....	85
	Introduction.....	85
	Résultats .....	87
	Conclusions et perspectives .....	107
	CHAPITRE III.....	111
	L'ASSOCIATION DE L'INHIBITION DE PCs ET DE LA STIMULATION DU TLR3 EST UNE NOUVELLE STRATEGIE THERAPEUTIQUE POUR LA REACTIVATION DES MACROPHAGES .....	111
	Introduction.....	111
	Résultats .....	113
	Conclusions et perspectives .....	152
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	154
	BIBLIOGRAPHIE.....	158

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : REPRESENTATION SIMPLIFIEE DE L'INCIDENCE DES TUMEURS CEREBRALES (A) ET DES TUMEURS GLIALES MALIGNES (B) CHEZ L'ADULTE ADAPTEE DE LAPOINTE, PERRY, AND BUTOWSKI 2018 ET OSTROM ET AL. 2019. ....	2
FIGURE 2 : IMAGERIE MEDICALE ET COLORATION HISTOLOGIQUE A L'HEMATOXYLINE ET EOSINE D'UN ASTROCYTOME DIFFUS ET D'UN GLIOBLASTOME (WELLER ET AL., 2015). ....	5
FIGURE 3 : REPRESENTATION SIMPLIFIEE DE LA CLASSIFICATION DE L'OMS 2016 DES GLIOMES CHEZ L'ADULTE ASSOCIEE A LA PROBABILITE DE SURVIE (MOLINARO ET AL., 2019). ....	9
FIGURE 4 : STRATEGIE DE VACCINATION POUR LE TRAITEMENT DES GLIOBLASTOMES (BROWN ET AL., 2018). ..	16
FIGURE 5 : THERAPIE CELLULAIRE PAR LES CELLULES CAR-T. ....	17
FIGURE 6 : COMPOSITION DU MICROENVIRONNEMENT D'UN GLIOBLASTOME (SILVER AND LATHIA, 2018).....	19
FIGURE 7 : MECANISMES IMMUNITAIRES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL (RANSOHOFF ET AL., 2012).....	23
FIGURE 8 : IMPLICATION DES DIFFERENTS ELEMENTS DE LA TUMEUR DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL ET L'INSTAURATION D'UN ENVIRONNEMENT IMMUNOSUPPRESSEUR. ....	24
FIGURE 9 : ORIGINE ET RENOUVELLEMENT DES MACROPHAGES AU SEIN DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL (PRINZ ET AL., 2017). ....	30
FIGURE 10 : SCHEMA SIMPLIFIE REPRESENTANT LES VOIES DE SIGNALISATION ASSOCIEES AUX TLRs CHEZ LES MAMMIFERES. ADAPTEE DE AKIRA AND TAKEDA 2004 ET O'NEILL, GOLENBOCK AND BOWIE, 2013. ....	31
FIGURE 11 : STIMULI ET FONCTIONS DES DIFFERENTS PHENOTYPES DE MACROPHAGES SELON LA NOMENCLATURE M1/M2 (MANTOVANI ET AL., 2004). ....	34
FIGURE 12 : PROPORTIONS DES MACROPHAGES SELON LE GRADE DE GLIOME (KOMOHARA ET AL., 2008). L'IMMUNOHISTOCHEMIE DE CD68, CD163 ET CD204 MET EN AVANT LA CORRELATION ENTRE LE NOMBRE DE MACROPHAGES ET DE CELLULES MICROGLIALES AU SEIN DE LA TUMEUR ET LE GRADE DU GLIOME. DE PLUS, LES MACROPHAGES ASSOCIES A LA TUMEUR ONT ADOPTE UN PHENOTYPE PRO-TUMORAL « M2 ». CD68 EST UTILISE EN TANT QUE MARQUEUR DE MACROPHAGES ET DE LA MICROGLIE TANDIS QUE CD163 ET CD204 SONT DES MARQUEURS DU PHENOTYPE M2. ECHELLE : 100 µm. ....	35
FIGURE 13 : RECRUTEMENT DES MACROPHAGES ASSOCIES AU GLIOME (GAMs OU TAMs) PAR DES FACTEURS SECRETES PAR LES CELLULES DE L'ENVIRONNEMENT TUMORAL (ROESCH ET AL., 2018).....	36
FIGURE 14 : SIGNAUX ENVIRONNEMENTAUX INFLUENÇANT LA POLARISATION DES TAMs (TUMOR ASSOCIATED MACROPHAGES) (OSTUNI ET AL., 2015). ....	37
FIGURE 15 : CONTRIBUTION DES MACROPHAGES ET CELLULES MICROGLIALES ASSOCIES AU GLIOME DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL (ROESCH ET AL., 2018). ....	38



FIGURE 16: STRUCTURE DES PROPROTEINES CONVERTASES (SEIDAH AND PRAT, 2012).....	42
FIGURE 17 : IMPLICATION DES PROPROTEINES CONVERTASES (PCs) DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL (SIEGFRIED ET AL., 2020). .....	48
FIGURE 18 : SCHEMA DECRIVANT L'IMPACT DE L'INHIBITION DE PC1/3 AU SEIN DES MACROPHAGES (DUHAMEL ET AL. 2016). .....	51
FIGURE 19 : ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION ASSOCIEE AU TLR4 PAR LE PACLITAXEL (D'APRES BYRD-LEIFER ET AL., 2001). .....	56
FIGURE 20 : OBJECTIFS ET STRATEGIE EXPERIMENTALE DE L'ETUDE DE L'EFFET DU PACLITAXEL SUR LES MACROPHAGES PC1/3 KD (D'APRES DUHAMEL ET AL., 2018). .....	57
FIGURE 21 : SCHEMA RECAPITULATIF DE L'EFFET DU PACLITAXEL ET DES MACROPHAGES PC1/3 KD SUR LES CELLULES DE GLIOME. ....	82
FIGURE 22 : TOXICITE DE L'INHIBITEUR DE PCs CONTRE LES LIGNEES HUMAINES DE GLIOME NCH82 ET DE CANCER DU SEIN MCF-7.....	109
FIGURE 23 : INFLUENCE DU TLR ACTIVE SUR LA SECRETION DE FACTEURS ANTI-TUMORAUX PAR LES MACROPHAGES. LA DENSITE CELLULAIRE DES CELLULES DE GLIOMES C6 A ETE DETERMINEE GRACE AU KIT MTS CELLTITER. ....	110
FIGURE 24 : EVALUATION DE L'EFFET ADDITIF DE L'INHIBITEUR DE PCs ET DU SECRETOME DE MACROPHAGES PRE-STIMULES AU POLY (I:C) SUR LA VIABILITE DES CELLULES DE GLIOME C6. ....	153

## LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 1 : PRINCIPALES STRATEGIES THERAPEUTIQUES A L'ETUDE POUR LE TRAITEMENT DES GLIOBLASTOMES (TAYLOR ET AL., 2019). .....	12
TABLEAU 2 : SUBSTRATS ET DISTRIBUTION TISSULAIRE DES DIFFERENTES PCs ET PHENOTYPE DES MODELES MURINS KO.....	44
TABLEAU 3 : SECRETION DES CYTOKINES PAR LES MACROPHAGES PC1/3 KD SELON LE LIGAND DU TLR4 UTILISE ET L'IMPACT D'UN ENVIRONNEMENT IMMUNOSUPPESSEUR (D'APRES DUHAMEL ET AL. 2015 ET DUHAMEL ET AL., 2018). .....	81
TABLEAU 4 : COMPLEMENTARITE DE L'INHIBITEUR DE PCs ET DU POLY (I:C) DANS UNE STRATEGIE THERAPEUTIQUE DE REPROGRAMMATION DES MACROPHAGES AU SEIN DE GLIOME. ....	155

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>ACTH :</b>	Adrenocorticotropique hormone
<b>ADAM :</b>	A disintegrin and metalloproteinase
<b>AP-1 :</b>	Protéine activatrice 1
<b>BAFF :</b>	B-cell activating factor
<b>BHE :</b>	Barrière Hémato-Encéphalique
<b>BMP10 :</b>	Bone morphogenetic protein 10
<b>CAPG :</b>	Macrophage-capping protein
<b>CAR-T :</b>	Chimeric antigen receptor
<b>CD :</b>	Cellules dendritiques
<b>CLR :</b>	C-type lectin receptors
<b>CMH :</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CSF-1 :</b>	Facteur de stimulation des colonies de macrophages
<b>CTLA-4 :</b>	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
<b>DAMP :</b>	Damage-associated molecular patterns
<b>DAP :</b>	2,6-Diaminopurine
<b>EGFR :</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>EMP :</b>	Erythromyeloid progenitors
<b>Eph :</b>	Ephrin
<b>FasL :</b>	Fas ligand
<b>FISH :</b>	Hybridation fluorescente <i>in situ</i>
<b>GBM :</b>	Glioblastome
<b>GDF :</b>	Growth differentiation factor
<b>GM-CSF :</b>	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
<b>HCS :</b>	Hematopoietic stem cells
<b>HER-2 :</b>	Human epidermal growth factor receptor-2
<b>HIF :</b>	Hypoxia inducible factors
<b>ICAM :</b>	Molécule d'adhésion cellulaire 1
<b>IDH :</b>	Isocytrate déshydrogenase
<b>IFN-<math>\gamma</math> :</b>	Interféron $\gamma$
<b>IGF-II :</b>	Insulin-like growth factor-II

<b>IL :</b>	Interleukine
<b>iNOS :</b>	Inductive nitric oxyde synthase
<b>IRM :</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>KD :</b>	Knock down
<b>KO :</b>	Knock out
<b>LDL :</b>	Lipoprotéines de basse densité
<b>LDLR :</b>	Récepteur au lipoprotéines de basse densité
<b>Lrrfip 1 :</b>	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1
<b>MAPK :</b>	Protéine kinase associée aux microtubules
<b>MCP-1 :</b>	Monocyte chemoattractant protein
<b>MDSC :</b>	Myeloid-derived suppressor cells
<b>MGMT :</b>	O6-methylguanine-DNA methyltransferase
<b>MIF :</b>	Macrophage migration inhibitory factor
<b>MMP :</b>	Métalloprotéase matricielle
<b>Myd88 :</b>	Myeloid differentiation response 88
<b>NF-κB :</b>	Nuclear factor-kappa B
<b>NMD :</b>	Nonsense-mediated mRNA decay
<b>NOD :</b>	Nucleotide-binding oligomerization domain
<b>NT :</b>	Non target
<b>OMS :</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>PACAP :</b>	Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
<b>PAMP :</b>	Pathogen-associated molecular patterns
<b>PCSK :</b>	Proprotein convertase subtilisin/kexin
<b>PD-1 :</b>	Programmed cell death 1
<b>PD-L1 :</b>	Programmed cell death ligand 1
<b>PDGF :</b>	Platelet-derived growth factor
<b>PENK :</b>	Proenkephaline
<b>PI3K :</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>POMC :</b>	Pro-opiomelanocortin
<b>PRRs :</b>	Pattern recognition receptors)
<b>RTK :</b>	Recepteur tyrosine kinase

<b>SDF-1 :</b>	Stroma-derived factor
<b>shRNA :</b>	Short hairpin RNA
<b>SKI-1 :</b>	Subtilisin kexin isozyme 1
<b>SNC :</b>	Système nerveux central
<b>SREBP :</b>	Sterol regulatory element-binding proteins
<b>STAT3 :</b>	Signal transducer and activator of transcription 3
<b>TERT :</b>	Telomerase reverse transcriptase
<b>TIL :</b>	Tumor-infiltrating lymphocytes
<b>TLRs :</b>	Toll-like receptors
<b>TMZ :</b>	Témozolomide
<b>TNF-<math>\alpha</math> :</b>	Tumor necrosis factor
<b>TRIF :</b>	TIR-containing adaptator
<b>VCAM :</b>	Vascular cell adhesion molecule
<b>VEGF :</b>	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

## AVANT-PROPOS

---

Selon le Global Cancer Observatory, près de 300.000 nouveaux cas de tumeurs cérébrales ont été recensés à travers le monde en 2018 (GLOBOCAN, 2018). Les gliomes, ou tumeurs gliales, représentent plus de 80% des tumeurs cérébrales malignes (Ostrom et al., 2019). Différents grades sont décrits en fonction de la morphologie, du degré de malignité et, plus récemment, du profil moléculaire de la tumeur (Louis et al., 2016). Les glioblastomes sont le grade le plus commun et le plus agressif des gliomes. Ce sont des tumeurs très hétérogènes, hautement invasives, immunosuppressives et incurables. Malgré les différents traitements utilisés tels que la résection chirurgicale, la chimiothérapie et la radiothérapie, la médiane de survie des patients atteints de glioblastome n'excède pas 17 mois. Pour pallier à ce mauvais pronostic, de nouveaux traitements et de nouvelles stratégies thérapeutiques émergent et sont à l'étude. Malheureusement, la majorité d'entre elles ont échoué en essais cliniques de phase II puisqu'aucune ne conduit à une augmentation significative de la survie des patients (Taylor et al., 2019). Les caractères immunosuppresseurs et invasifs des glioblastomes, rendent impossible leur éradication totale. En effet, les cellules cancéreuses parviennent à contourner le système immunitaire afin d'échapper à la réponse immunitaire. De plus, la tumeur utilise les cellules immunitaires pour accroître son développement. L'immunothérapie apparaît alors comme une nouvelle approche thérapeutique. Plusieurs stratégies ont vu le jour, allant de la vaccination à la thérapie cellulaire en passant par l'inhibition de points de contrôle de l'immunité. Toutes ces stratégies ont en commun l'objectif de contrecarrer l'immunosuppression présente au sein de la tumeur et ainsi la rendre vulnérable au système immunitaire. Pour le moment, bien que quelques stratégies soient encore à l'étude, aucune ne présente une avancée majeure dans le traitement des glioblastomes (Weller and Le Rhun, 2019).

Par leur rôle clé dans l'immunité innée, leur plasticité et étant l'une des cibles principales des cellules cancéreuses, les macrophages sont une cible de choix des nouvelles stratégies thérapeutiques émergentes. Les macrophages infiltrés au sein de la tumeur, appelés « Tumor Associated Macrophages » (TAMs), représentent une grande part des cellules du microenvironnement tumoral. Ils correspondent, par exemple, à 30% de la masse tumorale d'un glioblastome. De plus, une haute densité de macrophages est souvent associée à un mauvais pronostic dans plusieurs types de cancers, dont le glioblastome (Franklin and Li,

2016). En effet, certaines cellules constitutives de la tumeur vont sécréter des facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 ou le TGF- $\beta$  ainsi que des signaux de dangers endogènes comme la calréticuline et HMGB1. L'ensemble de ces facteurs créé un environnement immunosuppresseur qui a la capacité d'orienter les macrophages infiltrés vers un phénotype avantageux pour le développement tumoral (Mantovani et al., 2017). Les macrophages sont une population cellulaire très hétérogène et présentent une plasticité phénotypique leur permettant de répondre à un grand éventail de stimuli et de conditions environnementales (Franklin and Li, 2016). Deux phénotypes majoritaires ont été décrits *in vitro* : (i) le phénotype pro-inflammatoire et anti-tumoral M1 caractérisé, entre autres, par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL6, l'IL2 ou encore le TNF- $\alpha$  et (ii) le phénotype anti-inflammatoire et pro-tumoral M2 qui, quant à lui, est caractérisé par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL4, le TGF- $\beta$  ou l'IL10. Les macrophages pro-inflammatoires M1 et anti-inflammatoires M2 ont des rôles opposés au sein de la tumeur. Tandis que les premiers inhibent la croissance tumorale, les seconds vont la promouvoir en participant à de nombreux processus du développement tumoral (Mantovani et al., 2017) et en inhibant la réponse anti-tumorale des cellules immunitaires telles que les lymphocytes T, B et les cellules natural killer (Schmid and Varner, 2010). Il est donc indispensable que les macrophages conservent un phénotype M1, anti-tumoral, au sein des tumeurs pour qu'ils puissent exercer leurs fonctions phagocytaires et réactiver la réponse cytotoxique des cellules T.

L'objectif de ce projet porte donc sur la possibilité de réactiver le système immunitaire au sein même de la tumeur. La stratégie envisagée implique l'inhibition d'enzymes appelées proprotéines convertases (PCs). Les PCs sont une famille de 9 protéases à sérine comprenant PC1/3, PC2, furine, PC4, PC5/6, PACE4, PC7, SKI-I et PCSK9 codées par 9 gènes *pcsk1* à 9. Leur principale fonction est le clivage de précurseurs protéiques entraînant ainsi l'activation, l'inactivation ou encore des changements fonctionnels des protéines cibles. Certaines d'entre elles, telles que la furine, PC5/6 ou PC7 ont une expression ubiquitaire (Seidah and Prat, 2012). D'autres ont une expression plus spécifique, à l'instar de PC1/3 qui est exprimée par les cellules neuroendocrines et par les cellules du système immunitaire comme les macrophages (Lansac et al., 2006). Ces enzymes sont déterminantes dans le maintien de l'homéostasie mais également dans le développement tumoral. En effet, certaines PCs sont connues pour être surexprimées dans différents types de cancers telles que la furine et PACE4 dans le cancer du

poumon (Bassi et al., 2000) ou encore PC1/3 et PC2 dans les adénomes hypophysaires (Artenstein and Opal, 2011). De plus, un grand nombre de leurs substrats est impliqué dans la croissance tumorale tels que des facteurs de croissance qui facilitent la prolifération cellulaire ou encore des enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire, facilitant ainsi l'invasion des tissus environnants (Artenstein and Opal, 2011). Des études protéomiques réalisées au sein du laboratoire ont révélé une augmentation de la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par la lignée de macrophages alvéolaires de rat NR8383 invalidée pour PC1/3 (PC1/3 Knock Down, KD). Cet effet est accentué par l'activation des récepteurs TLRs, notamment du récepteur TLR4. L'activation de ce récepteur dans ces macrophages conduit également à la sécrétion de facteurs chimioattractifs de lymphocytes T auxiliaires, responsables de l'activation d'autres types de cellules immunitaires. Des facteurs anti-tumoraux, actifs contre les lignées cellulaires humaines de cancers du sein SKBR3 et de l'ovaire SKOV3, sont aussi sécrétés par les macrophages PC1/3 KD suite à une stimulation au LPS. (Duhamel et al., 2015, 2016b, 2016a). Ces observations laissent supposer que l'inhibition de PC1/3 couplée à la stimulation du TLR4 conduit à l'induction d'un phénotype pro-inflammatoire et anti-tumorale des macrophages. PC1/3 et les TLRs sont ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques pour la reprogrammation des macrophages au sein des tumeurs. Cette stratégie thérapeutique pourrait donc être adéquate dans le cadre des gliomes dans lesquels la proportion de macrophages est très élevée et associée à un mauvais pronostic (Chen et al., 2017).

Ce projet a donc pour ambition la reprogrammation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire et anti-tumoral dans le cadre des gliomes.

Ainsi, dans la première partie de ce projet, l'inhibition de PC1/3 associée à la stimulation du TLR4 a été testée en tant que thérapie potentielle contre les gliomes. Pour cela, la lignée NR8383 invalidée ou non pour PC1/3 a de nouveau été utilisée. Le LPS, très immunogène, ne peut être utilisé en thérapie. Il a donc été remplacé par un ligand stérile du TLR4, le Paclitaxel. L'impact de ce dernier sur le protéome et l'activité sécrétoire de ces macrophages a été exploré par des études protéomiques. Des tests biologiques *in vitro* ont ensuite été réalisés sur la lignée cellulaire de gliome de rat C6 et ce, en culture 2D et sur des modèles 3D de co-culture avec les macrophages. Ces tests ont permis de mettre en évidence l'effet anti-tumoral qu'exerce le Paclitaxel sur la croissance et l'invasion des cellules de gliomes de manière directe et indirecte en induisant la sécrétion de protéines pro-



inflammatoires et anti-tumorales par les macrophages. Enfin, l'étude approfondie du sécrétome des macrophages a permis de démontrer que les vésicules extracellulaires qu'il contient porte cette activité anti-tumorale. C'est ainsi qu'est né le projet MACBETH (Macrophages BoostEd Therapy).

De récents travaux ont démontré que PC1/3 n'est pas la seule PC impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire. En effet, la furine présente des fonctions anti-inflammatoires. Son inhibition au sein de macrophages conduit à l'augmentation de l'expression de gènes codants pour *Nos2*, marqueur de phénotype pro-inflammatoire et pour les cytokines pro-inflammatoires *Tnf- $\alpha$*  et *Il-6* (Cordova et al., 2016). De plus, l'unité a révélé l'implication de plusieurs PCs dans différents types de cancers, notamment de PACE4 dans le cancer de la prostate (D'Anjou et al., 2011) et de l'ovaire (Longuespée et al., 2014). Face à ces observations, une stratégie d'inhibition de plusieurs PCs avec l'utilisation d'un inhibiteur commercial ciblant plusieurs enzymes (Furine, PACE4, PC1/3, PC4, PC5/6) a été envisagée. L'objectif de la deuxième partie de ce projet est d'impacter à la fois les cellules cancéreuses et les macrophages à travers l'inhibition de PC1/3, de la furine et d'autres PCs. Les lignées cellulaires C6 et NR8383 de type sauvage ont été utilisées pour cette étude. Dans un premier temps, l'activité anti-tumorale de l'inhibiteur de PCs a été mise en évidence par des tests de prolifération et d'invasion sur des modèles de culture 2D et de co-culture 3D. L'impact de cet inhibiteur sur les profils protéiques des cellules cancéreuses et des macrophages, en co-cultures ou non, a été étudié par analyses protéomiques. Une orientation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire et anti-tumoral a ainsi pu être observée. De plus, l'inhibition de PCs au sein des cellules cancéreuses diminue leur propriété immunosuppressive.

La dernière partie de ce projet s'est focalisée sur l'amplification du ralentissement du développement tumoral et de la reprogrammation des macrophages provoquée par l'inhibiteur de PCs. En effet, de précédentes études ont démontré que l'activité anti-tumorale exercée suite à l'inhibition de PC1/3 au sein des macrophages est accentuée lorsque le TLR4 est activé (Duhamel et al., 2015, 2018). Ainsi, l'inhibiteur de PCs a été couplé avec le Poly (I:C), ligand du TLR3 ayant déjà démontré une activité anti-tumorale au sein de gliomes (Kees et al., 2012). Des analyses protéomiques ont, comme précédemment avec l'inhibiteur de PCs, permis d'étudier le profil protéique des macrophages après une stimulation au Poly (I:C)

associée ou non à l'inhibiteur de PCs. L'efficacité de l'association de l'inhibiteur de PCs et de la stimulation du TLR3 par le Poly (I:C) a ensuite été examinée par des tests *in vitro* de prolifération et d'invasion sur des modèles de culture 2D et de co-culture 3D. Ceci a permis de mettre en évidence l'activité anti-tumorale de l'inhibiteur de PCs et des facteurs sécrétés par les macrophages stimulés au Poly (I:C). L'ensemble des résultats de ce projet a permis de mettre en évidence l'importance des PCs, notamment de PC1/3 et de la furine, dans l'orientation des macrophages vers un phénotype M1 pro-inflammatoire et anti-tumoral. L'inhibition de PCs par un inhibiteur peptidomimétique associée à la stimulation du TLR3 semble être une stratégie anti-cancéreuse intéressante dans le cadre des gliomes.

### 1 Les glioblastomes

Il existe plus de 100 types distincts de tumeurs cérébrales primitives du système nerveux central (SNC) (Louis et al., 2016). Les tumeurs cérébrales les plus fréquentes sont les méningiomes, les tumeurs de la tige pituitaire et les glioblastomes. Les gliomes, ou tumeurs gliales, sont des tumeurs très hétérogènes. Elles sont caractérisées par une morbidité et une mortalité très élevées et elles représentent plus de 80% des tumeurs cérébrales malignes (Ostrom et al., 2019). Différents grades sont décrits en fonction de la morphologie et du degré de malignité. Les glioblastomes (GBMs), grade le plus élevé des gliomes, sont les tumeurs primaires cérébrales les plus fréquentes et les plus létales. Ils représentent 75% des gliomes et les patients présentent une médiane de survie de 17 mois (Molinaro et al., 2019). Ce sont des tumeurs très invasives, récurrentes et essentiellement incurables. Ils représentent donc un enjeu thérapeutique majeur.

#### 1.1 Epidémiologie

Les gliomes représentent 25,5% des tumeurs du SNC et plus de 80% des tumeurs malignes du SNC. Environ 60% des gliomes sont retrouvés dans les lobes frontal, temporal, pariétal et occipital. Le GBM représente 57% des gliomes et presque la moitié des tumeurs malignes du SNC (Figure 1). Un total de 59 164 patients atteints de GBM a été enregistré entre 2012 et 2016 aux Etats-Unis, avec une moyenne annuelle de 11 833 cas et un taux d'incidence de 3,22 cas pour 100 000 habitants (Ostrom et al., 2019).

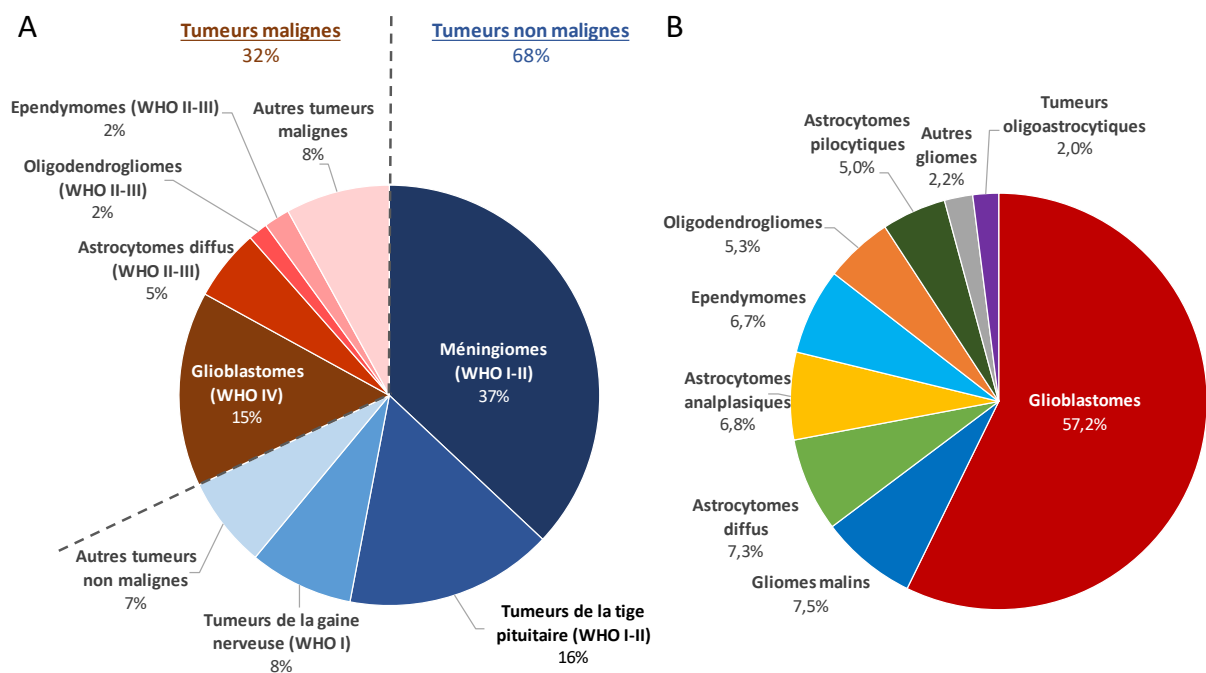


Figure 1 : Représentation simplifiée de l'incidence des tumeurs cérébrales (A) et des tumeurs gliales malignes (B) chez l'adulte adaptée de Lapointe, Perry, and Butowski 2018 et Ostrom et al. 2019.

Le taux d'incidence des GBMs diffère selon l'âge, le sexe et l'origine ethnique. Il augmente avec l'âge, comprenant un pic entre 65 et 84 ans, la médiane d'âge de diagnostic étant de 65 ans. Les hommes présentent 1,58 fois plus de risques que les femmes de développer un GBM et ce, quel que soit l'âge (Ostrom et al., 2019). Une différence évidente est également constatée entre les différentes origines ethniques. En effet, les populations européennes et américaines présentent deux fois plus de risque que les populations africaines et asiatiques de développer un GBM (Molinaro et al., 2019).

Ces nombreuses différences d'incidence suggèrent une implication génétique et environnementale dans le développement de tumeurs cérébrales telles que les GBMs.

## 1.2 Physiopathologie

### Facteurs de risques

Les facteurs de risques influant sur le développement des gliomes sont très peu décrits. Seuls quelques facteurs environnementaux ont été explorés. L'exposition aux rayons ionisants est le seul facteur environnemental non controversé à ce jour. En effet, une exposition du cerveau à des rayons ionisants, surtout durant l'enfance, augmenterait le risque de développer un gliome de 2,6%. Ces observations ont été réalisées sur des patients traités avec

de faibles doses de radiothérapie pour la teigne du cuir chevelu et sur des enfants ayant subi plusieurs scans du cerveau. Les individus exposés aux rayons ionisants suite aux bombardements atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki présentent également une augmentation du risque de développer un gliome (Vienne-Jumeau et al., 2019).

D'autres facteurs environnementaux restent à l'étude comme les radiofréquences émises par divers appareils tels que les téléphones mobiles, les radios, les réseaux sans fil ou encore les micro-ondes. Beaucoup de ces recherches se focalisent sur le téléphone mobile qui est utilisé à proximité de la tête et donc du cerveau (Vienne-Jumeau et al., 2019). Cependant, malgré ces nombreuses études, aucun rôle des radiofréquences n'a pu être établi dans le développement de gliomes à ce jour (Lapointe et al., 2018).

Les nitrosamines sont d'autres facteurs pouvant être liés à l'étiologie de la pathologie. Ce sont des composés pouvant être retrouvés dans le tabac, les cosmétiques ou encore dans les aliments traités avec du nitrite de sodium comme la charcuterie ou le jambon. Quelques médicaments comme les antihistaminiques ou certains diurétiques seraient également source de nitrosamines. Ces composés, classés en tant que cancérogènes probables, ont la capacité de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE). C'est pourquoi, ils sont à l'étude en tant que facteur de risque potentiel dans le développement de gliomes (Vienne-Jumeau et al., 2019).

Les pesticides, étant composés de nombreuses substances potentiellement cancérogènes telles que l'arsenic ou le glyphosate, sont également à l'étude. Des études ont démontré une augmentation de 30% du risque de développer un gliome chez les agriculteurs. Cependant, les pesticides n'ont pour le moment pas été identifiés comme étant un facteur de risque puisque les agriculteurs sont également exposés à plusieurs autres facteurs environnementaux (Vienne-Jumeau et al., 2019).

D'autres facteurs ont été suggérés comme la pollution extérieure, une susceptibilité génétique, ou encore les infections virales notamment par le cytomégalovirus retrouvé dans plusieurs GBMs. Cependant, les rayons ionisants sont aujourd'hui le seul facteur de risque de développement de gliome établi (Wirsching et al., 2016).

## Symptômes

Les manifestations cliniques des gliomes varient selon la taille et la localisation de la tumeur. En général, les patients présentent une augmentation de la pression intracrânienne qui est à l'origine de maux de tête, de nausées ou encore de crises d'épilepsie. D'autres symptômes, dépendant de la zone du cerveau atteinte, peuvent se manifester. Ainsi, les patients ayant un gliome localisé dans le lobe frontal présentent de la fatigue ou de la dysphasie. Des symptômes tels que des engourdissements, un déficit de l'attention ou une désorientation spatiale sont observés lorsque le lobe pariétal est atteint. Des troubles visuels peuvent également être constatés lorsque la tumeur affecte le lobe temporal ou occipital. Des changements de personnalité, des troubles de l'humeur et des troubles de la mémoire sont rapportés lorsque le gliome se développe au niveau du lobe temporal ou préfrontal (Lapointe et al., 2018).

### 1.3 Diagnostic

#### 1.3.1 L'imagerie médicale

En cas de suspicion d'une tumeur cérébrale, basée sur l'observation de déficits neurologiques décrits ci-dessus, un scanner ou une imagerie par résonance magnétique (IRM) sont réalisés pour poser un premier diagnostic. La présence d'un GBM se traduit par une augmentation de contraste suite à l'injection de gadolinium (Figure 2). Ces GBMs sont souvent accompagnés d'un œdème, d'une hémorragie et d'une zone nécrotique (Davis, 2016). Cependant, ils sont très hétérogènes et présentent une forme irrégulière. Leur physionomie peut donc varier sur les images. Ainsi, il est très difficile de déterminer plus précisément le degré de malignité ou le grade d'une tumeur cérébrale uniquement par imagerie. C'est pourquoi une suspicion clinique et radiologique doit systématiquement être confirmée par une analyse histologique (Figure 2). L'observation de nécrose et de prolifération microvasculaire est caractéristique des GBMs. Il existe également de nombreux marqueurs moléculaires permettant d'affiner le diagnostic tels que les mutations touchant les gènes codant pour les isocitrate déshydrogénases (IDH) 1 et IDH2, les codélétions affectant les chromosomes 1p et 19q ou encore les mutations des gènes codants pour les variants de l'histone H3 (*i.e* *H3F3A* ou *HIST1H3B*) (Reifenberger et al., 2017). La détermination du statut de la mutation IDH et de la codélétion 1p19q permettent notamment de classer les gliomes (Louis et al., 2016).

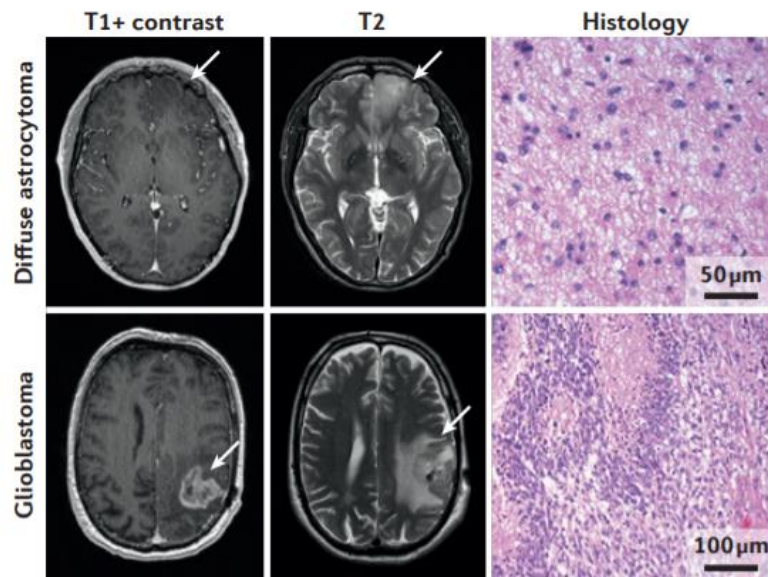


Figure 2 : Imagerie médicale et coloration histologique à l'hématoxyline et éosine d'un astrocytome diffus et d'un glioblastome (Weller et al., 2015).

Les flèches indiquent la position de la tumeur. L'anneau au centre du glioblastome en « T1 + contrast » reflète la zone nécrotique et la zone diffuse visible en T2 correspond à un œdème. L'histologie permet de mettre en évidence une augmentation de la densité cellulaire au sein du glioblastome, grade IV, par rapport à l'astrocytome diffus grade II.

### 1.3.2 Les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires utilisés dans la classification OMS 2016 sont essentiels pour établir un diagnostic. C'est le cas des mutations *idh1/idh2* ou encore de la co-délétion 1p/19q qui peuvent également intervenir dans la prise de décisions thérapeutiques.

Mutations affectant les gènes codant pour les isocitrates déshydrogénases IDH1 et IDH2

L'isocitrate déshydrogénase (IDH) est une oxydoréductase impliquée dans les processus métaboliques cellulaires comme le cycle de Krebs. Il existe trois isoformes : IDH1 qui est cytoplasmique, IDH2 et IDH3 qui sont mitochondriales (Krell et al., 2011). La mutation des gènes *idh1* et *idh2* est une anomalie précoce dans le développement des gliomes et est très fréquente dans les gliomes de bas grade. Ainsi, elle est retrouvée dans 70% des gliomes de grade II et III et uniquement dans 5% des GBMs. La mutation la plus fréquente est la substitution d'une arginine sur le codon 132 du gène *idh1*. La présence de mutations *idh1/idh2* est associée à un pronostic relativement favorable (Lapointe et al., 2018). Cette mutation est

délectable très rapidement par séquençage et est très largement utilisée pour affiner non seulement le diagnostic mais aussi la classification des gliomes (Louis et al., 2016).

#### Co-délétion des régions chromosomiques 1p/19q

La codélétion affectant le bras court 1p et le bras long 19q est caractéristique des oligodendrogliomes. Elle est associée à un pronostic favorable et à une meilleure réponse à la chimiothérapie (Lapointe et al., 2018). Cette co-délétion est principalement détectée par hybridation *in situ* fluorescente (FISH) (Reifenberger et al., 2017) et est utilisée dans la nouvelle classification des gliomes en combinaison avec les mutations *idh1/idh2* (Louis et al., 2016).

#### Méthylation du promoteur de l'O6-méthylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)

L'O6-méthylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) est une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN. Elle retire un groupe alkyl sur les guanines et prévient l'apoptose. Ainsi, cette enzyme confère une résistance aux agents alkylants tels que le Témazolomide (TMZ) agent thérapeutique couramment utilisé contre les gliomes. La méthylation du promoteur du gène *mgmt* conduit à une sous-expression de l'enzyme qui résulte en une diminution de la réparation de l'ADN et augmente ainsi l'efficacité des agents alkylants. La méthylation du promoteur de MGMT est retrouvée dans environ 40% des GBMs et est très utilisée dans le choix de thérapie à appliquer (Ludwig and Kornblum, 2017).

#### La sur-expression du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR)

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est un activateur de plusieurs processus biologiques tels que la prolifération ou encore la migration des cellules cancéreuses, deux processus clés dans le développement tumoral. L'EGFR est sur-exprimé dans environ 30% des GBMs et est souvent associé aux tumeurs de haut grade. Une délétion du gène *egfr*, nommée EGFRvIII, est retrouvée dans 50% des GBMs présentant une sur-expression de l'EGFR. Cette mutation est à l'origine d'une activation constitutive du récepteur (Ludwig and Kornblum, 2017).

#### La télomérase reverse transcriptase (TERT)

Les télomérases sont des ADN polymérases qui interviennent dans la conservation des longueurs des chromosomes durant la réplication de l'ADN. Elles ont un rôle clé dans



l'immortalisation cellulaire et l'oncogenèse. La télomerase reverse transcriptase (TERT) est une des sous-unités catalytiques des télomérases. Les mutations du promoteur de TERT conduisent à une surexpression du gène et une activité élevée de l'enzyme permettant ainsi aux cellules cancéreuses d'échapper à la senescence et de proliférer indéfiniment. Ces mutations sont devenues les marqueurs moléculaires les plus communs des gliomes. Elles sont retrouvées dans plus de 90% des oligodendrogliomes présentant une mutation *idh* et une codélétion 1p/19q ainsi que dans plus de 70% des GBMs sans mutation *idh* (Weller et al., 2015).

Les gliomes sont des tumeurs inter- et intra- hétérogènes. Il est donc très difficile de les classer sur leur physionomie. Les marqueurs cités ci-dessus ont permis d'établir une classification précise de ces tumeurs cérébrales.

#### 1.4 Classification

En 2007, une classification des gliomes en différents grades numérotés de I à IV a été décrite selon la morphologie du tissu et le degré de malignité (Louis et al., 2007). Plusieurs catégories ont pu être définies sur la base de ces caractéristiques. Les astrocytomes diffus et anaplasiques, composés d'astrocytes, sont respectivement de grade II ou III. Il en va de même pour les oligodendrogliomes, composés d'oligodendrocytes, diffus (grade II) ou anaplasiques (grade III). Les oligoastrocytomes sont des tumeurs mixtes composées à la fois d'astrocytes et d'oligodendrocytes. Ils sont classés en grade II. Enfin, le grade IV, qui est le plus élevé, regroupe les GBMs. Ils sont caractérisés par la présence de tissu nécrosé, de prolifération microvasculaire et de cellules hautement anaplasiques (Louis et al., 2007). Cependant, ce système de classification possède une forte variabilité inter- et intra-observateurs. En effet, les gliomes sont très hétérogènes et leurs aspects histologiques restent donc difficilement interprétables. Il existe, au sein d'un même sous-groupe de gliomes, des différences non négligeables des critères cliniques tels que l'agressivité de la tumeur, sa réponse au traitement et la survie des patients. Une évolution de la méthode de classification des gliomes était donc nécessaire.

Ces dernières années, de nombreuses découvertes ont permis l'évolution de cette classification. Des données moléculaires et génétiques sont venues compléter les critères histologiques de la classification existante. La classification des gliomes selon l'OMS 2016

combine à la fois le phénotype et le génotype des tumeurs. Ainsi, la morphologie de la tumeur, les mutations des gènes *idh1* et *idh2* ainsi que la co-délétion des chromosomes 1p19q sont les critères retenus pour la classification des gliomes (Louis et al., 2016).

La nouvelle classification définit cinq sous-groupes de gliomes : (1) les GBMs *idh*-mutés, (2) les GBMs *idh*-non mutés, (3) les astrocytomes diffus et anaplasiques *idh*-mutés, (4) les astrocytomes diffus et anaplasiques *idh*-non mutés et enfin (5) les oligodendrogliomes caractérisés par la mutation *idh* et la co-délétion des chromosomes 1p et 19q (Figure 3). Un sixième groupe réunit les gliomes pour lesquels les données génétiques ne sont pas disponibles. Les astrocytomes diffus (grade II) et astrocytomes anaplasiques (grade III) sont maintenant divisés en *idh* mutés qui sont majoritaires et *idh* non mutés qui sont plus rares. Le diagnostic des oligodendrogliomes est maintenant réalisé sur l'observation de la mutation *idh* associée à la co-délétion 1p/19q. Le diagnostic d'oligoastrocytomes est maintenant fortement déconseillé, les tumeurs pouvant être classifiées en tant qu'astrocytomes ou oligodendrogliomes selon la mutation *idh* et la co-délétion 1p/19q (Louis et al., 2016). Les GBMs sont divisés en deux sous-groupes : les GBMs *idh*-non mutés qui représentent 95% des cas et les GBMs *idh*-mutés. De plus, les GBMs peuvent être divisés en tumeurs primaires et secondaires. Les GBMs secondaires, à la différence des GBMs primaires, se développent à partir de gliomes de grade II ou III et sont généralement plus sensibles aux thérapies. Les analyses de l'expression d'ARNm ont également mis en évidence 4 sous-types distincts de glioblastomes : proneural, neural, classique et mésenchymateux (Verhaak et al., 2010). Cette classification génomique confirme une hétérogénéité au sein des glioblastomes mais reste jusqu'à présent peu utilisée en routine clinique. De plus, de récentes techniques d'analyses du méthylome ont été développées et devraient ouvrir de nouvelles perspectives (Capper et al., 2018).

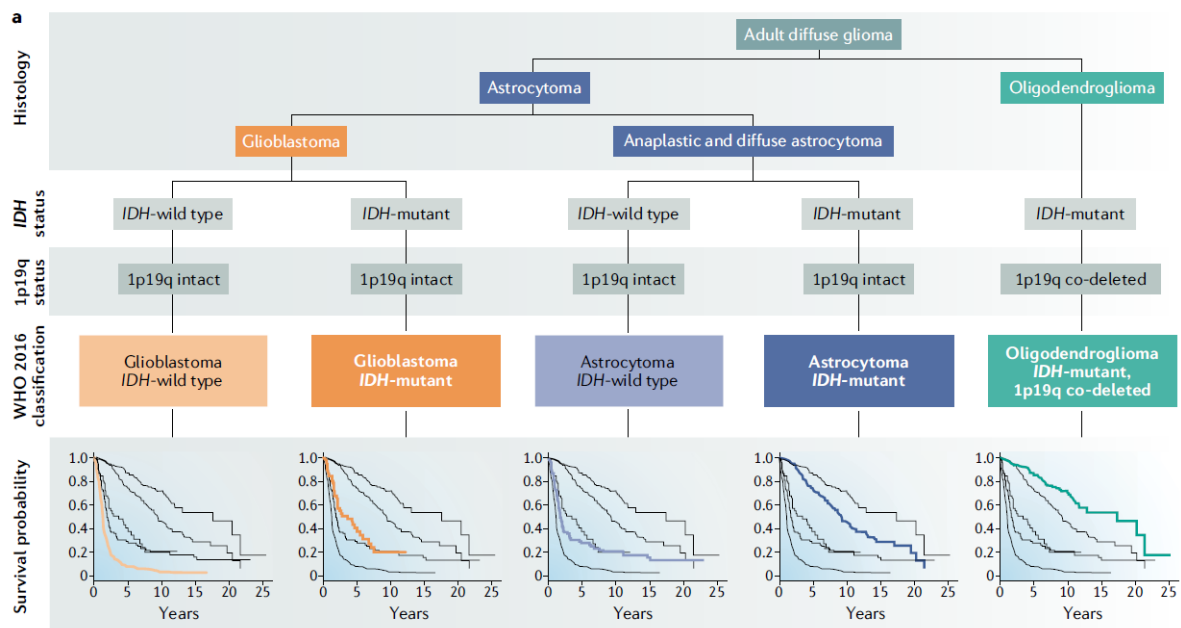


Figure 3 : Représentation simplifiée de la classification de l'OMS 2016 des gliomes chez l'adulte associée à la probabilité de survie (Molinari et al., 2019).

Cette nouvelle méthode de classification a permis d'améliorer l'objectivité et la précision du diagnostic. De plus, suite aux modifications de la classification de l'OMS en 2016, de nouvelles normes européennes sont parues afin de guider le traitement des gliomes (Weller 2017). De nouvelles approches sont en cours de développement afin d'améliorer la connaissance des tumeurs cérébrales et ainsi leur classification et leur prise en charge. De plus, les nouvelles stratégies thérapeutiques ne tiennent plus compte uniquement du grade tumoral mais aussi des caractéristiques moléculaires de la tumeur. Le développement de nouveaux outils de prise en charge est un enjeu majeur dans cette population.

## 1.5 Traitement

Le traitement des tumeurs cérébrales rencontre divers défis, notamment la présence de la BHE qui représente un filtre extrêmement sélectif. La localisation, la très grande capacité invasive et la résistance aux thérapies des GBMs ajoutent de nouveaux obstacles pour leur traitement. A ce jour, la résection chirurgicale suivie d'une radio-chimiothérapie est le seul traitement disponible. L'efficacité des traitements est évaluée le plus couramment par IRM.

### Chirurgie

Le traitement initial, suite au diagnostic d'une tumeur cérébrale, est la résection chirurgicale. Néanmoins, les GBMs étant des tumeurs très invasives, une résection complète

est très difficile à réaliser. D'autant plus qu'une résection trop radicale pourrait provoquer des déficits neuronaux et conduire à une perte de motricité, des troubles du langage ou un déficit sensoriel selon la localisation de la tumeur. La résection chirurgicale n'est donc pas une approche curative bien qu'elle permette de réduire les symptômes et d'obtenir de meilleurs résultats aux chimiothérapies et radiothérapies administrées suite à la chirurgie (Davis, 2016).

### Chimio radiothérapie

La radiothérapie, accompagnée ou non de chimiothérapie, peut commencer 4 à 6 semaines suivant la chirurgie. Dans certains cas, elle peut être administrée avant la chirurgie. Post-opératoire, elle est très souvent accompagnée de chimiothérapie, généralement avec du Témzolomide (TMZ) (Davis, 2016). Le TMZ est un agent alkylant liposoluble pouvant traverser la BHE. Sa cytotoxicité repose essentiellement sur sa capacité à se lier de manière covalente aux bases de l'ADN. La réplication de l'ADN est ainsi inhibée et des cassures d'un seul ou des deux brins sont générées induisant l'apoptose des cellules (Zhang et al., 2011). Les patients recevant du TMZ en combinaison avec la radiothérapie ont une médiane de survie de 14,6 mois. Ceci est plus élevée que la médiane de survie des patients ne recevant que la radiothérapie (12,1 mois). Cependant, les bénéfices du TMZ sont restreints aux patients présentant une mutation du promoteur de *mgmt*. Cette mutation provoque la sous-expression de MGMT, enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN et interférant avec l'effet du TMZ. La radiothérapie et le TMZ exercent leurs effets thérapeutiques en causant des dommages à l'ADN et une cytotoxicité entraînant l'apoptose des cellules. La sous-expression de MGMT est donc bénéfique pour les patients. La méthylation de *mgmt* est ainsi utilisée comme un marqueur d'efficacité de traitement (Davis, 2016).

### Récurrence

Malgré une résection chirurgicale maximale combinée à une chimio-radiothérapie, 70% des GBMs sont récurrents. Cette résistance aux thérapies appliquées est causée par plusieurs facteurs. La difficulté d'opérer une résection chirurgicale totale de la tumeur augmente le risque de métastases et de récurrence par le biais des cellules cancéreuses restantes. Aussi, les cellules tumorales adaptent leur machinerie cellulaire contre la thérapie. Dans le cas d'une récurrence ou d'une progression de la tumeur, les options thérapeutiques dépendent des thérapies administrées précédemment et des caractéristiques de la tumeur. Les options thérapeutiques sont très limitées et aucun traitement standard n'a été décrit. Une

deuxième résection chirurgicale peut être envisagée selon les symptômes, l'âge du patient et si les risques de complications sont relativement bas (Wirsching et al., 2016). De plus, des radiations additionnelles peuvent être apportées même si, compte tenu de la toxicité de cette méthode, cela reste très controversé.

Plusieurs options de chimiothérapies peuvent être envisagées en seconde ligne de traitement. Les agents alkylants, comme le TMZ employé en première ligne de traitement, sont très utilisés. Par ailleurs, une angiogenèse importante est observée lors du développement des GBMs. Celle-ci est un processus amorcé notamment par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Les anti-angiogéniques, tels que le bevacizumab qui est un anticorps anti-VEGF, peuvent donc être envisagés pour les GBMs récurrents. L'utilisation de celui-ci conduit à une réduction de la perméabilité vasculaire permettant ainsi de limiter la formation de métastases et d'augmenter l'oxygénation. Cependant, plusieurs effets indésirables ont été notés tels que des hémorragies, une diminution de la cicatrisation et des perforations gastro-intestinales (Davis, 2016; Wirsching et al., 2016).

Malgré les différents traitements utilisés tels que la résection chirurgicale, la chimiothérapie et la radiothérapie, la médiane de survie n'excède pas 17 mois et les cas de récurrence sont très nombreux. De nouveaux traitements et de nouvelles stratégies sont donc requis pour contrer cette résistance.

## 1.6 Nouvelles cibles thérapeutiques

Malgré une grande hétérogénéité, trois principales voies de signalisation sont communément dérégulées dans la plupart des GBMs et sont devenues des cibles thérapeutiques. Parmi ces voies, les gènes codant pour les récepteurs tyrosine kinase (RTK) sont surexprimés ou mutés. La voie de signalisation régie par la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) est ainsi suractivée tandis que la voie de signalisation p53 et du rétinoblastome sont inactivées (Taylor et al., 2019). La perturbation de ces voies étant retrouvée dans une grande majorité de GBMs, plusieurs stratégies thérapeutiques les prenant pour cibles ont émergé. Les principales sont regroupées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Principales stratégies thérapeutiques à l'étude pour le traitement des glioblastomes (Taylor et al., 2019).

Cible	Molécules	Réponse
EPHA3	GLP1790	Activité anti-tumorale <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>
	ifabotuzumab	Activité anti-tumorale <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> . Essai clinique phase I en cours
EGFR	Erlotinib	Phase II : activité anti-tumorale limitée
	Gefitinib	Phase II : pas d'augmentation de survie
	Cetuximab	Phase II : activité anti-tumorale limitée
VEGF	Bevacizumab	Utilisé en thérapie contre les cas récurrents de GBMs. N'augmente pas la durée de survie
PI3K	Buparlisib	Phase II : pas d'augmentation de survie
	Sonolisib	Phase II : pas d'augmentation de survie

### Les inhibiteurs du récepteur EphA3

Les récepteurs Ephrin (Eph) sont des RTK impliqués dans plusieurs processus cellulaires durant le développement embryonnaire tels que l'adhésion cellulaire, la migration ou encore la différenciation cellulaire. Ils sont aussi impliqués dans le processus d'angiogenèse à l'âge adulte. Le récepteur EphA3 est sur-exprimé dans 40 à 60% des GBMs et dans la plupart des cas récurrents. Etant associé à une diminution de la survie, il apparaît comme étant une potentielle cible thérapeutique (Taylor et al., 2019). Plusieurs molécules sont donc à l'étude. Un inhibiteur du récepteur EphA3, le GLPG1790, a conduit à une réduction de la prolifération des cellules tumorales *in vitro*. Une augmentation de la survie globale *in vivo* a été mise en évidence sur un modèle de xénogreffes murins, par rapport à l'utilisation de la radiothérapie seule. Cependant, il ne montre pas d'effet bénéfique par rapport à l'utilisation du TMZ (Gravina et al., 2019). Un anticorps monoclonal spécifique du domaine de liaison ligand-récepteur a été développé, l'ifabotuzumab. Un essai clinique en phase I est en cours pour déterminer la dose optimale de l'agent thérapeutique (Offenhäuser et al., 2018). EphA3 semble donc être une cible thérapeutique pleine de promesse pour le traitement des GBMs, incluant les cas récurrents. Des tests cliniques supplémentaires doivent cependant être réalisés.

## Les inhibiteurs de l'EGFR

La sur-expression et les mutations de l'EGFR sont détectés dans 30% des GBMs et sont très souvent indicatrices d'un mauvais pronostic. L'EGFR appartient lui aussi à la famille des RTK et régit plusieurs voies de signalisation. La surexpression ou les mutations de l'EGFR conduisent à une activation constitutive des voies de signalisation anti-apoptotique, de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse (Taylor et al., 2019). Plusieurs inhibiteurs de l'EGFR sont donc à l'étude comprenant l'erlotinib, le gefitinib et le cetuximab. Des essais cliniques en phase II sont en cours pour ces trois agents thérapeutiques. L'erlotinib est un inhibiteur de la phosphorylation intracellulaire de l'EGFR. Il ne démontre aucun effet sur les cas récurrents de GBMs lorsqu'il est utilisé seul mais une augmentation de la survie des patients est observée lorsqu'il est associé au TMZ et à la radiothérapie (Raizer et al., 2010). Le gefitinib, quant à lui, provoque une diminution de la migration et de la prolifération de cellules de GBMs *in vitro* ainsi qu'une augmentation de la survie de souris présentant des xénogreffes. Mais, malgré ces résultats prometteurs, il ne présente aucun effet notable sur la survie des patients, qu'il soit associé ou non à d'autres traitements standards (Uhm et al., 2011). Enfin, le cetuximab est un anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR qui a démontré une inhibition de la prolifération cellulaire *in vitro* sur des cultures primaires issues de GBMs (Griffero et al., 2009). Cependant un essai clinique en phase II a démontré que cet anticorps n'a qu'une activité limitée chez les patients et aucune augmentation significative de la durée de vie n'est observée (Neyns et al., 2009).

## Les inhibiteurs du VEGF

Le VEGF est également surexprimé par les cellules de gliome. Il est associé à un mauvais pronostic et à un degré de malignité élevé. En interagissant avec son récepteur, le VEGF déclenche les processus de prolifération cellulaire et d'angiogenèse, deux processus clés dans le développement tumoral. Les effets de deux inhibiteurs du VEGF ont été étudiés en essai clinique de phase II. Malheureusement, aucun effet anti-tumoral n'a pu être observé suite au traitement avec ces inhibiteurs. En revanche, le bevacizumab qui est un anticorps monoclonal anti-VEGF, a démontré sur plusieurs modèles de GBMs murins une réduction de la croissance tumorale, qu'il soit utilisé seul ou en combinaison avec une radiothérapie. Ces résultats précliniques ont conduit à un essai clinique qui s'est soldé par son utilisation en thérapie (Taylor et al., 2019). Cependant, une analyse de quatre essais cliniques comprenant 607

patients, démontre que l'utilisation du bevacizumab en combinaison avec la chimio-radiothérapie standard augmente la durée d'évolution sans progression, temps pendant lequel la tumeur ne progresse pas. Cependant, il ne permet pas d'augmenter la durée de survie des patients. De plus, plusieurs effets secondaires sont causés par l'utilisation de cet anticorps. Ainsi, la balance entre le faible effet thérapeutique de cet agent et ses effets secondaires questionne l'utilisation du bevacizumab dans le traitement des GBMs (Yang et al., 2017).

D'autres essais cliniques sur des inhibiteurs de RTK ont vu le jour mais tous les agents thérapeutiques testés ont démontré une activité anti-tumorale inexistante ou limitée par rapport aux traitements standards actuels (Taylor et al., 2019).

#### Inhibiteur de la voie de signalisation PI3K

La voie de signalisation PI3K est généralement initiée par l'activation de RTK, comme l'EGFR ou le VEGFR. Cette voie est suractivée dans la plupart des GBMs et joue un rôle clé dans plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et l'angiogenèse. Au vu des effets limités de l'inhibition des RTK observés en essais cliniques, des inhibiteurs de la voie PI3K ont vu le jour. Plusieurs de ces molécules ont démontré leur efficacité dans des études précliniques. Néanmoins, leur effet a été plus minime lors des essais cliniques en phase II (Taylor et al., 2019).

Malheureusement, les nombreuses stratégies thérapeutiques visant le développement tumoral ont, pour la majorité, échouées en essais cliniques de phase II. Les caractères immunosuppresseurs et invasifs des GBMs rendent impossible leur éradication totale. L'immunothérapie apparaît alors comme une nouvelle approche.

### 1.7 L'immunothérapie

Le but des immunothérapies est de générer une réponse immunitaire contre la tumeur. Plusieurs stratégies ont vu le jour incluant l'inhibition de voies de signalisation impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire, des vaccinations ou encore des thérapies cellulaires.

#### Les points de contrôle de l'immunité

Les points de contrôle immunologiques, ou checkpoint en anglais, regroupent des voies de signalisation inhibitrices ou activatrices indispensables dans la régulation du système



immunitaire. Ils permettent de moduler l'activité des cellules immunitaires et ainsi de limiter la durée et l'intensité de la réponse immunitaire. Cela permet de prévenir le risque d'auto-immunité ou, au contraire, de renforcer l'activation du système immunitaire en cas de nécessité. Au sein du microenvironnement tumoral, cette machinerie est détournée par les cellules cancéreuses. Ces dernières sur-expriment des ligands inhibiteurs de la réponse immunitaire et ainsi échappent au système immunitaire. Des inhibiteurs de ces points de contrôle ont été développés afin de renverser l'immunosuppression induite par les cellules cancéreuses et réactiver une réponse immunitaire contre ces dernières (Pardoll, 2016). Les lymphocytes T ont été la cible favorite des différentes stratégies thérapeutiques, notamment celles basées sur l'inhibition de l'interaction PD-1/PD-L1. Le programmed cell death 1 (PD-1) est un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T tandis que le programmed cell death ligand 1 (PD-L1), son ligand, est sécrété par les cellules cancéreuses au sein des GBMs. La liaison PD-1/PD-L1 bloque l'activation des lymphocytes T, empêchant ainsi leur activité cytotoxique et la production de cytokines pro-inflammatoires responsables de l'activation d'autres cellules immunitaires (Heiland et al., 2017). Des inhibiteurs de PD-1 ou de PD-L1 ont ainsi été développés. Les résultats précliniques et les études de toxicité en essai clinique de phase I sont encourageants. Cependant, pour le moment, les essais cliniques de phase II et III n'ont démontré aucun bénéfice de survie des patients atteints de GBMs après le traitement avec un inhibiteur de la voie PD-1/PD-L1 (Mcgranahan et al., 2019). Des essais cliniques sont en cours afin de déterminer le potentiel thérapeutique de l'inhibition des points de contrôle immunitaire combinée à d'autres agents, tels que le TMZ ou la radiothérapie (Weller and Le Rhun, 2019).

## Vaccins

Dans le cadre d'une thérapie anti-cancéreuse, les vaccins ne sont pas préventifs mais utilisés pour déclencher une réponse immunitaire contre la tumeur. Ils peuvent être dirigés contre un antigène tumoral ou encore utiliser la stimulation de cellules immunitaires des patients (Figure 4). A ce jour, l'antigène tumoral le plus prometteur est la forme mutée de l'EGFR, EGFRvIII, reportée dans 30% des GBMs et connue pour être un marqueur de mauvais pronostic. Plusieurs vaccins ont été étudiés et face aux résultats prometteurs observés en phase I et II, l'étude de l'efficacité du rindopepimut s'est poursuivie en phase III. Cependant, aucune amélioration de la survie des patients n'a été démontrée (Weller et al., 2017).

Les vaccins personnalisés sous forme de thérapie cellulaire semblent très prometteurs, notamment la vaccination par les cellules dendritiques (CD). Les CD sont des cellules immunitaires présentatrices d'antigènes qui ont un rôle clé dans l'activation de la réponse immunitaire. Dans la stratégie de vaccination, les monocytes des patients sont isolés, cultivés puis différenciés *in vitro* en CD à l'aide d'un cocktail de différentes cytokines. Ces CD sont ensuite cultivées avec des antigènes tumoraux tels que l'EGFR, EphA3 ou encore un lysat tumoral complet. Elles vont ensuite internaliser ces antigènes pour être capables de les présenter aux lymphocytes T et ainsi déclencher une réponse immunitaire suite à leur injection chez le patient (Schaller and Sampson, 2016). Cette stratégie thérapeutique est en essai clinique de phase III. Les résultats préliminaires très encourageants sembleraient démontrer une augmentation de la survie des patients. La médiane de survie des patients atteint 23,1 mois à partir de la chirurgie au lieu de 17 mois avec les traitements actuels et celle des patients *mgmt* muté atteint 34,7 mois contre 21,2 mois (Liau et al., 2018).

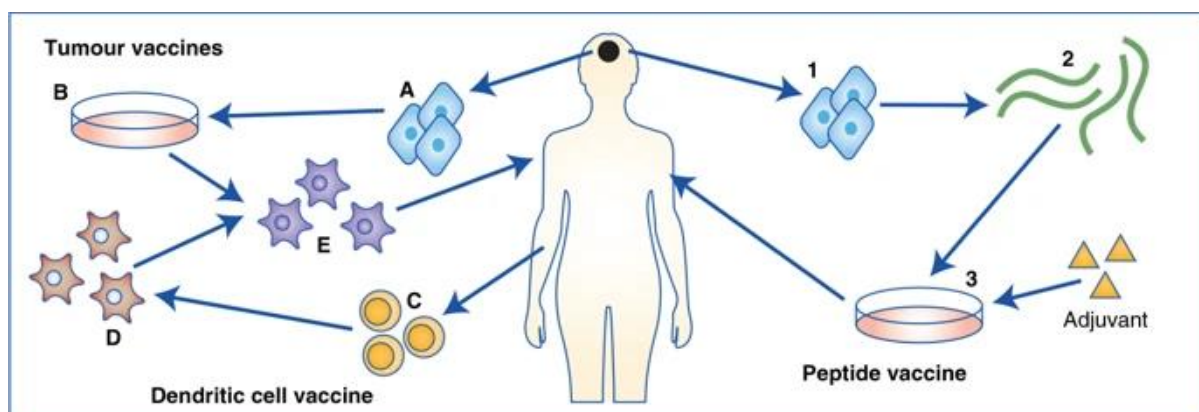


Figure 4 : Stratégie de vaccination pour le traitement des glioblastomes (Brown et al., 2018).

Deux principales approches existent dans le cadre des vaccins personnalisés. Pour la vaccination par cellules dendritiques (partie de gauche), les cellules tumorales sont isolées pendant la chirurgie (A) puis lysées (B). En parallèle, les monocytes du patient sont isolés (C) puis différenciés en cellules dendritiques (D). Enfin, ces cellules dendritiques sont activées avec le lysat tumoral puis injectées chez le patient (E) où elles déclencheront une réponse immunitaire contre les antigènes tumoraux. Dans le cadre de la vaccination par peptide, les cellules tumorales sont isolées après la chirurgie (1) puis lysées. Les antigènes tumoraux sont ensuite isolés (2) puis produits artificiellement (3) avant d'être injectés chez le patient pour induire une réponse immunitaire.

## Les cellules CAR-T

Les cellules CAR-T (Chimeric Antigen Receptor) sont une nouvelle stratégie thérapeutique en plein essor, autorisée dans le traitement des lymphomes et des leucémies (Mcgranahan et al., 2019). Elle repose sur la modification génétique de lymphocytes T pour leur donner la capacité de reconnaître un antigène tumoral et ainsi, une fois injectés au patient, initier la lyse des cellules cancéreuses exprimant cet antigène ainsi qu'une réponse immunitaire (Figure 5).

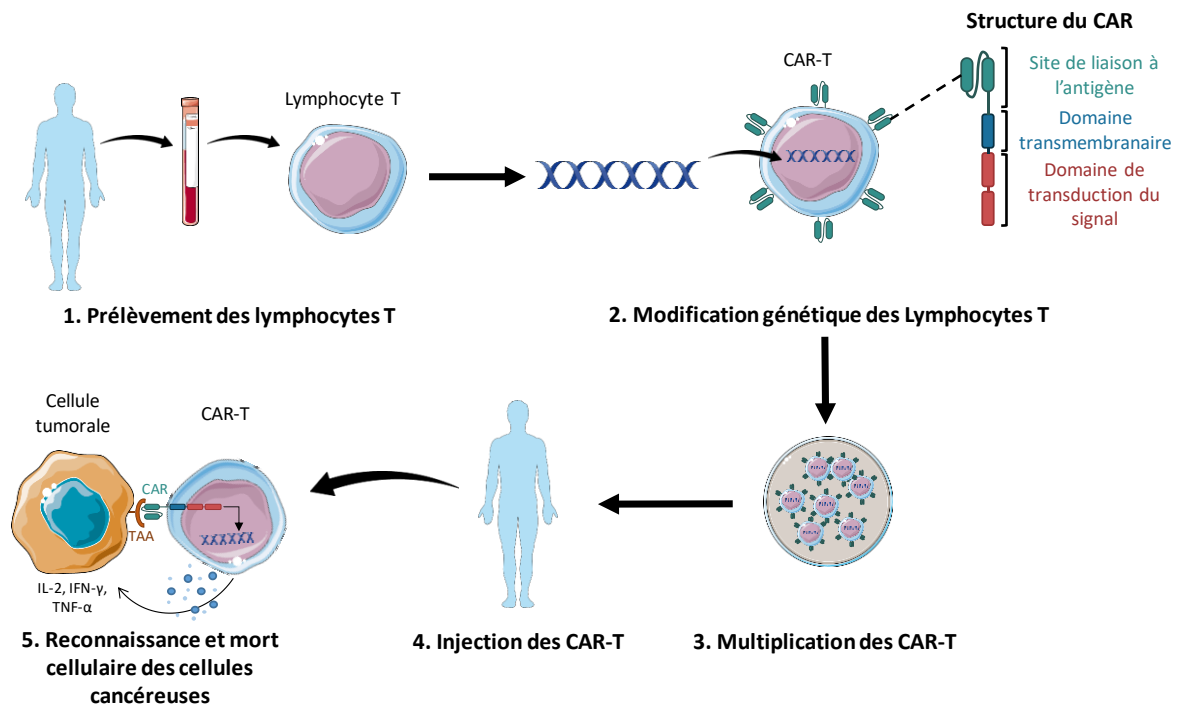


Figure 5 : Thérapie cellulaire par les cellules CAR-T.

Les lymphocytes T sont isolés à partir du sang du patient (1) puis modifiés génétiquement pour exprimer à leur surface un récepteur chimérique spécifique d'un antigène tumoral (2). Les lymphocytes T modifiés sont ensuite multipliés en culture (3) puis injectés chez le patient (4) où ils pourront reconnaître les antigènes tumoraux (TAA) et déclencher la mort cellulaire des cellules cancéreuses.

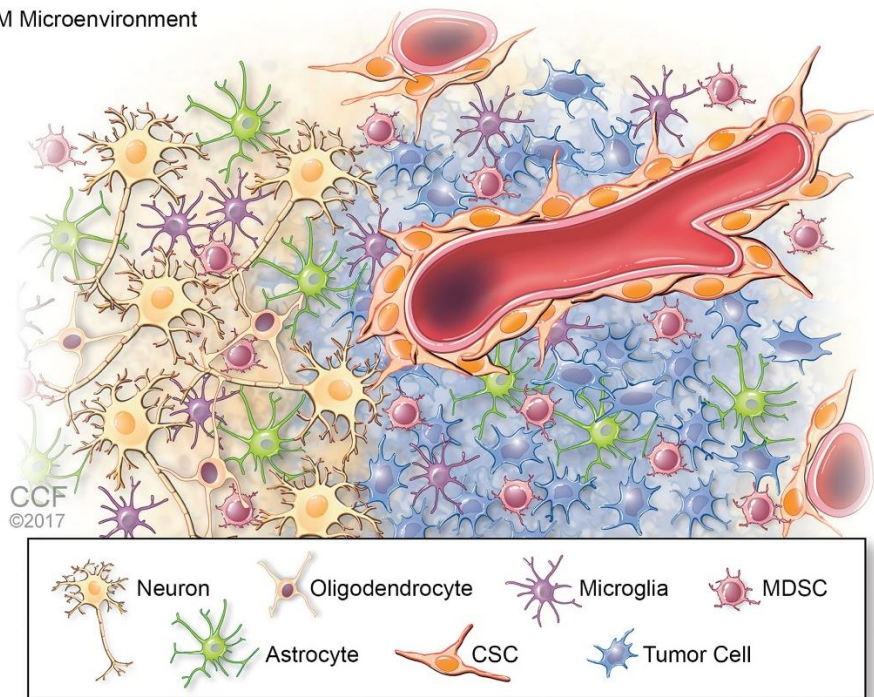
Les CAR sont des récepteurs dirigés contre des antigènes spécifiques. Ils sont constitués d'un domaine extracellulaire impliqué dans la reconnaissance d'un antigène, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine de signalisation intracellulaire. Plusieurs antigènes tumoraux retrouvés dans les GBMs sont à l'étude, comme l'EGFRvIII, le Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER-2) ou encore le récepteur à l'interleukine 13 (IL-13 R $\alpha$ 2). Les résultats préliminaires d'essais cliniques en phase I démontrent une faisabilité et une tolérance de la thérapie par les patients. Un effet anti-tumoral semble également être observé. Cependant, les études sur cette nouvelle stratégie thérapeutique débutent. Plusieurs

défis existent encore à ce jour, tels que l'augmentation du taux d'infiltration des cellules CAR-T dans la tumeur ou l'hétérogénéité inter- et intra-tumorale des marqueurs tumoraux. Par exemple, le niveau d'expression de l'EGFRvIII varie fortement entre les différentes régions de la tumeur suggérant un effet hétérogène des cellules CAR-T. L'environnement immunosuppresseur des GBMs est également un point clé dans le développement d'immunothérapies. Dans ce cas précis, le caractère immunosuppresseur de la tumeur inhibe l'activité immunitaire des lymphocytes T et donc des CAR-T et réduit ainsi l'efficacité de la stratégie thérapeutique (Bagley et al., 2018). Ce rôle immunosuppresseur est notamment porté par les macrophages associés à la tumeur (TAMs) qui sont donc une cible thérapeutique de choix.

## 2 La création d'un environnement tumoral immunosuppresseur

L'environnement tumoral tient un rôle central dans la résistance des GBMs aux différents traitements. Les cellules cancéreuses sont intégrées dans un environnement très hétérogène composé de différents types cellulaires tels que les neurones, les oligodendrocytes, les astrocytes ou encore les cellules microgliales, les cellules myéloïdes suppressives et les cellules souches cancéreuses (Figure 6). L'ensemble de ces cellules, associées aux autres composants cérébraux et à un environnement immunosuppresseur apportent toutes les conditions optimales pour le développement tumoral et la résistance aux différentes thérapies testées à ce jour.

GBM Microenvironnement



*Figure 6 : Composition du microenvironnement d'un glioblastome (Silver and Lathia, 2018). Le microenvironnement tumoral est complexe et regroupe plusieurs types cellulaires différents dont les cellules tumorales, les neurones, les oligodendrocytes, les astrocytes, les cellules microgliales les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et les cellules souches cancéreuses (CSC).*

## 2.1 L'utilisation de l'environnement cérébral par les cellules cancéreuses

Le développement de tumeurs cérébrales perturbe l'homéostasie du système nerveux central. Le système vasculaire, la matrice extracellulaire et la BHE sont détournés pour être intégrés dans les processus de développement tumoral, à savoir la prolifération cellulaire, l'infiltration et l'invasion des tissus avoisinants.

### Un environnement hypoxique

L'hypoxie est une caractéristique fréquente des GBMs. Elle est impliquée dans le développement tumoral et la mise en place d'un environnement immunosuppresseur. Les cellules tumorales s'adaptent au manque d'oxygène en activant les facteurs de transcription Hypoxia Inducible Factors (HIF). Ces facteurs de transcription régulent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'inhibition de l'apoptose, la prolifération des cellules tumorales ou encore l'angiogenèse. L'hypoxie tumorale possède également un rôle clé dans les mécanismes d'échappement au système immunitaire. En effet, un environnement hypoxique déclenche la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et immunosuppressives par les cellules cancéreuses. Notamment le transforming growth factor (TGF- $\beta$ ), le colony

stimulating factor (CSF)-1 ou encore le C-C chemokine ligand (CCL-2). Ces cytokines anti-inflammatoires activent la voie anti-inflammatoire et immunosuppressive STAT3 ce qui mène à l'activation des lymphocytes T régulateurs, modulateurs de la réponse immunitaire (Razavi et al., 2016).

#### Le système vasculaire

Face à leur besoin en oxygène et nutriments pour leur croissance, les tumeurs développent une angiogenèse excessive. Les GBMs sont des tumeurs caractérisées par un système vasculaire très développé. Les vaisseaux sanguins retrouvés dans les GBMs sont très différents des vaisseaux sanguins des tissus sains. Ils sont désorganisés et hautement perméables. Le développement du système vasculaire au sein de l'environnement tumoral requiert la coopération de plusieurs types cellulaires dont les cellules vasculaires endothéliales, les péricytes et les cellules souches dérivées de la moelle osseuse. D'autres cellules, notamment les TAMs, contribuent à la formation de vaisseaux sanguins par la sécrétion de facteurs angiogéniques tels que le VEGF. De plus, la perturbation du système vasculaire est à l'origine d'un déséquilibre de la BHE ainsi que de l'infiltration de cellules cancéreuses dans la circulation sanguine, première étape du processus métastatique (Quail and Joyce, 2013).

#### La barrière hémato encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) permet de protéger le cerveau contre des substances toxiques et des infections. Elle est composée de cellules endothéliales connectées entre elles par des jonctions serrées, de péricytes, d'astrocytes et de cellules microgliales. Elle filtre les molécules selon leur poids moléculaire, leur liposolubilité et leur charge. Elle bloque ainsi le transport d'approximativement 98% des molécules, ce qui fait de la BHE un obstacle non négligeable dans les stratégies thérapeutiques. Cependant, dans le cadre de pathologies cérébrales comme les GBMs, la BHE voit une perte locale de son intégrité. Malheureusement, cette perturbation locale de la BHE ne permet pas la pénétration de médicaments en quantités significatives (Van Tellingen et al., 2015).

#### La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est un élément non cellulaire présent dans tous les tissus. Elle est composée de collagène, de laminine ou encore de fibronectine. Elle fournit un soutien physique essentiel pour tous les constituants cellulaires et participe aussi à plusieurs

processus biologiques tels que la migration cellulaire, la différenciation et l'homéostasie des tissus. Toutes les cellules neuronales contribuent à la formation de cette matrice. Pendant le développement d'un GBM, la matrice subit un remodelage considérable de sa composition. Elle est enrichie en glycoprotéines, en acide hyaluronique et en héparane sulfate. Ces derniers sont particulièrement abondants dans les GBMs. Ils sont à l'origine de la rétention de facteurs de croissance et modulent ainsi leur biodisponibilité pour accroître le développement tumoral. La composition de la matrice extracellulaire joue également un rôle dans l'immunosuppression, notamment à travers le ralentissement de la migration des lymphocytes T vers la tumeur (Brown et al., 2018).

#### Les cellules myéloïdes MDSC

Les cellules myéloïdes suppressives, ou myeloid-derived suppressor cells (MDSC), sont des cellules myéloïdes immatures avec des propriétés immunosuppressives. En conditions physiologiques, elles se différencient rapidement en macrophages ou en cellules dendritiques. Mais en conditions pathologiques, telles qu'un cancer, la différenciation de ces cellules est bloquée. Dans les GBMs, ces cellules immatures sont recrutées depuis la moelle épinière et exercent leur capacité immunosuppressive sur les lymphocytes T cytotoxiques à travers la production d'oxyde nitrique. Elles sont également impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire innée en modulant la sécrétion de cytokines par les macrophages et participent à de nombreux processus du développement tumoral, à savoir, l'angiogenèse et la métastase (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

La reconnaissance et l'éradication des cellules cancéreuses sont des fonctions clés du système immunitaire. Cependant, les tumeurs parviennent à contourner ce système et à le manipuler pour accroître leur propre progression et échapper à la réponse immunitaire. Avec l'émergence de l'immunothérapie, les mécanismes et acteurs impliqués dans l'immunosuppression retrouvée au sein des GBMs sont devenus des cibles attrayantes.

## 2.2 Le détournement du système immunitaire du système nerveux central

Par son isolation anatomique à travers la BHE, le SNC possède un système immunitaire distinct du système immunitaire classique. La BHE, sous conditions physiologiques, filtre le passage de cellules immunitaires entre la circulation sanguine et le cerveau. Néanmoins, le cerveau possède son propre lot de cellules immunocompétentes : les cellules microgliales et les astrocytes.

Les astrocytes sont des acteurs clés dans le maintien de l'homéostasie du SNC. Ces cellules polyvalentes sont impliquées dans la régulation du flux sanguin, fournissant des nutriments aux neurones et participent à la neurotransmission et à la détoxification du milieu extracellulaire (Matyash and Kettenmann, 2010). Ils participent également à la défense immunitaire à travers la sécrétion de cytokines (Ransohoff et al., 2012) Le rôle des astrocytes dans l'environnement tumoral est mal exploré. Cependant, une étude récente a rapporté l'augmentation de l'activation de la voie de signalisation anti-inflammatoire STAT3 dans des astrocytes isolés de GBMs. Ces astrocytes sécrètent également les cytokines anti-inflammatoires TGF- $\beta$  et IL-10, suggérant leur implication dans la reprogrammation des cellules microgliales et des macrophages. De plus, l'expression de PD-L1 a été observée par les astrocytes au sein de GBMs, ce qui sous-entend leur incidence dans la suppression de l'activité des lymphocytes via la voie PD-1/PD-L1 (Henrik Heiland et al., 2019). Ainsi, les astrocytes contribuent au maintien de l'environnement anti-inflammatoire et favorisent la croissance et l'invasion tumorale.

La microglie, quant à elle, joue un rôle central dans la surveillance immunitaire, la résolution des infections et la cicatrisation. Tout comme les macrophages, elle est capable de reconnaître les pathogènes à travers des récepteurs spécifiques, les récepteurs de type Toll (TLRs). Ces récepteurs interagissent avec des motifs exprimés par les agents pathogènes (PAMPs) ou avec des motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs) libérés suite à des dommages cellulaires de nature non infectieuse. A la suite de cette interaction, des voies de signalisation telles que la voie NF- $\kappa$ B sont activées et initient la réponse immunitaire. Celle-ci est caractérisée par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine 1 beta (IL-1 $\beta$ ) ou encore l'interleukine 12 (IL-12). Ces cytokines pro-inflammatoires induisent également le recrutement de leucocytes qui participeront à la défense de l'organisme (Figure 7) (Ransohoff et al., 2012).



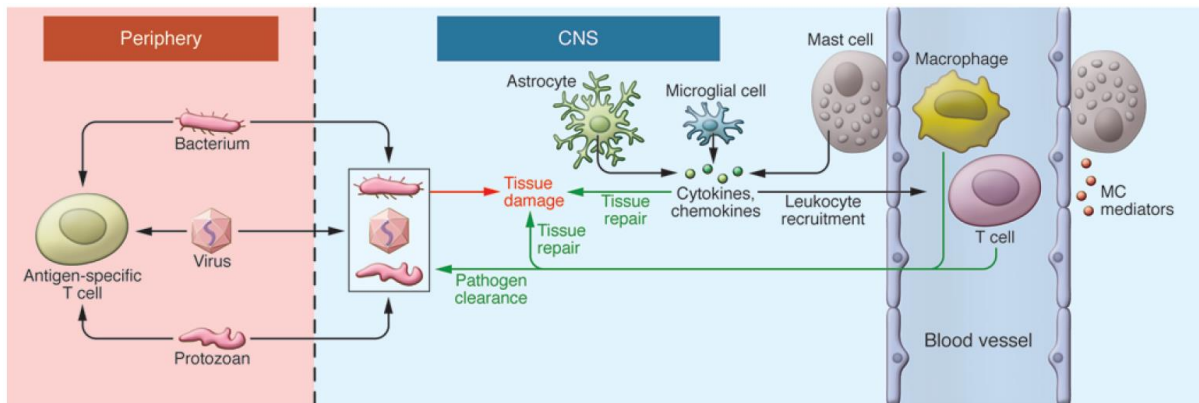


Figure 7 : Mécanismes immunitaires du système nerveux central (Ransohoff et al., 2012).

Les cellules microgliales et les astrocytes jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire au sein du système nerveux central. Elles sécrètent des cytokines et chimiokines chimioattractives permettant le recrutement de macrophages et de lymphocytes T circulants pour les assister à la réparation tissulaire et à l'élimination des pathogènes.

En effet, bien que le SNC présente des particularités anatomiques réduisant le trafic des cellules immunitaires, celui-ci reste néanmoins possible. Les antigènes présents dans le SNC peuvent être transportés par le réseau lymphatique et être présentés à des lymphocytes T naïfs grâce à des cellules présentatrices d'antigènes, les CD. Les lymphocytes T ainsi activés par l'action des cellules présentatrices d'antigènes ou des cytokines sécrétées par la microglie, expriment une quantité plus importante d'intégrines. Ces protéines leur permettent d'interagir avec les molécules d'adhésion cellulaire VCAM présentes sur la BHE et ainsi de la franchir pour participer à la réponse immunitaire (Mangani et al., 2017).

## 2.3 L'infiltration de cellules immunitaires et la suppression de leurs fonctions immunologiques

Les mécanismes d'immunosuppression sont des processus physiologiques ayant pour but la prévention d'une réponse immunitaire excessive ou auto-immune. Cependant, les cellules cancéreuses détournent ces mécanismes pour échapper à la réaction immunitaire et accroître le développement tumoral (Figure 8).

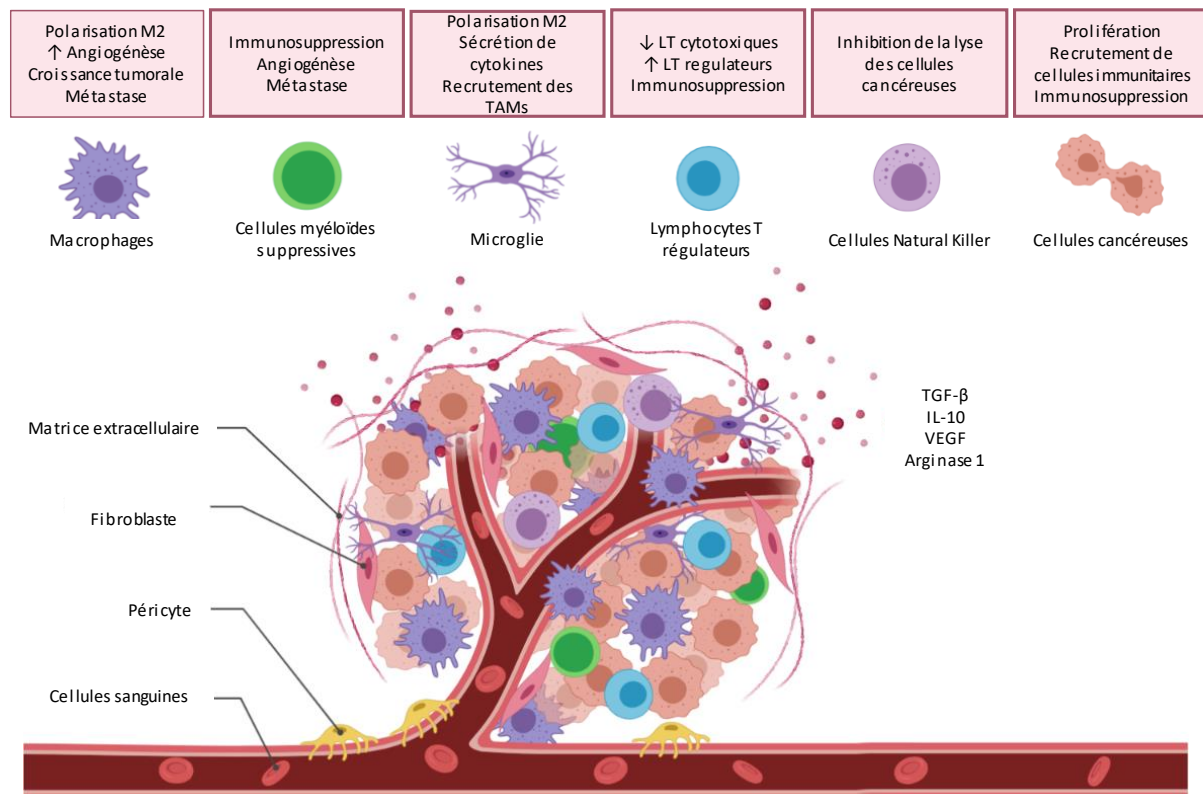


Figure 8 : Implication des différents éléments de la tumeur dans le développement tumoral et l'instauration d'un environnement immunosuppresseur.

### 2.3.1 Les facteurs immunosuppresseurs

L'ensemble des cellules composant la tumeur contribuent au développement d'un microenvironnement immunosuppresseur par la sécrétion de différents facteurs solubles. Plusieurs de ces facteurs sont impliqués dans la suppression de l'activité anti-tumorale des cellules immunitaires telles que les lymphocytes, la microglie ou encore les macrophages. Ces facteurs sont principalement des cytokines immunosuppressives telles que le TGF-β ou l'IL-10 mais aussi des facteurs de croissance comme le VEGF ou encore des enzymes telles que l'arginase 1 (Razavi et al., 2016).

En plus de participer au développement tumoral en augmentant l'angiogenèse et l'invasion des cellules tumorales, le TGF- $\beta$  est impliqué dans l'immunosuppression, caractéristique des GBMs. Il bloque l'activation et la prolifération des lymphocytes T, supprime l'activité cytotoxique des cellules natural killer et induit une différenciation des lymphocytes T en Tregs. Le TGF- $\beta$  joue également un rôle central dans l'orientation des macrophages vers un phénotype pro-tumoral (Mangani et al., 2017).

L'IL-10, connue comme étant une cytokine immunosuppressive, est retrouvée en grande quantité dans les GBMs. Elle est sécrétée par les cellules tumorales mais aussi par plusieurs cellules immunitaires notamment par les TAMs et les Tregs. L'IL-10 est impliquée dans les processus de croissance tumorale et dans la suppression des fonctions immunitaires des macrophages ou encore des lymphocytes. Elle inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires cruciales dans la réponse immunitaire telles que l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) ou le TNF- $\alpha$ . Elle joue également un rôle dans l'infiltration des Tregs (Mangani et al., 2017).

Parmi les facteurs solubles du microenvironnement tumoral, le VEGF a non seulement des fonctions pro-angiogéniques mais joue aussi un rôle clé dans le développement d'un environnement immunosuppresseur. Il conduit à l'accumulation de MDSCs et induit la prolifération des Tregs. Il entraîne également l'expression de points de contrôle de la réponse immunitaire comme le PD-1 ou l'antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique (CTLA-4 pour cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) par les lymphocytes T cytotoxiques (Voron et al., 2015).

L'arginase I, enzyme intervenant dans le cycle de l'urée, est également retrouvée en grande quantité dans l'environnement tumoral des GBMs. Elle est connue en tant que marqueur du phénotype pro-tumoral des macrophages (Mangani et al., 2017) Son expression est induite par des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4 ou le TGF- $\beta$ . Elle métabolise l'arginine en ornithine, substrat utilisé pour la production de polyamines par l'ornithine decarboxylase ou de proline par l'ornithine aminotransferase. Les polyamines sont de petites molécules impliquées dans plusieurs processus cellulaires, à savoir la réplication de l'ADN, la synthèse protéique, la croissance et la différenciation cellulaire, processus essentiels au développement tumoral. La proline est quant à elle impliquée dans la production de collagène, nécessaire pour la réorganisation tissulaire (Rath et al., 2014). La surexpression d'arginase I dans l'environnement tumoral provoque également une réduction de la concentration

extracellulaire d'arginine qui est impliquée dans l'activation des lymphocytes T et leur prolifération (Geiger et al., 2016).

Les cellules cancéreuses peuvent également inhiber la réponse immunitaire par interaction cellulaire directe impliquant plusieurs facteurs membranaires. L'interaction la plus étudiée est la liaison PD-1/PD-L1. PD-1 est exprimé à la surface des lymphocytes T activés et son ligand, PD-L1, est exprimé par les cellules cancéreuses. L'association des deux facteurs mène à la suppression de la prolifération et des fonctions cytotoxiques des lymphocytes T. Le CTLA-4 est un autre point de contrôle de la réponse immunitaire exprimé par les lymphocytes T activés. Il est également utilisé dans l'inhibition de la réponse immunitaire (Mangani et al., 2017).

### 2.3.2 L'inactivation des cellules immunitaires

#### Les lymphocytes

Les lymphocytes T infiltrants (TIL pour Tumor-infiltrating lymphocytes) ont le potentiel d'exercer à la fois des fonctions pro- et anti-tumorales. Comme leur nom l'indique, ils ne sont pas résidents du SNC. Ils sont recrutés par l'action chimio-attractrice de cytokines sécrétées par le microenvironnement tumoral. Ils sont divisés en plusieurs sous populations. Les lymphocytes T cytotoxiques jouent un rôle central dans l'élimination de la tumeur. Cependant, ils représentent une très faible part de la population des TILs au sein du microenvironnement tumoral. De plus, au sein des GBMs, ces lymphocytes montrent des fonctions effectrices altérées les rendant inefficaces dans l'élimination des cellules tumorales. De la même manière, les lymphocytes T auxiliaires ou helper, qui ont également des fonctions anti-tumorales, sont en proportion très faible et voient leurs différentes fonctions anti-tumorales altérées (Tomaszewski et al., 2019). De plus, la plupart des TILs présents au sein du GBM sont sensibles au ligand de Fas (FasL) présent dans le microenvironnement tumoral et ne sont donc pas viables ou sont en début d'apoptose (Woroniecka et al., 2018).

En revanche, un grand nombre de lymphocytes T régulateurs (Tregs) est retrouvé dans les GBMs et dans le réseau sanguin avoisinant la tumeur. Leur abondance est corrélée avec un pronostic défavorable pour le patient (Mangani et al., 2017). Les Tregs sont des régulateurs clés du système immunitaire avec des effets immunosuppresseurs sur plusieurs types de cellules immunitaires (Figure 8). Leur présence au sein des GBMs résulte d'une chimio-attraction par le biais de différentes cytokines telles que CCL22 ou CCL2 (Razavi et al., 2016).

Une fois établis dans l'environnement tumoral, les Tregs sont responsables de la suppression de la réponse anti-tumorale et de la promotion de la tolérance immunitaire à travers la sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que le TGF- $\beta$  ou l'IL-10 (Woroniecka et al., 2018).

Les cellules natural killer (NK) sont des cellules de l'immunité innée ayant pour fonction l'élimination de cellules cancéreuses. Ces cellules sont retrouvées au sein de GBMs mais sont malheureusement inactivées par leur inhibiteur naturel, le HLA-G, sécrété par les cellules tumorales. Elles ne peuvent donc plus exercer leurs fonctions cytotoxiques (Figure 8) (Tomaszewski et al., 2019).

#### Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont essentielles pour la liaison entre l'immunité innée et adaptative. Elles sont impliquées dans la reconnaissance de pathogènes et dans l'initiation de la réponse immunitaire contre ces derniers. Etant des cellules présentatrices d'antigènes, elles jouent également un rôle important dans l'activation des lymphocytes. Néanmoins, plusieurs facteurs tels que l'IL-6, le VEGF ou encore le TGF- $\beta$  présents dans l'environnement tumoral réduisent les fonctions des cellules dendritiques. Ces dernières présentent une sous expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité ainsi que d'autres protéines associées à la présentation d'antigènes telles que le transporteur associé au traitement des antigènes (TAP). Ainsi, au sein de l'environnement tumoral, la fonction de présentation d'antigènes des cellules dendritiques est défectueuse et ces dernières sont donc dans l'incapacité d'activer les lymphocytes T en vue d'induire une réponse anti-tumorale (Kerkar and Restifo, 2012). Au contraire, les cellules dendritiques retrouvées au sein de la tumeur sécrètent des facteurs favorisant une orientation des lymphocytes vers la voie Th2 conduisant à la production de cytokines telles l'IL-4 ou l'IL-13, cytokines impliquées dans le développement tumoral. De plus, de nombreux facteurs de l'environnement tumoral inhibent la différenciation des progéniteurs myéloïdes en cellules dendritiques pour induire une différenciation de ces derniers vers les macrophages (Fu and Jiang, 2018).

## 2.4 Les macrophages associés à la tumeur

Les macrophages sont retrouvés dans la majorité des tissus de l'organisme. Ce sont des cellules immunitaires myéloïdes jouant un rôle dans beaucoup de processus biologiques fondamentaux tels que le développement, le maintien de l'homéostasie, la cicatrisation et surtout dans la réponse immunitaire. Leurs origines sont diverses et leur implication dans le développement tumoral n'est plus à prouver. En effet, les TAMs peuvent représenter jusqu'à 30% de la masse tumorale dans un GBM. Ils représentent donc une opportunité thérapeutique de choix.

### 2.4.1 Généralités sur les macrophages

#### Origine cellulaire

Les macrophages dérivent de deux sources différentes. Ils sont en majorité produits dans le sac vitellin avant la naissance à partir de précurseurs érythro-myéloïdes. Ils s'établissent ensuite dans les différents tissus de l'organisme et sont maintenus pendant la vie adulte. Après la naissance, les macrophages dérivent de cellules souches hématopoïétiques localisées dans la moelle osseuse. Elles se différencient en progéniteurs myéloïdes, en monoblastes et en pro-monocytes avant de devenir des monocytes dans la circulation sanguine. Ces derniers migrent ensuite vers d'autres tissus où, sous l'influence d'interleukines et de facteurs de croissance tels que le CSF-1, ils se différencient en macrophages. Selon leur localisation, les macrophages portent un nom différent. Ils sont nommés cellules de Kupffer dans le foie, ostéoclastes dans les os, macrophages alvéolaires dans les poumons ou encore cellules microgliales dans le SNC (Wynn et al., 2013).

Dans le SNC, les cellules microgliales sont les seules cellules immunitaires résidentes responsables de la défense contre les pathogènes et autres dommages cellulaires. La conception de séparation entre le système immunitaire du SNC et le système immunitaire périphérique est très étudiée et évolue de jour en jour. Une étude récente a démontré que les cellules microgliales présentent un phénotype spécifique des différentes régions anatomiques du SNC dans lesquelles elles résident. La microglie du cortex est spécialisée dans la migration neuronale, la neurogénèse et le recrutement de monocytes tandis que la microglie de la moelle épinière joue un rôle clé dans la dégradation nerveuse et lipidique et dans les processus inflammatoires (Murgoci et al., 2020). Bien que la microglie est décrite comme dérivant de précurseurs érythro-myéloïdes pendant l'embryogenèse (Kierdorf et al.,

2019), ces différences notables suggèrent une origine différente entre la microglie du cortex et celle de la moelle épinière. En effet, plusieurs facteurs identifiés dans les vésicules issues de la microglie de la moelle épinière semblent indiquer que cette population serait proche des macrophages dérivés de la moelle osseuse (Murgoci et al., 2020). La population microgliale de la moelle épinière semble donc avoir plusieurs origines.

De plus, une nouvelle population de macrophages a été très récemment décrite au sein des plexus choroïdes, des méninges et de l'espace périvasculaire. Ces structures interviennent dans la ségrégation du SNC mais autorisent aussi des échanges restreints et permettent ainsi la présentation d'antigènes ou encore l'infiltration de cellules immunitaires. Ces structures possèdent une population de macrophages distincte qui, au contraire de la microglie, n'est pas retrouvée dans le parenchyme du SNC (Figure 9) (Kierdorf et al., 2019). Les macrophages périvasculaires (pvMΦ) retrouvés au sein de l'espace périvasculaire, les macrophages meningeaux (mMΦ) et les macrophages des plexus choroïdes (cpMΦ) sont, comme la microglie, issus des précurseurs érythro-myéloïdes produits pendant l'embryogenèse (Prinz et al., 2017). Une partie des macrophages meningeaux, les macrophages durs (dmMΦ) et une partie des macrophages du plexus choroïde (cpMΦ) sont remplacés par des macrophages issus de la moelle osseuse durant la vie adulte (Kierdorf et al., 2019).

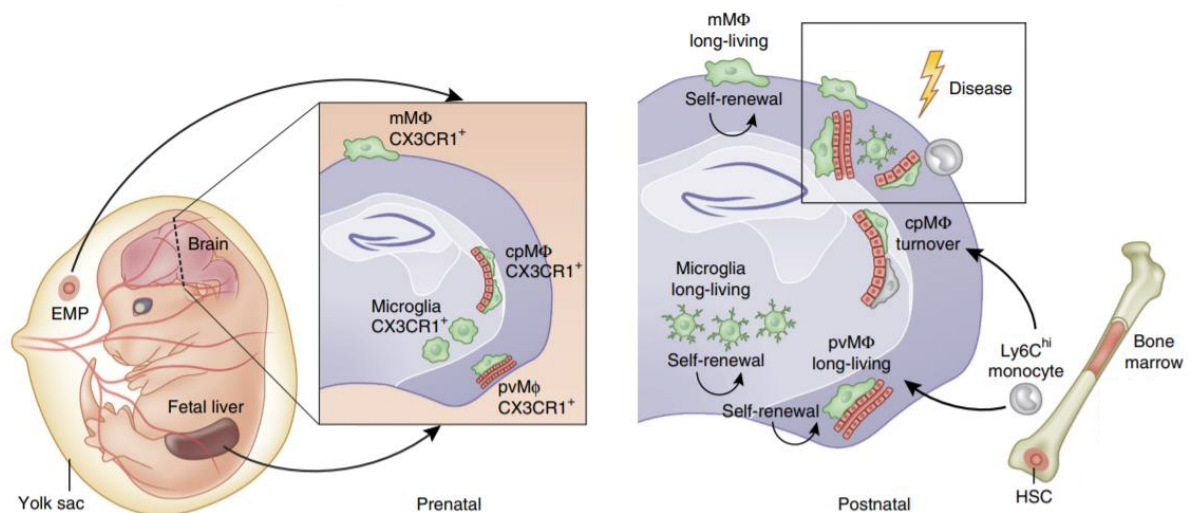


Figure 9 : Origine et renouvellement des macrophages au sein du système nerveux central (Prinz et al., 2017).

Pendant l'embryogenèse, l'hématopoïèse commence dans le sac vitellin où les précurseurs érythro-myéloïdes (EMPs) se différencient en macrophages qui coloniseront les tissus. Dans le cerveau, les macrophages adoptent le phénotype de cellules microgliales dans le parenchyme, de macrophages meningeaux (mMφ), de macrophages périvasculaires (pvMφ) et de macrophages des plexus choroïdes (cpMφ). Plus tard, l'hématopoïèse se poursuit dans le foie fœtal où les EMPs se différencient en monocytes qui entrent dans la circulation sanguine et se différencient en macrophages une fois établis dans les tissus cibles. Après la naissance, l'hématopoïèse définitive a lieu dans la moelle osseuse où les cellules souches hématopoïétiques (HSC) se différencient en monocytes qui intègrent la circulation sanguine puis en macrophages. Ces derniers vont remplacer certaines populations de macrophages établies dans les tissus pendant l'embryogenèse, comme les pvMφ et les cpMφ.

## Fonctions

Bien que les macrophages soient spécialisés dans l'élimination des débris cellulaires et des agents pathogènes, ces cellules sont polyvalentes et sont impliquées dans de nombreux processus.

Pour exercer leurs fonctions immunologiques, les macrophages sont équipés de récepteurs capables de reconnaître des motifs moléculaires caractéristiques des pathogènes (PRRs). Parmi ces PRRs, les Toll Like Receptors (TLRs) constituent un groupe de dix récepteurs transmembranaires (TLR1 – TLR10). Les TLRs 1, 2, 4, 5, 6 sont exprimés à la surface cellulaire des macrophages tandis que les TLRs 3, 7, 8 et 9 sont localisés au niveau des endosomes. Ils reconnaissent des motifs moléculaires endogènes libérés par des cellules en souffrance appelés DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) ainsi que des signaux de danger exogènes provenant de pathogènes appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular



Patterns). Parmi ces derniers sont inclus les lipopolysaccharides (LPS), composants de la membrane des bactéries gram négatives et ligands du récepteur TLR4, ou encore les ARNs viraux double brins et les motifs CpG hypométhylés caractéristiques de l'ADN bactérien, ligands des récepteurs TLR3 et 9 respectivement. La reconnaissance de ces signaux de danger par les macrophages active des cascades de signalisation dont la voie pro-inflammatoire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B ou encore la voie anti-virale IRF3 et initie une réponse inflammatoire incluant la production et la sécrétion de cytokines (Figure 10) (O'Neill et al., 2013).

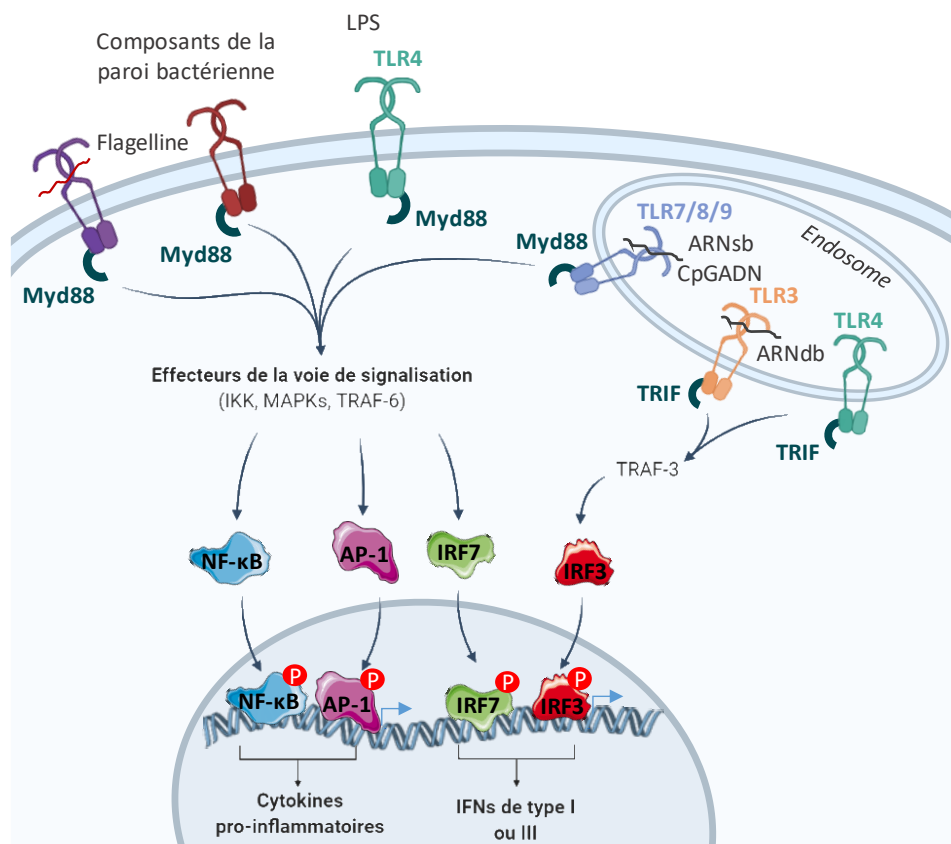


Figure 10 : Schéma simplifié représentant les voies de signalisation associées aux TLRs chez les mammifères. Adaptée de Akira and Takeda 2004 et O'Neill, Golenbock and Bowie, 2013.

La voie de signalisation des TLRs fait intervenir deux voies principales. Une voie dépendante de Myd88 activée par la totalité des TLRs à l'exception du TLR3 et une voie indépendante de Myd88 utilisée par le TLR4 et le TLR3 qui fait intervenir la protéine adaptatrice TIR-containing adaptator (TRIF). Suite à l'activation des récepteurs par leurs ligands les protéines adaptatrices Myd88 ou TRIF sont recrutées. Il s'en suit une cascade de signalisation impliquant des effecteurs de la voie de signalisation tels que le complexe IKK, les MAPKs ou encore les facteurs TRAFs aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, AP-1 ou encore IRF3 et 7. La conséquence majeure de la stimulation des TLRs est une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons.

Enfin, ces dernières orchestrent la réponse immunitaire (Chen et al., 2007). Par la présentation d'antigènes, les macrophages font également le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ils permettent d'alerter le système immunitaire de la présence de pathogènes. Ainsi, la capture, l'endocytose et la présentation d'antigènes aux lymphocytes T sont des fonctions importantes des macrophages (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

Les fonctions des macrophages ne se limitent pas à la réponse immunitaire, ils jouent également un rôle central dans la coordination de la réponse inflammatoire en modulant la sécrétion de chimiokines et de cytokines pro- et anti-inflammatoires selon les besoins de l'organisme. Les macrophages peuvent également sécréter de nombreux facteurs de croissance impliqués dans divers processus comme l'angiogenèse, le maintien et le renouvellement de la matrice extracellulaire ou encore la cicatrisation (Franklin and Li, 2016).

Outre leur implication dans le maintien de l'homéostasie et dans la réponse immunitaire, les macrophages ont des fonctions spécifiques selon le tissu dans lequel ils sont établis. Par exemple, les cellules de Kupffer, macrophages du foie, sécrètent la prostaglandine D2 qui active la glycolyse dans les hépatocytes. Dans le SNC, la microglie participe au maintien de l'homéostasie par la sécrétion de facteurs neurotrophiques, comme le facteur de croissance nerveuse (NGF) impliqué dans la croissance, la prolifération et la survie des neurones (Varol et al., 2015). Quant aux macrophages associés au SNC, résidents des plexus choroïdes, des méninges et de l'espace périvasculaire, ils sembleraient être impliqués dans le maintien de la ségrégation du SNC mais aussi dans le contrôle du drainage d'antigènes et dans les échanges métaboliques (Kierdorf et al., 2019).

#### Plasticité phénotypique

Les macrophages sont une population cellulaire très hétérogène et présentent une plasticité phénotypique leur permettant de répondre à un grand éventail de stimuli et de conditions environnementales. En effet, ces cellules sont capables d'adapter leur phénotype, leur profil de sécrétion et leurs fonctions selon les besoins de leur environnement et les stimuli auxquels ils sont exposés. Ainsi, un large spectre de phénotypes a été décrit sur la base de l'expression de marqueurs de surface, la production de facteurs et des activités biologiques des macrophages.

La nomenclature de la classification phénotypique des macrophages est en constante évolution. Certains parlent de polarisation et d'autres d'états d'activation. Dans un premier temps, dans les années 90, deux phénotypes ont été décrits. Le phénotype dit « classique », activé par le LPS et son opposé, le phénotype « alternatif ». La nomenclature M1/M2 ; M1 pour le phénotype classique et M2 pour le phénotype alternatif, est apparue en 2000. Cette classification des macrophages est l'une des plus utilisée *in vitro*. Elle se rapporte à leurs deux fonctions principales, à savoir l'élimination de pathogènes ou la cicatrisation tissulaire. Ainsi, deux phénotypes principaux sont décrits : le phénotype M1, pro-inflammatoire et anti-tumoral et le phénotype M2, anti-inflammatoire et pro-tumoral. Le phénotype pro-inflammatoire « M1 » est induit par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  ou encore par la stimulation du TLR4. Il est affilié à la promotion de la réponse inflammatoire anti-bactérienne et anti-tumorale et participe activement à la réponse immunitaire de type Th1, cytotoxique. Au contraire, le phénotype anti-inflammatoire « M2 », induit suite à une stimulation par les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4 ou l'IL-10, est décrit comme étant un phénotype immunosuppresseur. Il est impliqué dans la réduction de l'inflammation, dans la réparation tissulaire et dans l'angiogenèse (Chen et al., 2017). Cependant, l'utilisation de la classification simplifiée M1/M2 ne reflète pas la complexité et la diversité des différents phénotypes macrophagiques existants. Ainsi, quelques années plus tard, le phénotype M2 est divisé en plusieurs sous types désignés M2a, M2b et M2c selon leurs stimuli d'activation et leurs activités biologiques. Le phénotype M2a est caractérisé par une réponse immunitaire de type Th2, aux processus des allergies et à l'élimination de pathogènes. Le phénotype M2b est également associé à une réponse immunitaire de type Th2 et à une immunorégulation. Le phénotype M2c est impliqué dans les processus de renouvellement tissulaire (Figure 11) (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Cependant, il est important de noter que l'ensemble de ces phénotypes sont décrits *in vitro* et cette description est très éloignée des observations *in vivo*. En effet, la description *in vivo* des différents phénotypes est très compliquée en raison de l'existence d'un grand nombre de stimuli et donc de réponses (Murray et al., 2014).

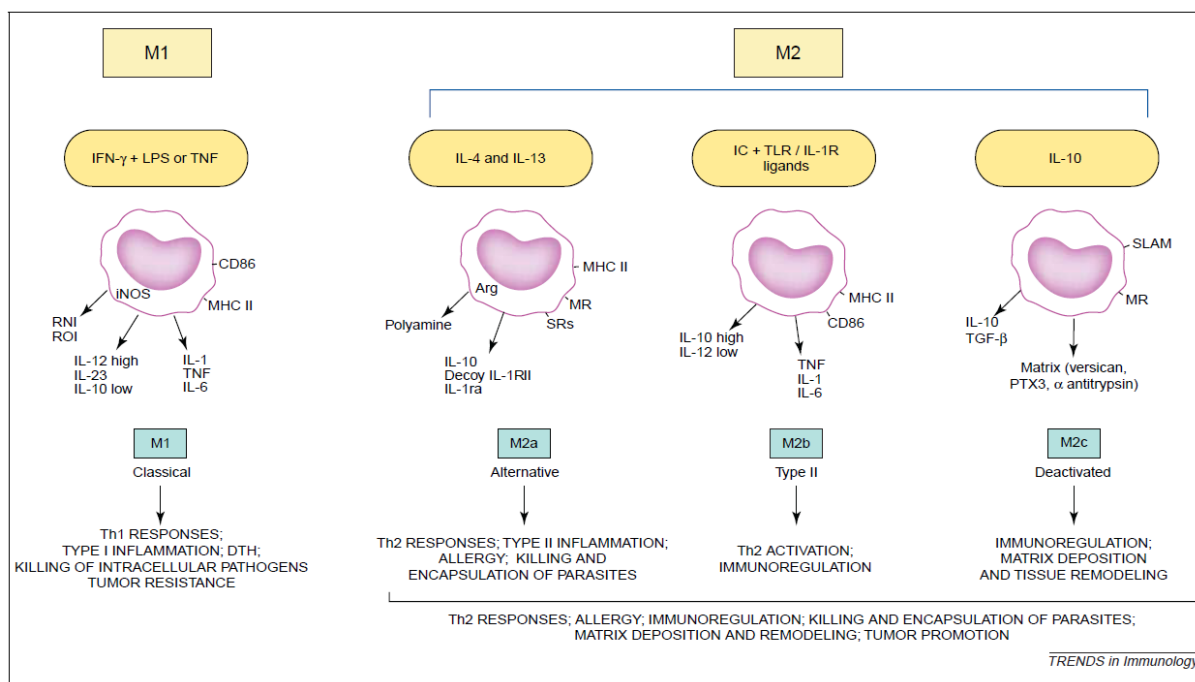


Figure 11 : Stimuli et fonctions des différents phénotypes de macrophages selon la nomenclature M1/M2 (Mantovani et al., 2004).

Les macrophages adoptent différents phénotypes en réponse aux signaux de leur environnement. S'ils sont exposés à l'IFN- $\gamma$ , du LPS ou du TNF- $\alpha$ , les macrophages adoptent un phénotype M1 pro-inflammatoire et anti-tumoral. Le phénotype M2 est à l'opposé du phénotype M1, il est impliqué dans l'immunorégulation et est pro-tumoral. Plus précisément, les phénotypes M2a et M2b, respectivement induits par l'IL-4 et certains ligands de TLRs ou de l'IL-1R sont impliqués dans l'immunorégulation et une réponse immunitaire de type Th2, humorale. Les macrophages M2c induits par l'IL-10 sont, quant à eux, associés à la réparation tissulaire et à la modulation de la réponse immunitaire.

La distinction entre les macrophages pro-inflammatoires M1 et les macrophages anti-inflammatoires M2 est très délicate compte tenu du manque de marqueurs uniques de chaque polarisation. Néanmoins, les macrophages M1 sont communément associés avec l'expression de CD40, CD74, iNOS et CMH II (Roesch et al., 2018). Ils expriment des molécules activatrices de la réponse immunitaire telles que le CD80 et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  ou l'IL-12 (Sica and Mantovani, 2012). En revanche, l'expression de CD163, CD204, CD206, arginase 1 et la phosphorylation de STAT3 sont affiliées au phénotype M2 (Roesch et al., 2018). Ces derniers expriment également les chimiokines CCL17, CCL22 et CCL24 et sécrètent préférentiellement de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  (Sica and Mantovani, 2012). Cependant, ces marqueurs sont à utiliser avec précaution. En effet, chaque phénotype peut exprimer des marqueurs habituellement associés au phénotype opposé. De plus, plusieurs phénotypes peuvent être observés au sein d'une même population de macrophages (Murray et al., 2014). Le phénotype des macrophages est très nuancé et la

représentation M1/M2 est très simplifiée. La communauté scientifique a récemment suggéré que, dans le cadre des macrophages infiltrés au sein de tumeurs, il serait plus judicieux de décrire leur phénotype en tant que pro- ou anti-tumoral plutôt que M1/M2 (Gieryng et al., 2017).

#### 2.4.2 Communication entre les macrophages et les cellules cancéreuses

En conditions physiologiques, les macrophages sont censés reconnaître les antigènes tumoraux et initier une réponse immunitaire pour éliminer les cellules cancéreuses. Malheureusement, une fois recrutés au sein de la tumeur, ces derniers perdent leurs fonctions immunitaires et participent à la croissance tumorale (Mantovani et al., 2017). Les macrophages infiltrés au sein de la tumeur sont appelés « Tumor Associated Macrophages » (TAMs). Au sein des GBMs, les TAMs sont une population mixte constituée de cellules microgliales, de macrophages résidents établis dans le SNC durant l'embryogenèse et de macrophages dérivés de monocytes, recrutés à partir de la circulation sanguine. Les TAMs représentent entre 30 et 50% des cellules du microenvironnement tumoral (Figure 12) et une haute densité de macrophages est souvent associée à un mauvais pronostic (Chen et al., 2017).

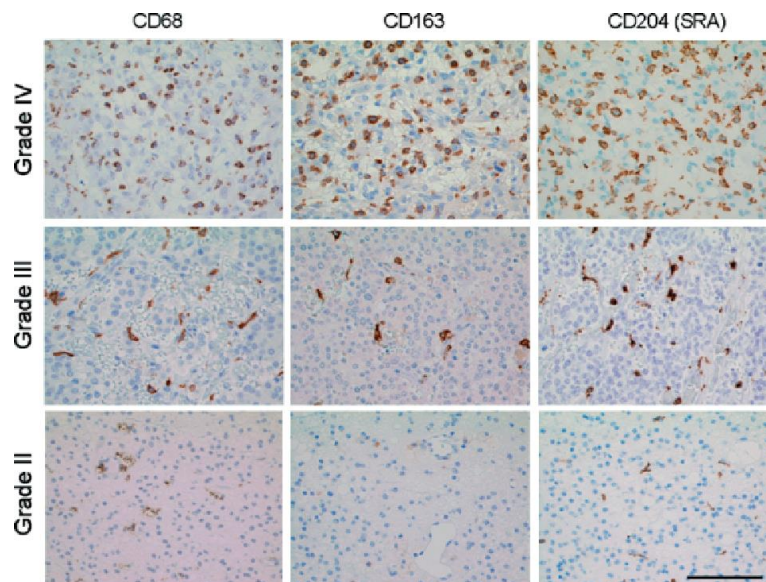


Figure 12 : Proportions des macrophages selon le grade de gliome (Komohara et al., 2008). L'immunohistochimie de CD68, CD163 et CD204 met en avant la corrélation entre le nombre de macrophages et de cellules microgliales au sein de la tumeur et le grade du gliome. De plus, les macrophages associés à la tumeur ont adopté un phénotype pro-tumoral « M2 ». CD68 est utilisé en tant que marqueur de macrophages et de la microglie tandis que CD163 et CD204 sont des marqueurs du phénotype M2. Echelle : 100  $\mu$ m.

## Recrutement et polarisation

La protéine chimioattractante de monocyte (MCP-1), aussi appelée CCL2, est un des facteurs le plus important dans le recrutement des macrophages. Elle est sécrétée par les cellules cancéreuses et les astrocytes. Elle intervient également dans l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et dans l'infiltration des Tregs. Le recrutement des macrophages au sein de la tumeur est également orchestré par d'autres facteurs tels que le stroma-derived factor (SDF-1), le CSF-1, le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et l'EGF (Figure 13) (Roesch et al., 2018).

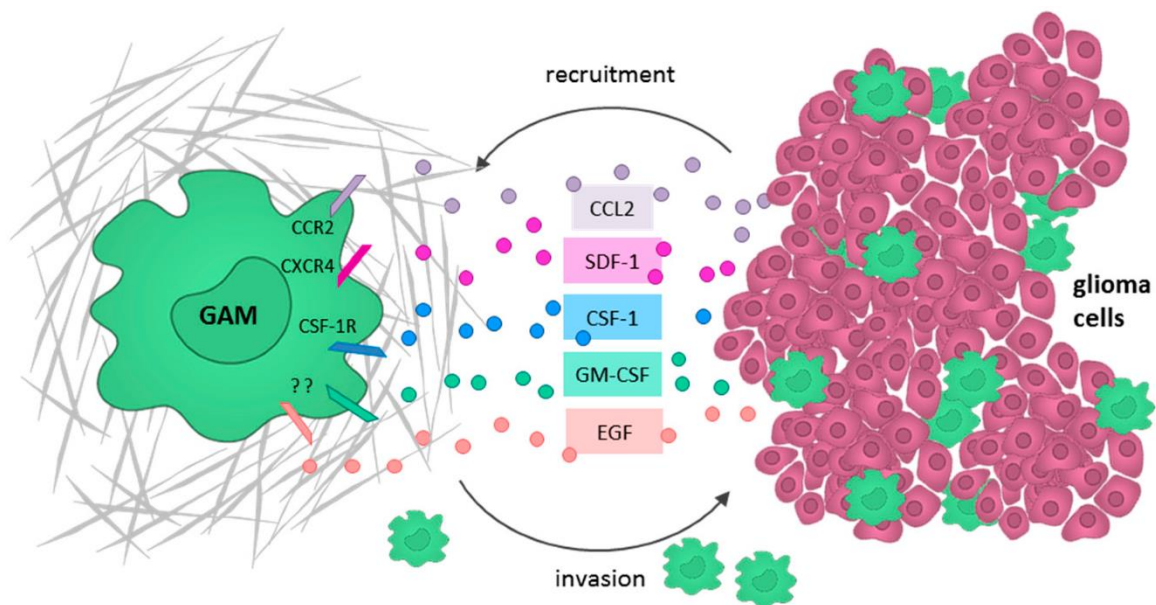


Figure 13 : Recrutement des macrophages associés au gliome (GAMs ou TAMs) par des facteurs sécrétés par les cellules de l'environnement tumoral (Roesch et al., 2018).

Une fois recrutées au sein du microenvironnement tumoral, les cellules constitutives de la tumeur vont sécréter des facteurs anti-inflammatoires dans le but de créer un environnement immunosuppresseur. Les chimiokines CCL2 et CCL5, des cytokines comme le CSF-1 ou encore des facteurs de croissance comme le VEGF font partie de ces facteurs. Cet environnement est capable d'orienter les macrophages infiltrés vers un phénotype avantageux pour le développement tumoral (Mantovani et al., 2017). En condition tumorale, 3 types de signaux sont déterminants pour la polarisation des TAMs. Ils incluent les signaux immunitaires composés de cytokines telles que l'IL10 ou encore le TGF- $\beta$  qui sont libérés au sein du site tumoral par les cellules immunitaires infiltrées et par les cellules cancéreuses. Les signaux provenant du métabolisme des cellules cancéreuses comme le lactate peuvent aussi influencer la polarisation des TAMs. Enfin, les signaux de danger comme l'ATP ou encore la



calréticuline libérés suite à une mort cellulaire spontanée ou provoquée par thérapie anti-cancéreuse influence également le phénotype des TAMs (Figure 14) (Ostuni et al., 2015). Les cellules cancéreuses entraînent ainsi une polarisation des macrophages vers un phénotype qui s'apparente au phénotype anti-inflammatoire et pro-tumoral M2 (Mantovani et al., 2017).

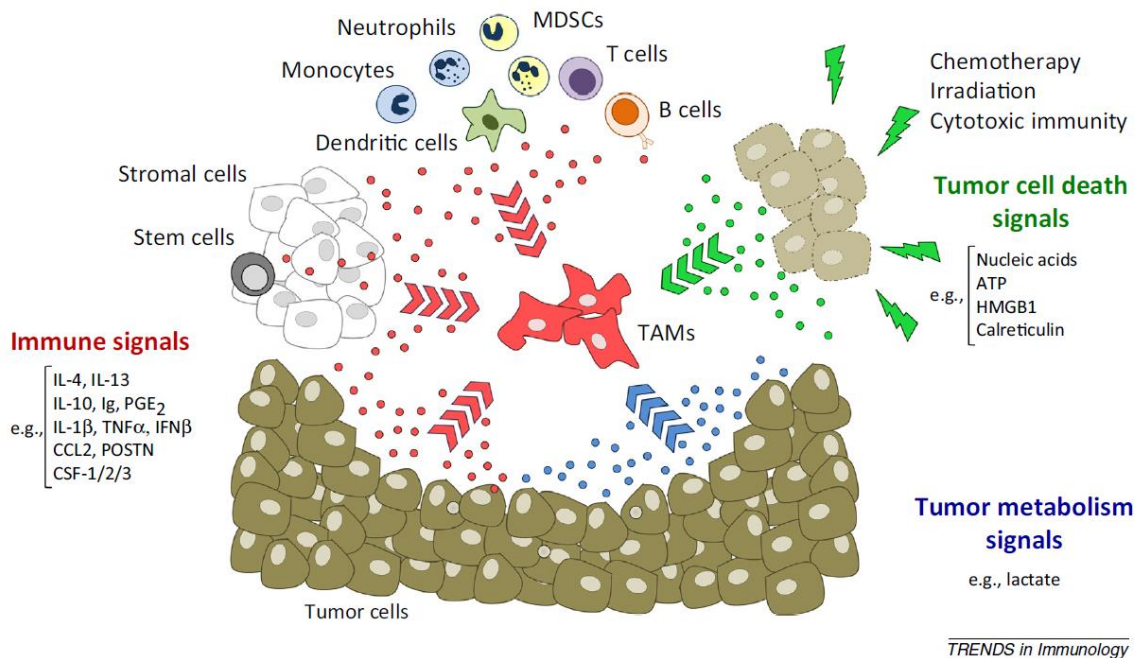


Figure 14 : Signaux environnementaux influençant la polarisation des TAMs (Tumor Associated Macrophages) (Ostuni et al., 2015).

Les signaux immunitaires (en rouge) tels que l'IL-10 et le TGF-β sécrétés par les cellules immunitaires, les cellules stromales et les cellules tumorales sont impliqués dans la polarisation des TAMs. Cette polarisation peut également être influencée par le lactate issu du métabolisme des cellules tumorales (en bleu). Les signaux de danger endogènes sécrétés suite à la mort de cellules tumorales sont également responsables de l'orientation du phénotype des TAMs.

## Fonctions

Les cellules cancéreuses détournent ainsi les propriétés des macrophages à leur avantage. Les TAMs influencent plusieurs aspects du développement tumoral (Figure 15). Ils vont, en effet, participer à la croissance tumorale et à l'invasion des tissus avoisinants en produisant des facteurs tels que le TGF-β, les interleukines IL-6 et IL-1β ou encore l'EGF (Roesch et al., 2018). Les TAMs participent également à la destruction de la matrice extracellulaire par la production d'enzymes protéolytiques telles que les métalloprotéases matricielles (MMPs) et les cathepsines favorisant ainsi la migration et l'invasion des tissus environnants par les cellules cancéreuses.

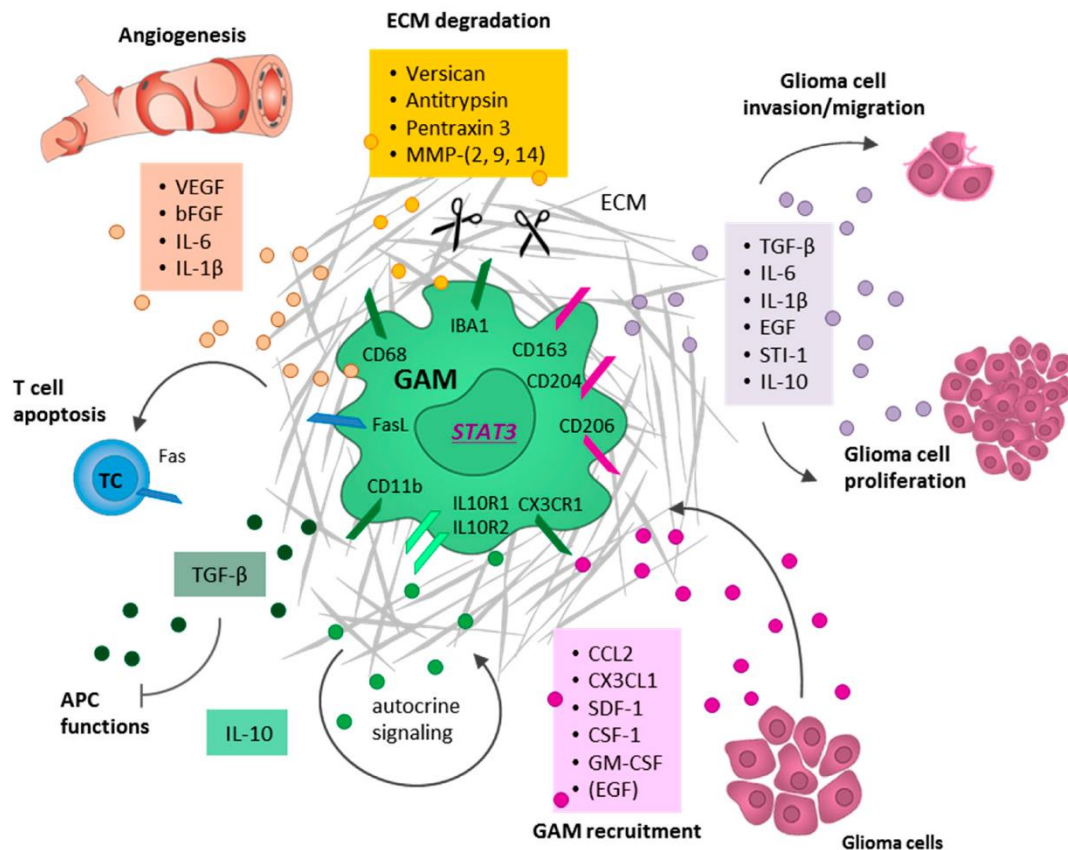


Figure 15 : Contribution des macrophages et cellules microgliales associés au gliome dans le développement tumoral (Roesch et al., 2018).

Les macrophages et cellules microgliales associés au gliome (GAMs) sont recrutés au site tumoral et orientés vers un phénotype pro-tumoral par plusieurs facteurs notamment CCL2, CX3CL1, SDF-1, CSF-1, GM-CSF et l'EGF. Ces GAMs M2 expriment également des facteurs qui renforcent ce phénotype, notamment l'IL-10, ainsi que des facteurs impliqués dans le développement tumoral et dans l'immunosuppression. Les GAMs participent donc à l'angiogenèse par la sécrétion de VEGF, bFGF, IL-6 et IL-1 $\beta$ , à la dégradation de la matrice extracellulaire (ECM) à travers la sécrétion de versican, d'antitrypsine, de pentraxin et de MMPs, ainsi qu'à la migration des cellules cancéreuses grâce au TGF- $\beta$ , à l'IL-6, l'IL-10, l'IL-1 $\beta$  et à l'EGF. Les GAMs sont également responsables de l'apoptose des lymphocytes T par l'activation de leur récepteur Fas et de la suppression des fonctions de présentation d'antigènes par la sécrétion de TGF- $\beta$ .

Les TAMs sont aussi responsables de l'augmentation de la vascularisation de la tumeur à travers l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF. Ces macrophages contribuent également au renforcement de l'environnement immunosuppresseur par la production de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 ou le TGF- $\beta$ . Ces cytokines induisent une réduction de l'activité cytotoxique des lymphocytes T et de certaines fonctions des macrophages telles que la présentation d'antigènes ou encore la phagocytose. Elles sont également impliquées dans le recrutement des Tregs et d'autres macrophages qui adopteront



à leur tour un phénotype pro-tumoral (Franklin and Li, 2016). L'activité immunosuppressive des TAMs est aussi médiée par contact cellulaire. En effet, au sein d'un GBM, la plupart des macrophages expriment la protéine transmembranaire FasL qui induit l'apoptose des lymphocytes T exprimant son récepteur (Roesch et al., 2018). La voie PD-1/PD-L1 responsable de la suppression de l'activité cytotoxique des lymphocytes T est également utilisée par les TAMs pour la création d'un environnement immunosuppresseur et donc l'évasion des cellules cancéreuses au système immunitaire (Franklin and Li, 2016; Mantovani et al., 2017). Face à leur implication dans le développement tumoral, les TAMs sont devenus une cible thérapeutique de choix.

### 2.4.3 Opportunité thérapeutique

Les processus de recrutement, de polarisation et les fonctions des TAMs sont devenus des cibles thérapeutiques pour le traitement des GBMs. Le but étant de moduler le nombre, le phénotype et les fonctions des TAMs au sein de la tumeur. Plusieurs stratégies ciblant la réduction du nombre de TAMs au sein de la tumeur ou encore leur reprogrammation sont donc à l'étude.

#### Réduire le recrutement des TAMs au sein de la tumeur

Les facteurs impliqués dans le recrutement des macrophages au sein de la tumeur sont nombreux et divers, incluant des chimiokines et des facteurs de croissance. De plus, plusieurs facteurs peuvent agir sur la même voie de signalisation et une même molécule peut réguler différents processus. Le développement de stratégies thérapeutiques ciblant le recrutement des macrophages est donc délicat (Mantovani et al., 2017).

Le CSF1 est un des facteurs majeurs dans le recrutement et la polarisation des monocytes et des macrophages. Il est abondamment sécrété par les cellules constitutives du microenvironnement tumoral. Son récepteur, le CSF1R, étant exprimé par les monocytes et les macrophages est devenu une des cibles potentielles pour ralentir le recrutement de ces derniers (Mantovani et al., 2017). Le Pexidartinib est un inhibiteur du CSF1R capable de pénétrer la BHE. Il a été testé en essai clinique de phase II chez les patients atteints de GBMs récurrents. Le médicament est bien toléré par les patients mais aucun effet n'a pu être observé sur leur temps de survie. Plusieurs études devront être menées afin de déterminer son efficacité en association avec d'autres agents thérapeutiques (Butowski et al., 2016).

Une autre approche permettant de réduire le recrutement des TAMs est l'inhibition du récepteur de SDF-1, le CXCR4. Comme le CSF1, le SDF-1 est un facteur de recrutement et de polarisation des macrophages. De la même manière que pour le CSF1R, l'inhibition du CXCR4 devrait donc diminuer le recrutement des TAMs au site tumoral. A ce jour, des essais cliniques de phase I ont démontré une tolérance des patients au traitement avec le Plerixafor, inhibiteur du CXCR4. Des études supplémentaires restent nécessaires pour démontrer son efficacité anti-tumorale chez les patients (Lee et al., 2018).

En dehors des récepteurs de chimiokines, les cytokines chimioattractives comme le MCP-1 aussi appelé CCL2, sont également ciblées. Quelques médicaments tels que le Minocycline, le Telmisartan ou le Zoledronic sont à l'étude (Roesch et al., 2018).

#### La reprogrammation des TAMs

Une autre approche se base sur la plasticité phénotypique des TAMs. L'objectif serait de modifier leur phénotype pro-tumoral pour un phénotype anti-tumoral tel que le phénotype pro-inflammatoire M1.

Le facteur de transcription STAT3 est une cible très étudiée. Il diminue l'expression de molécules telles que CD80, CD86 ou encore du CMH II connues pour être exprimées par les macrophages anti-tumoraux. Il joue également un rôle majeur dans le développement tumoral. Le WP1066 est un inhibiteur de la phosphorylation de STAT3, empêchant ainsi l'activation de la voie associée. Un essai clinique en phase I est actuellement en cours pour déterminer la toxicité et la dose à administrer aux patients (NCT01904123, ClinicalTrials.gov). L'inhibition de la voie de signalisation STAT3 consiste donc à bloquer l'influence du microenvironnement tumoral sur le phénotype des macrophages. Une autre approche serait d'orienter les macrophages vers un phénotype anti-tumoral afin de réactiver la réponse immunitaire au sein de la tumeur. PC1/3 est une proprotéine convertase très récemment identifiée comme une nouvelle cible thérapeutique dans la reprogrammation des macrophages (Duhamel et al., 2015).

### 3 Les proprotéines convertases (PCs)

Le protéome, qui désigne l'ensemble des protéines, s'illustre par sa grande complexité. Chaque protéine peut subir des modifications post traductionnelles opérées par diverses enzymes. De nombreuses modifications post traductionnelles existent incluant la

phosphorylation, la glycosylation, l'acétylation, la méthylation, l'oxydation ... L'ensemble de ces modifications régule la fonction, la localisation, l'activité et la structure des protéines de façon réversible ou non.

Le clivage des liaisons peptidiques qui relient les acides aminés d'une protéine, ou protéolyse, est une modification post traductionnelle irréversible. Elle est orchestrée par des protéases classées selon leurs homologues de séquences en 5 familles : les protéases à sérine, les métalloprotéases, les protéases à cystéine, les protéases à thréonine et les protéases à acide aspartique. Les protéases à sérine sont la plus grande famille de protéases chez l'homme. Parmi celles-ci, les proprotéines convertases sont des enzymes clés dans la maturation de nombreux précurseurs protéiques (Puente et al., 2003).

### 3.1 Généralités

La famille des PCs compte 9 membres, dont 7 principales : PC1/3, PC2, la furine, PC4, PC5/6, PACE4, PC7 et les deux dernières décrites plus récemment qui sont l'isozyme de la subtilisine/kexine (SKI-1) et la proprotéine convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9).

#### Maturation

Avant d'exercer leur fonction protéolytique, les PCs sont synthétisées en tant que précurseurs inactifs, appelés zymogènes. Elles doivent elles-mêmes subir un clivage protéolytique de leur région N-terminale qui contient un peptide signal et un pro-segment (Figure 16). Dans un premier temps, leur peptide signal qui permet l'adressage des enzymes vers le réticulum endoplasmique est clivé. Elles acquièrent ensuite leur structure tridimensionnelle grâce à leur pro-segment. Enfin, un processus d'activation protéolytique est nécessaire pour dissocier le pro-segment du site catalytique et ainsi activer l'enzyme une fois que la zone d'activité est atteinte. L'expression tissulaire et la localisation intracellulaire sont propres à chaque PC et sont déterminées par leur région C-terminale (Artenstein and Opal, 2011).

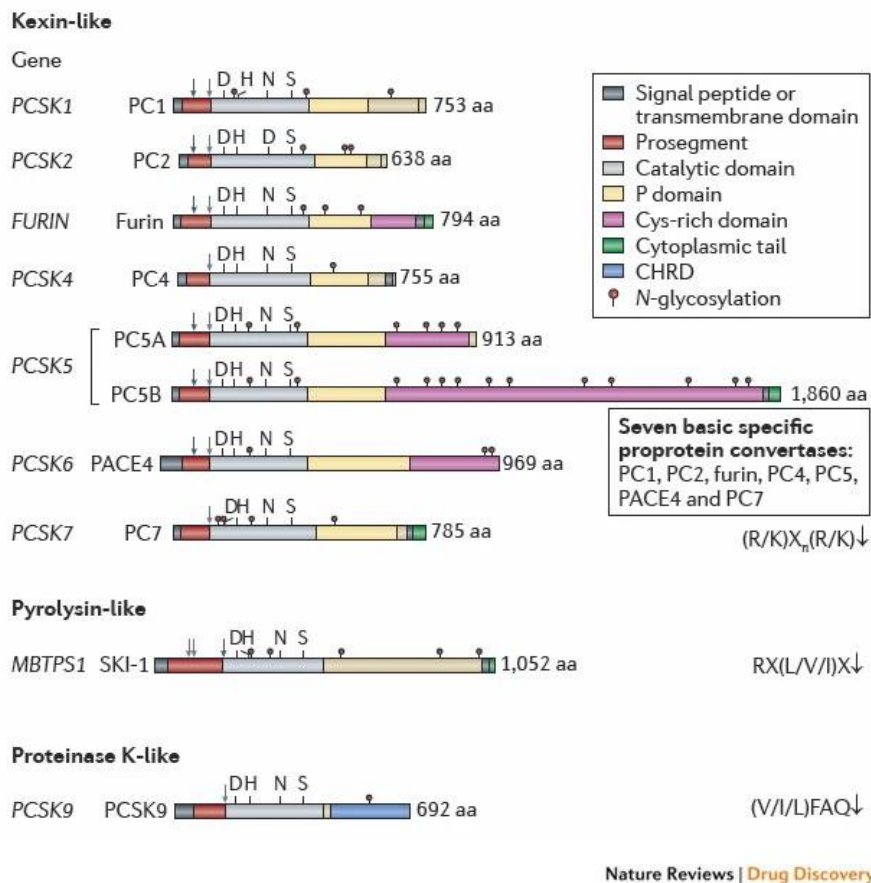


Figure 16: Structure des proprotéines convertases (Seidah and Prat, 2012).

Les proprotéines convertases possèdent toutes un peptide signal responsable de l'adressage de l'enzyme vers le réticulum endoplasmique ainsi qu'un pro-segment permettant le bon repliement de la protéine et son inhibition catalytique. Le clivage de ces deux segments est nécessaire pour l'activité de l'enzyme exercée par son domaine catalytique, très conservé entre les différentes PCs tout comme le domaine P qui intervient dans la stabilité du site catalytique. Les PCs se distinguent par leur région C-terminale qui contribue à la régulation de la localisation et du trafic intracellulaire de l'enzyme.

#### Distributions intracellulaire et tissulaire

Hormis PC7, SKI-1 et la furine qui sont exprimées de manière ubiquitaire, les autres PCs ont une expression tissu-spécifique (Seidah and Prat, 2012). PCSK9, PC5/6 et PACE4 présentent une expression tissulaire très répandue. PCSK9 est ainsi retrouvée dans le foie, les intestins et les reins (Luo et al., 2009) ; PC5/6 est exprimée dans l'intestin, les reins et les ovaires et PACE 4 dans les muscles, le cœur, l'hypophyse, le cervelet et les reins (Seidah and Prat, 2012). PC4, PC1/3 et PC2, quant à elles, ont une répartition tissulaire plus spécifique. PC4 est exprimée dans les cellules germinales des testicules et des ovaires ainsi que dans le placenta (Gyamera-Acheampong and Mbikay, 2009) tandis que PC1/3 et PC2 sont retrouvées

principalement dans le système neuroendocrinien (Seidah and Prat, 2012) et ont plus récemment été décrites dans le système immunitaire (Lansac et al., 2006).

Au sein de la cellule, la furine, PC4, PC5/6 et PACE4 sont retrouvées dans plusieurs compartiments de la voie de sécrétion non régulée notamment dans le réseau Trans-golgien, les endosomes mais aussi à la surface cellulaire et dans le milieu extracellulaire (Seidah and Prat, 2012). PC7 est également retenue à la surface cellulaire (Rousselet et al., 2011). PC1/3 et PC2, quant à elles, sont associées à la voie de sécrétion régulée et sont stockées dans les vésicules de sécrétion (Seidah and Prat, 2012). SKI-1 peut être retrouvée dans les endosomes et les lysosomes (Seidah and Prat, 2012) et PCSK9 est majoritairement co-localisée avec le récepteur aux lipoprotéines de basse densité (LDLR) dans les endosomes et à la surface cellulaire (Nassoury et al., 2007).

#### Activité protéolytique

Les sept principales enzymes sont très similaires et clivent les précurseurs protéiques au motif  $(R/K)X_n(R/K)\downarrow$  où la flèche indique le site de clivage,  $X_n$  le nombre d'acides aminés espaçant les deux résidus arginine (R) ou lysine (K). Elles sont responsables de l'activation, de l'inactivation ou de changements fonctionnels d'un grand nombre d'hormones, de facteurs de croissance, de récepteurs et même d'enzymes. Le huitième membre de la famille des PCs, SKI-1, active des facteurs de transcription membranaires par protéolyse selon le motif  $RX(L/V/I)X\downarrow$  où X représente un acide aminé autre que la cystéine ou la proline, V la valine et I l'isoleucine (Seidah and Prat, 2012). Le dernier membre des PCs, PCSK9, réalise un autoclivage catalytique après son résidu  $VFAQ\downarrow$  où F représente la phénylalanine, A l'alanine et Q la glutamine. Elle interagit avec le LDLR pour promouvoir sa dégradation (Horton et al., 2009).

## 3.2 Fonctions

### 3.2.1 Le développement de modèles murins knockout

Les modèles murins knockout (KO), où les gènes de PCs ont été invalidés, ont permis d'étudier les fonctions physiologiques des PCs. Celles-ci sont répertoriées dans le Tableau 2. Grâce à ces modèles, l'implication des PCs dans l'embryogenèse et dans le développement a pu être démontrée.

Tableau 2 : Substrats et distribution tissulaire des différentes PCs et phénotype des modèles murins KO.

PROPROTEINE CONVERTASE - Gène	EXEMPLE DE SUBSTRAT	DISTRIBUTION TISSULAIRE	PHENOTYPE MODELE MURIN KO
<b>PC1/3 - <i>Pcsk1</i></b> <b>PC2 - <i>Pcsk2</i></b>	POMC, proinsuline, proglucagon	Tissus neuroendocriniens	Obésité Nanisme et retard de croissance
<b>FURINE - <i>Furine</i></b>	TGF- $\beta$ , BMP10	Ubiquitaire	Létalité embryonnaire Malformation cardiaque et osseuse
<b>PC4 - <i>Pcsk4</i></b>	IGF2, PACAP, ADAM	Placenta Gonades	Fertilité réduite
<b>PC5/6 - <i>Pcsk5</i></b>	GDF11	Intestin, les reins et les ovaires	Létalité à la naissance Défaut de développement du cytosquelette
<b>PACE4 - <i>Pcsk6</i></b>	TGF- $\beta$ , BMP, ADAM	Muscles, le cœur, l'hypophyse, le cervelet et les reins	Létalité Malformation cardiaque et osseuse
<b>PC7 - <i>Pcsk7</i></b>	Récepteur transferrine	Ubiquitaire	Aucune anormalité
<b>SKI-1 - <i>Mbtps1</i></b>	SREBPs	Ubiquitaire	Létalité embryonnaire
<b>PCSK9 - <i>Pcsk9</i></b>	PCSK9	Foie, les intestins et les reins	Augmentation de l'expression de LDLR, diminution du cholestérol circulant

PC1/3 et PC2, liées au système neuroendocrinien, sont très souvent exprimées dans les mêmes tissus et dans les mêmes cellules. Elles sont impliquées dans la maturation d'hormones de croissance et de neuropeptides tels que la proinsuline, le proglucagon et la proopiomelanocortine (POMC) (Seidah and Prat, 2012). Le KO de PC1/3 ou de PC2 est associé à un retard de croissance et à un nanisme. Ce phénotype est dû à un déficit de maturation des hormones de croissance telles que la somatocitrine ou encore l'hormone corticotrope (ACTH) normalement issues de la maturation de la POMC (Zhu et al., 2002). Une obésité et une hypoglycémie sont également observées suite au défaut de maturation de la proinsuline (Furuta et al., 2001; Lloyd et al., 2006).

Dans les gonades, PC4 est la seule PC exprimée (Gyamera-Acheampong and Mbikay, 2009). Le modèle murin KO pour PC4 a permis de démontrer l'importance de cette enzyme à leur niveau. En effet, l'inactivation génique de PC4 provoque une fertilité très réduite des

souris (Mbikay et al., 1997). Celle-ci est probablement liée au défaut de maturation du pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) (LI et al., 2006) et de la disintegrin and metalloproteinase (ADAM) (Basak et al., 2004), qui sont deux facteurs impliqués dans le développement des gonades. PC4 est également retrouvée dans le placenta et est impliquée dans l'activation de l'insulin-like growth factor-II (IGF-II) responsable de la migration du trophoblaste et de l'apport de nutriments pendant la croissance foetale (Qiu et al., 2005).

Le modèle KO spécifique de la furine présente une létalité embryonnaire attribuée à un défaut de développement cardiaque. Celui-ci est alloué au manque de maturation du TGF- $\beta$  et de la bone morphogenetic protein 10 (BMP10), deux facteurs indispensables au bon développement cardiaque pendant l'embryogenèse (Roebroek et al., 1998). Pour contrecarrer la létalité du modèle *in vivo*, les fonctions de la furine ont été étudiées par son inactivation génétique inductible dans certains tissus comme le foie chez la souris. Cependant, le clivage de certains substrats de la furine est toujours observé après son inactivation. Il semblerait donc que d'autres PCs soient impliquées dans le clivage des mêmes substrats indiquant la redondance catalytique de certaines de ces enzymes (Seidah and Prat, 2012).

Tout comme la furine, l'invalidation génique de PACE4 conduit à la mort embryonnaire d'un quart des modèles KO, suite à des malformations cardiaques et osseuses. Cette PC est donc également indispensable au développement prénatal. En revanche, aucun changement de phénotype n'est observé chez les souris survivantes. La furine semble cliver les mêmes substrats que PACE4. Ainsi, à l'âge adulte, elle pourrait compenser l'absence de PACE4, d'où l'absence de changement phénotypique (Creemers and Khatib, 2008).

Le KO de PC5/6, quant à lui, provoque une létalité plus tardive. En effet, celle-ci survient à la naissance. Les souris présentent des altérations au niveau du squelette, notamment l'absence de queue ainsi que des défaillances rénale et pulmonaire. Ce phénotype est en partie dû au manque de maturation du facteur de différenciation 11 (GDF11) connu pour réguler le développement squelettique (Essalmani et al., 2008). Les fonctions de PC5/6 ont également été étudiées au sein de cellules endothéliales où aucun phénotype anormal n'a été observé suite à son invalidation génétique, démontrant ainsi que d'autres PCs pourraient compenser son absence en clivant ses substrats (Creemers and Khatib, 2008).

Malgré son expression ubiquitaire, l'invalidation du gène codant pour PC7 ne conduit à aucune anomalie. PC7 présente une répartition tissulaire très similaire à celle de la furine et les deux enzymes semblent être impliquées dans l'activation des mêmes substrats. Ainsi, la furine pourrait compenser l'absence de PC7 (Creemers and Khatib, 2008). Une analyse *in vitro* a cependant permis de démontrer que le récepteur de la transferrine est un substrat spécifique de PC7 traduisant ainsi son implication dans le métabolisme ionique (Guillemot et al., 2013).

SKI-1 a été décrite comme étant impliquée dans le métabolisme lipidique à travers l'activation des précurseurs des sterol regulatory element-binding proteins (SREBP1 et SREBP2), protéines régulatrices du métabolisme des lipides (Seidah and Prat, 2012).

Enfin, PCSK9 est également essentielle au métabolisme lipidique. Elle se lie au LDLR sur les hépatocytes, stimule son internalisation, favorise sa dégradation et empêche le recyclage du LDLR à la surface cellulaire. L'internalisation des LDL et du cholestérol qu'il transporte est donc réduite. Ainsi, le modèle KO de PCSK9 montre un niveau élevé de LDLR dans le foie, une diminution du cholestérol circulant et des LDL-C (Roubtsova et al., 2011). Les LDLRs étant également impliqués dans la clairance des lipides pathogènes tels que le LPS (Topchiy et al., 2016), une réduction de l'activité de PCSK9 est associée à une augmentation de son élimination, une diminution de la réponse inflammatoire et une amélioration du résultat du choc septique (Walley et al., 2014).

Les modèles murins KO pour les PCs ont permis d'identifier les substrats types des enzymes, mais ces dernières sont responsables du clivage d'un grand nombre de précurseurs de récepteurs, de ligands, d'enzymes et de facteurs de croissance. Compte tenu du nombre important de leurs substrats et de leur distribution tissulaire très variée, les PCs sont impliquées dans plusieurs types de pathologies, telles que l'obésité, les maladies cardiovasculaires ou encore le développement tumoral (Couture et al., 2012)

### 3.2.2 L'implication des proprotéines convertases dans le développement tumoral

Les proprotéines convertases sont sur-exprimées dans plusieurs types de cancers

L'expression de PCs au sein des cancers a été très étudiée et plusieurs études démontrent leur corrélation avec la progression de la tumeur. Par exemple, PC1/3 et PC2 sont retrouvées en grande quantité dans les adénomes hypophysaires (Takumi et al., 1998). PACE4



a été décrite comme étant surexprimée dans les cancers de l'ovaire (Longuespée et al., 2014) et de la prostate (D'Anjou et al., 2011). Son inhibition au sein de lignées cellulaires humaines du cancer de la prostate entraîne une diminution de leur prolifération et de leur capacité à former de nouvelles tumeurs chez les modèles murins (D'Anjou et al., 2011). Une augmentation de l'expression de la furine, corrélée avec le caractère invasif de la tumeur, est également observée dans plusieurs cancers localisés au niveau de la tête et du cou comme les cancers de la langue, du pharynx ou encore du larynx (Bassi et al., 2001) et également au sein de gliomes (Wick et al., 2004). L'hypoxie retrouvée au sein des GBMs est une des causes de l'augmentation de l'activité de la furine au sein de la tumeur. Les promoteurs de la furine présentent, en effet, des sites de liaison au facteur de transcription HIF-1, libéré en condition hypoxique (Siegfried et al., 2020).

#### Les substrats des proprotéines convertases et le développement tumoral

Non seulement les PCs sont surexprimées dans les tissus tumoraux mais elles semblent également participer activement au développement tumoral (Figure 17). Cette activité pro-tumorale serait liée à la grande variété des substrats qu'elles clivent. En effet, l'activité et l'expression de la majorité des facteurs impliqués dans la progression tumorale et dans le développement de l'environnement immunosuppresseur sont régulées par les PCs. Ainsi, la prolifération cellulaire est très probablement augmentée par l'activation de facteurs de croissance tels que le platelet-derived growth factor (PDGF), l'IGF et le TGF- $\beta$  par les PCs (Artenstein and Opal, 2011; Bassi et al., 2005). Ce dernier est connu comme un régulateur clé du développement tumoral et des processus inflammatoires et immunologiques. Comme la majorité des substrats des PCs, le TGF- $\beta$  est synthétisé en tant que substrat inactif (proTGF- $\beta$ ) et doit être clivé par la furine pour être actif (Siegfried et al., 2020). Les PCs participent également à la maturation du VEGF et d'enzymes impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire comme les MMPs ou ADAM, favorisant ainsi le processus d'angiogenèse et de métastase (Artenstein and Opal, 2011; Bassi et al., 2005). Certaines PCs, comme la furine, clivent également les intégrines qui contrôlent la mobilité cellulaire et participent ainsi au processus métastatique (Khatib et al., 2002).

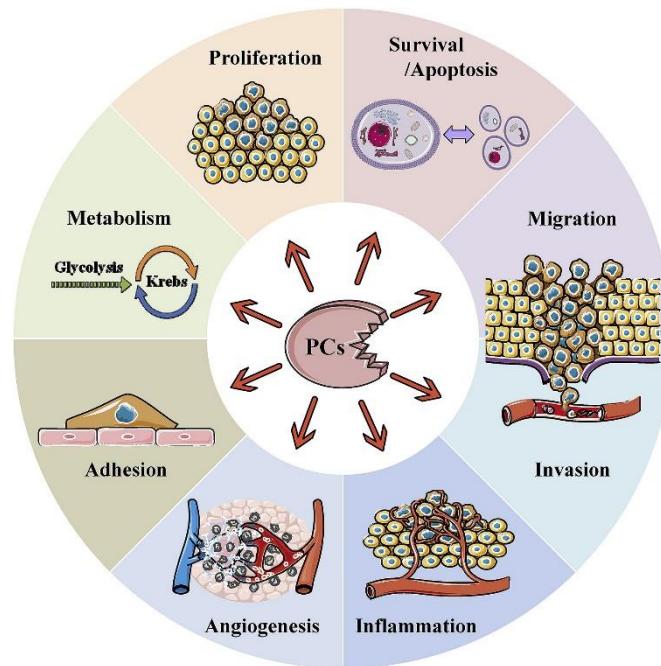


Figure 17 : Implication des proprotéines convertases (PCs) dans le développement tumoral (Siegfried et al., 2020).

Les PCs clivent de nombreux précurseurs de facteurs de croissance et angiogéniques, de protéines d'adhésion cellulaire et de metalloprotéinases. Tous ces substrats sont connus pour participer à différents processus du développement tumoral tels que la prolifération, l'angiogénèse, l'invasion ou encore la migration.

### L'inhibition des proprotéines convertases : une nouvelle opportunité thérapeutique

Au vu de l'implication des PCs dans le développement tumoral, l'inhibition de leur activité protéolytique apparaît comme une nouvelle approche thérapeutique. Ainsi, plusieurs inhibiteurs de PCs ont été développés dans le but de limiter leur rôle dans la maturation de facteurs impliqués dans le développement tumoral (Scamuffa et al., 2008). Leur effet anti-tumoral a pu être démontré dans le cadre du cancer colorectal. Ainsi, la lignée cellulaire humaine du cancer colorectal HT-29 traitée avec le  $\alpha$ 1-antitrypsin Portland ( $\alpha$ 1-PDX), un inhibiteur de PCs, sécrète moins de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\alpha$  et ne présente plus de maturation de l'IGF-1R. Toutes ces molécules sont des substrats de PCs impliqués dans le développement tumoral. Par ailleurs, Bassi et ses collaborateurs (2010) ont également démontré une réduction de la taille de la tumeur suite à l'application d'un inhibiteur de PCs au sein d'un modèle murin de carcinome (Bassi et al., 2010). Pr. R. Day et ses collaborateurs (2015) ont, quant à eux, démontré que l'injection d'un inhibiteur de PCs ralentit de manière significative la progression

tumorale au sein d'un modèle murin de xénogreffe de cancer de la prostate (Levesque et al., 2015).

De par leurs nombreux substrats, les PCs sont impliquées dans de multiples processus cellulaires du développement tumoral mais aussi dans certains processus immunitaires tels que la tolérance et la réponse inflammatoire.

### 3.2.3 Les proprotéines convertases dans l'immunité

Parmi l'ensemble des PCs, la furine et PC1/3 sont deux enzymes décrites comme ayant un rôle dans l'immunité notamment à travers la régulation de la sécrétion de cytokines.

La furine, enzyme clé dans l'activité des macrophages et des lymphocytes

Plusieurs études ont démontré l'implication de la furine dans l'activité des cellules immunitaires. Elle est nécessaire pour le clivage et l'activation du récepteur TLR7 qui assure la médiation de l'activité immunitaire en réponse aux acides nucléiques viraux (Hipp et al., 2013). De plus, l'inhibition de la furine au sein des lymphocytes T n'altère pas leur développement mais réduit considérablement leur capacité à sécréter les cytokines anti-inflammatoires TGF- $\beta$  et IL-10, cytokines essentielles à la régulation de la réponse immunitaire. L'absence de furine est également associée à une sécrétion élevée de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-6 et IFN- $\gamma$  et à la régulation positive de plusieurs gènes généralement associés à l'activation des lymphocytes T, notamment *Fos*, *Jun* et *Ifn $\gamma$* . Ainsi, l'inhibition de la furine au sein de lymphocytes T conduit à leur activation et à une production massive de cytokines pro-inflammatoires (Pesu et al., 2008). La furine est non seulement impliquée dans la régulation de l'activation des lymphocytes mais aussi dans la modulation de l'activité des macrophages. En effet, dans un modèle murin où la furine est génétiquement inactivée de manière inductible et ciblée, les macrophages déficients en furine présentent une régulation positive de nombreux gènes associés à leur activation tels que *Serpinb1a*, *Serpinb2*, *Il6*, *Il1- $\beta$* , *Ccl2*, et *Ccl7* (Cordova et al., 2016). Une augmentation de l'expression de gènes codants pour les cytokines pro-inflammatoires *Tnf- $\alpha$*  et *Il-6* ainsi qu'une diminution du gène codant pour la cytokine anti-inflammatoire *Il-10* est également observée. De plus, l'inhibition de la furine provoque, suite à un stimulus LPS ou IFN- $\gamma$  des macrophages, une augmentation de l'expression de *Nos2*, gène marqueur du phénotype pro-inflammatoire M1. En revanche, l'expression d'*Arg1*, gène marqueur du phénotype anti-inflammatoire M2, est réduite (Cordova et al., 2016). Ainsi, la furine est également impliquée dans la régulation du

phénotype inflammatoire des macrophages en favorisant une orientation anti-inflammatoire, qui est souvent associée à un phénotype pro-tumoral (voir 2.4 Les macrophages associés à la tumeur).

Le rôle de PC1/3 dans la régulation de l'immunité innée

PC1/3 a jusqu'à très récemment été décrite uniquement dans le système neuroendocrinien dans lequel elle clive des précurseurs d'hormones et de neuropeptides. Cependant, l'expression de certains d'entre eux comme la POMC et la proenképhaline (PENK) a été décrite dans le système immunitaire (Day and Salzet, 2002). De plus, une étude *in vivo* réalisée chez des rats et visant à étudier l'expression de PCs dans les cellules immunitaires a révélé une expression de PC1/3 et PC2 par les macrophages et les lymphocytes. Celle-ci a également montré que l'expression de ces deux PCs augmente en condition infectieuse, mimée par la stimulation du TLR4 par le LPS (Lansac et al., 2006). Ces observations ont conduit à des études plus détaillées du rôle de PC1/3 dans l'immunité. Pour ce faire, le modèle murin PC1/3 KO a été utilisé. Ainsi, les macrophages isolés à partir du péritoine de ces souris sécrètent une quantité plus importante de cytokines pro-inflammatoires. Cette sécrétion exacerbée prédispose ces souris à un choc septique suite à une injection de LPS (Refaie et al., 2012). Ces observations ont été confirmées sur la lignée de macrophages alvéolaires de rat NR8383 knockdown (PC1/3 KD) où l'expression de PC1/3 est largement réduite. De plus, une colocalisation de PC1/3 et du TLR4 est observée suite à une stimulation avec le LPS suggérant un rôle essentiel de PC1/3 dans le trafic du TLR4, dans la régulation de la voie de signalisation associée à ce récepteur et dans le contrôle de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Gagnon et al., 2013). Enfin, des analyses protéomiques ont pu confirmer et décrire plus précisément ce rôle (Figure 18). L'inhibition de PC1/3 provoque, en effet, une réorganisation complète du cytosquelette. L'apparition de filopodes, marqueurs de l'activation macrophagique ainsi que l'augmentation de la formation de corps multi-vésiculaires sont observés. L'homéostasie calcique est également impactée, le niveau basal de calcium est très élevé dans les macrophages PC1/3 KD. De plus, suite à une stimulation du TLR4 avec le LPS, la voie de signalisation NF- $\kappa$ B est plus longtemps activée dans ces macrophages (Duhamel et al., 2015). Cette amplification est causée par une accélération du recyclage du TLR4 à la surface cellulaire et par une expression exacerbée de MyD88, adaptateur majeur de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Rodet et al., 2019).

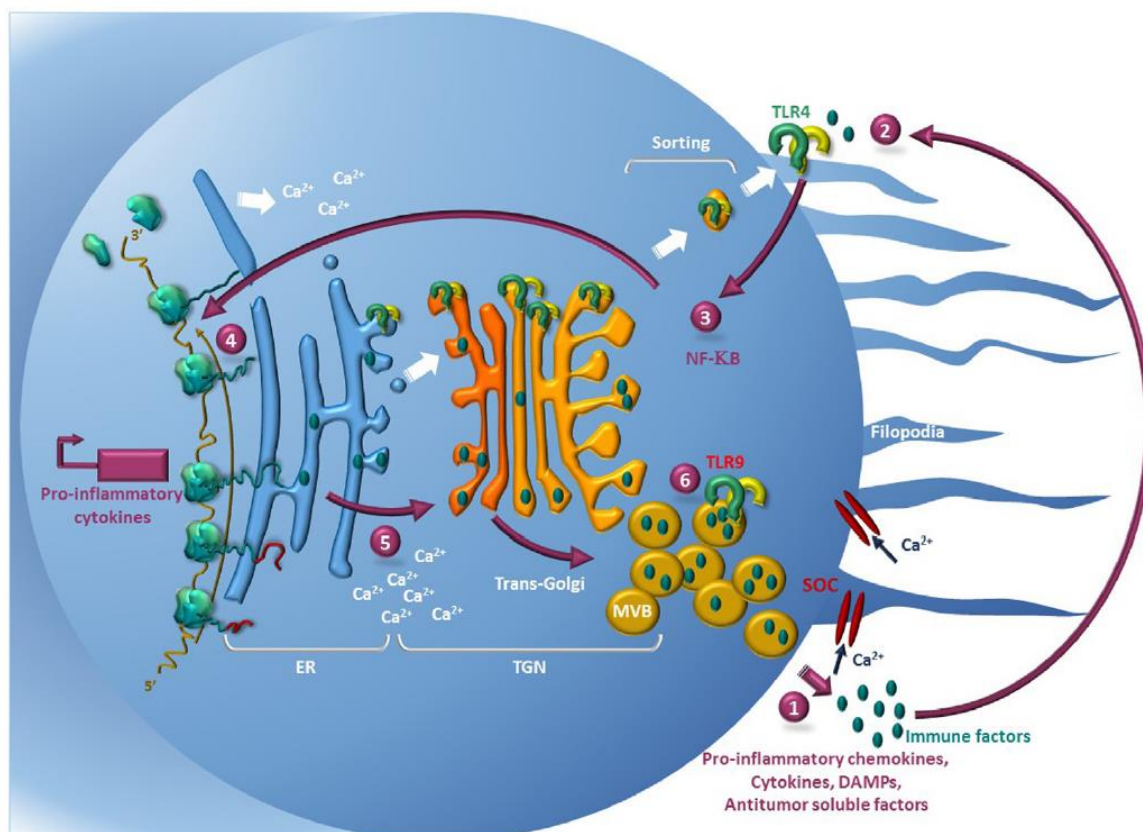


Figure 18 : Schéma décrivant l'impact de l'inhibition de PC1/3 au sein des macrophages (Duhamel et al. 2016).

L'inhibition de PC1/3 conduit à la formation de corps multivésiculaires et à la sécrétion abondante de cytokines pro-inflammatoires (1). La stimulation des récepteurs TLR4 et 9 par les motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs) (2) induit l'activation de la voie de signalisation NF-κB (3). Il s'en suit une translocation nucléaire du facteur de transcription NF-κB (4) résultant en une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires exacerbée. L'inhibition de PC1/3 conduit également à l'augmentation du taux de calcium intracellulaire (5) et du nombre de MVBs (6) qui contribuent à l'augmentation de la sécrétion de cytokines.

L'ensemble de ces changements explique l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages PC1/3 KD. Un résultat similaire a été observé suite à l'activation du TLR9 par du CpG-ODN bien que les cytokines libérées soient différentes selon le TLR stimulé (Duhamel et al., 2015, 2016a). Par ailleurs, l'activation de la voie anti-inflammatoire STAT3 est également réduite dans les macrophages PC1/3 KD. Ainsi, ils conservent cette orientation pro-inflammatoire même en présence d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire sécrétée par les cellules cancéreuses et ayant un rôle majeur dans l'induction d'un environnement immunosuppresseur (Duhamel et al., 2015). Cette caractéristique indique que l'inhibition de PC1/3 dans les macrophages pourrait constituer une stratégie anti-tumorale pertinente. Cette hypothèse a pu être confortée par les tests biologiques qui ont été réalisés (Duhamel et al., 2015).

En effet, les facteurs sécrétés par les macrophages PC1/3 KD stimulés au LPS présentent des activités biologiques très intéressantes. Notamment un effet chimiotactique sur les lymphocytes T auxiliaires naïfs (Th0) exercé par les chimiokines CXCL10, CXCL9 et CCL20 a pu être observé (Duhamel et al., 2015). De plus, suite au traitement au LPS, les macrophages PC1/3 KD sécrètent également plus de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$ . Ce profil cytokinique suggère que les LT auxiliaires naïfs Th0 préalablement recrutés pourraient être orientés vers un profil Th1. La réponse immunitaire cytotoxique pourrait donc être favorisée dans un environnement comprenant des macrophages PC1/3 KD (Duhamel et al., 2015).

Par ailleurs, le sécrétome des macrophages PC1/3 KD exerce une activité anti-tumorale contre les lignées cellulaires humaines des cancers du sein SKBR3 et de l'ovaire SKOV3. Ainsi, l'inhibition de PC1/3 associée à la stimulation du TLR4 semble être une opportunité thérapeutique à exploiter pour contrecarrer l'immunosuppression observée au sein de l'environnement tumoral (Duhamel et al., 2015).

L'implication des PCs dans le développement tumoral et dans la modulation du phénotype inflammatoire des macrophages ouvre sur une nouvelle visée thérapeutique. D'autant plus que l'inhibition de PC1/3 au sein de macrophages induit un phénotype pro-inflammatoire et anti-tumoral, accentué suite à la stimulation du TLR4 (Duhamel et al., 2015).

## OBJECTIFS DE LA THESE

Au cours de cette thèse, plusieurs stratégies thérapeutiques ciblant les gliomes ont été envisagées et ce avec un objectif double. Il s'agissait à la fois de rendre la tumeur visible pour le système immunitaire mais aussi de réactiver les macrophages associés à la tumeur. Pour ce faire, les objectifs de la thèse étaient donc les suivants :

- Mettre en place une stratégie de réactivation des macrophages via l'utilisation combinée d'un inhibiteur de PCs et de ligands des TLRs.
- Ralentir le développement tumoral en diminuant la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons dans un premier temps développé une stratégie d'activation du TLR4 de façon stérile par l'utilisation du Placlitaxel sur des macrophages PC1/3 KD. Le but est d'activer la production de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs anti-tumoraux. Ensuite, face aux résultats encourageants obtenus, nous avons évalué l'activité anti-tumorale des facteurs sécrétés par ces macrophages sur un modèle 3D associant ou non les cellules de gliome de rat C6 et les macrophages. Les résultats positifs nous ont conduits à élargir la stratégie à l'inhibition de plusieurs PCs par un inhibiteur commercial. Cela permettrait de réduire directement le développement tumoral en réduisant la maturation des substrats de ces enzymes et d'orienter les macrophages vers un phénotype favorable à l'activation d'une réponse immunitaire dirigée contre les cellules cancéreuses. Les résultats de cette stratégie sont présentés dans un deuxième article où l'activité anti-tumorale de l'inhibiteur et sa capacité à orienter les macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire ont été démontrées sur un modèle de culture 3D comprenant les cellules immunitaires et les cellules cancéreuses. Pour accentuer le phénotype anti-tumoral des macrophages, l'utilisation de l'inhibiteur a été couplée avec le Poly (I:C), ligand du récepteur TLR3 dont les effets anti-tumoraux ont déjà été décrits au sein des gliomes (Kees et al., 2012). La stimulation du TLR3 qui régit une voie antivirale et l'inhibition de PC1/3 activeraient à la fois la réponse pro-inflammatoire et anti-virale. Ainsi, dans un troisième article nous avons mis en évidence l'activité anti-tumorale des facteurs sécrétés par les macrophages stimulés au Poly (I:C) et la complémentarité de ces facteurs et de l'inhibiteur de PCs contre les gliomes.

## CHAPITRE I

---

### L'INHIBITION DE PC1/3 AU SEIN DE MACROPHAGES ASSOCIEE A UN TRAITEMENT AVEC DU PACLITAXEL EST UNE STRATEGIE THERAPEUTIQUE NOVATRICE DANS LE TRAITEMENT DES GLIOBLASTOMES

#### Introduction

L'environnement tumoral est complexe et regroupe plusieurs types cellulaires, notamment des cellules immunitaires telles que des macrophages. Au lieu de remplir leurs fonctions immunologiques et de déclencher une réponse immunitaire contre la tumeur, les TAMs vont au contraire participer au développement tumoral. La plasticité phénotypique des macrophages peut être utilisée pour reprogrammer les macrophages exprimant un phénotype anti-inflammatoire et pro-tumoral vers un phénotype anti-tumoral et pro-inflammatoire afin de restaurer la possibilité d'une réponse immunitaire contre la tumeur. La reprogrammation des macrophages au sein de GBMs serait donc une avancée thérapeutique dans le cadre de leur traitement.

Dans cette optique, le laboratoire a étudié l'implication de PC1/3 dans l'orientation du phénotype inflammatoire des macrophages. Pour cela, une invalidation génique de PC1/3 par knock out a été réalisée chez la souris (Refaie et al., 2012) et par knock down via l'utilisation de shRNA au sein de la lignée de macrophages alvéolaires de rat NR8383 (Gagnon et al., 2013). Ces cellules sont appelées « PC1/3 KD » pour PC1/3 Knockdown. Les cellules contrôles, « NT » pour non-target, ont été transfectées avec un shRNA ne ciblant aucune protéine connue dans ces macrophages. Ainsi, les macrophages PC1/3 KD tout comme les macrophages issus des souris PC1/3 KO présentent une sécrétion spontanée de cytokines pro-inflammatoires accentuée suite à une stimulation du TLR4 par le LPS (Duhamel et al., 2015; Gagnon et al., 2013; Refaie et al., 2012). De plus, cette sécrétion accrue de cytokines est retrouvée en condition immunosuppressive, mimée par une stimulation avec l'IL-10. Cette cytokine anti-inflammatoire est hautement sécrétée dans le microenvironnement tumoral et est responsable de l'immunosuppression observée dans de nombreuses tumeurs comme le GBM. Par ailleurs, l'association de l'inhibition de PC1/3 et de la stimulation du TLR4 par le LPS induit une sécrétion de facteurs anti-tumoraux actifs contre les lignées cellulaires humaines du cancer du sein SKBR3 et de l'ovaire SKOV3 (Duhamel et al., 2015). Ainsi, l'association entre



l'inhibition de PC1/3 et la stimulation du TLR4 semble être une approche intéressante pour la reprogrammation des macrophages au sein de tumeurs. Cependant, le LPS étant immunogène, son utilisation en thérapie déclencherait une réponse immunitaire exacerbée du patient. Ainsi, dans le développement de cette stratégie thérapeutique, le Paclitaxel a été choisi pour remplacer le LPS en tant que ligand stérile du TLR4. Cependant, il ne faut pas négliger le fait que les TAMs sont également connus pour moduler profondément la réponse à la chimiothérapie. Nous nous sommes donc également demandés si l'inactivation de PC1/3 permettrait d'enrayer cet effet. Dans ce contexte, nous nous sommes focalisés sur les taxanes, comme le Paclitaxel, qui sont des agents chimiothérapeutiques essentiels en oncologie. Le Paclitaxel, vendu sous le nom de Taxol, est un agent thérapeutique utilisé pour le traitement des cancers du sein, du poumon et de l'ovaire. Sa nature lipophile lui permet de passer la membrane plasmique (Byrd-Leifer et al., 2001). Plusieurs études ont démontré son efficacité anti-tumorale *in vitro* et *in vivo*, sur un modèle murin de xénogreffe de glioblastome, où une réduction du volume de la tumeur est observée (Ruan et al., 2017). Ce dernier stimule la formation de microtubules et les stabilise en empêchant leur dépolymérisation. En supprimant la dynamique des microtubules, le Paclitaxel inhibe la formation correcte du fuseau mitotique, étape essentielle de la mitose. Il exerce ainsi ses fonctions cytotoxiques par l'inhibition de la division cellulaire mais aussi à travers le système immunitaire en stimulant la réponse immunitaire. En effet, le Paclitaxel présente des propriétés mimétiques du LPS et est reconnu comme ligand du TLR4 (Akira and Takeda, 2004). En se liant au TLR4, il active à la fois les voies de signalisation MyD88-dépendante et indépendante induisant l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et des protéines kinases associées aux microtubules (MAPK) conduisant ainsi à la production de facteurs inflammatoires (Figure 19) (Byrd-Leifer et al., 2001).

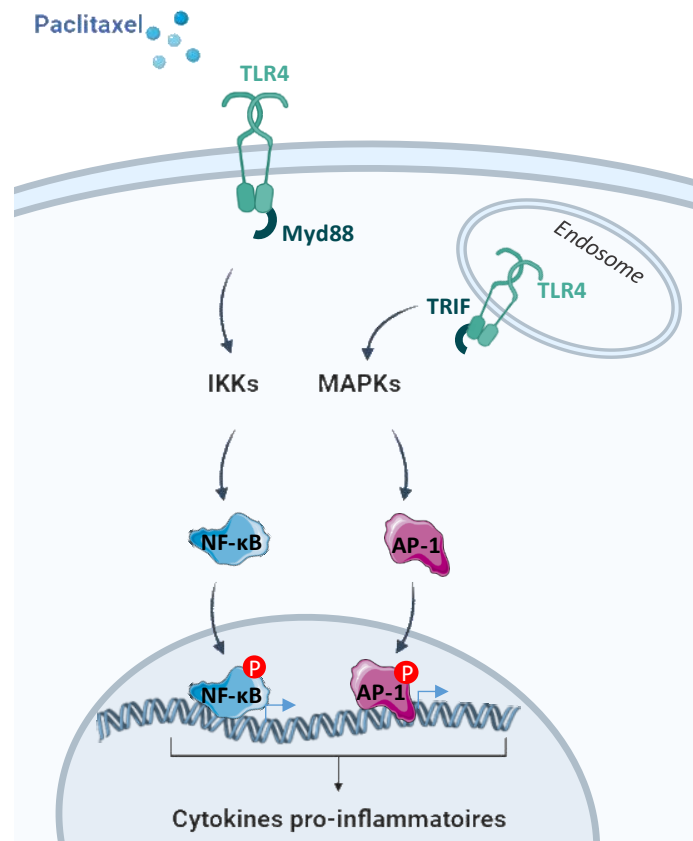


Figure 19 : Activation de la voie de signalisation associée au TLR4 par le Paclitaxel (d'après Byrd-Leifer et al., 2001).

La liaison du Paclitaxel au TLR4 active deux voies de signalisation, une voie Myd88 dépendante et une voie Myd88 indépendante dans laquelle la protéine adaptatrice TRIF intervient. La voie Myd88 dépendante est caractérisée par le recrutement de la protéine adaptatrice Myd88 par le TLR4. Cette liaison permet une cascade de signalisation qui aboutit à la phosphorylation du complexe IKK $\alpha$ / $\beta$  et à la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. De la même manière, une stimulation au Paclitaxel induit le recrutement de TRIF, la phosphorylation des MAPKs et la translocation nucléaire d'AP-1. L'activation de ces voies de signalisation aboutit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

## Objectifs

Dans l'optique de remplacer le LPS par le Paclitaxel, nous voulions déterminer si les effets des deux ligands sur les macrophages étaient similaires. Le but étant d'évaluer si l'inhibition de PC1/3 dans les macrophages combinée à l'activation du TLR4 par le Paclitaxel pourrait constituer une thérapie efficace contre les gliomes. Pour cela, nous avons de nouveau utilisé la lignée de macrophages alvéolaires de rat NR8383 PC1/3 KD ainsi que les cellules contrôles, les NR8383 NT (Gagnon et al., 2013).

La réponse des macrophages PC1/3 KD au Paclitaxel fut donc explorée et comparée à celle observée suite à une stimulation au LPS. Le profil protéique des macrophages a ainsi été étudié au travers des analyses protéomiques pour appréhender leur phénotype. Des tests biologiques effectués sur une lignée cellulaire de gliome de rat, les C6, ont permis d'analyser l'effet anti-tumoral du Paclitaxel et son action sur la sécrétion de facteurs anti-tumoraux par les macrophages. Afin de vérifier l'impact du Paclitaxel au sein d'un environnement plus complexe et plus proche du microenvironnement tumoral, des tests d'invasion ont été effectués sur des sphéroïdes composés de C6, en co-culture ou non avec des macrophages. L'impact de l'association entre l'inhibition de PC1/3 et la stimulation du TLR4 par le Paclitaxel en tant que stratégie thérapeutique dans le traitement des GBMs a donc été évalué (Figure 20).

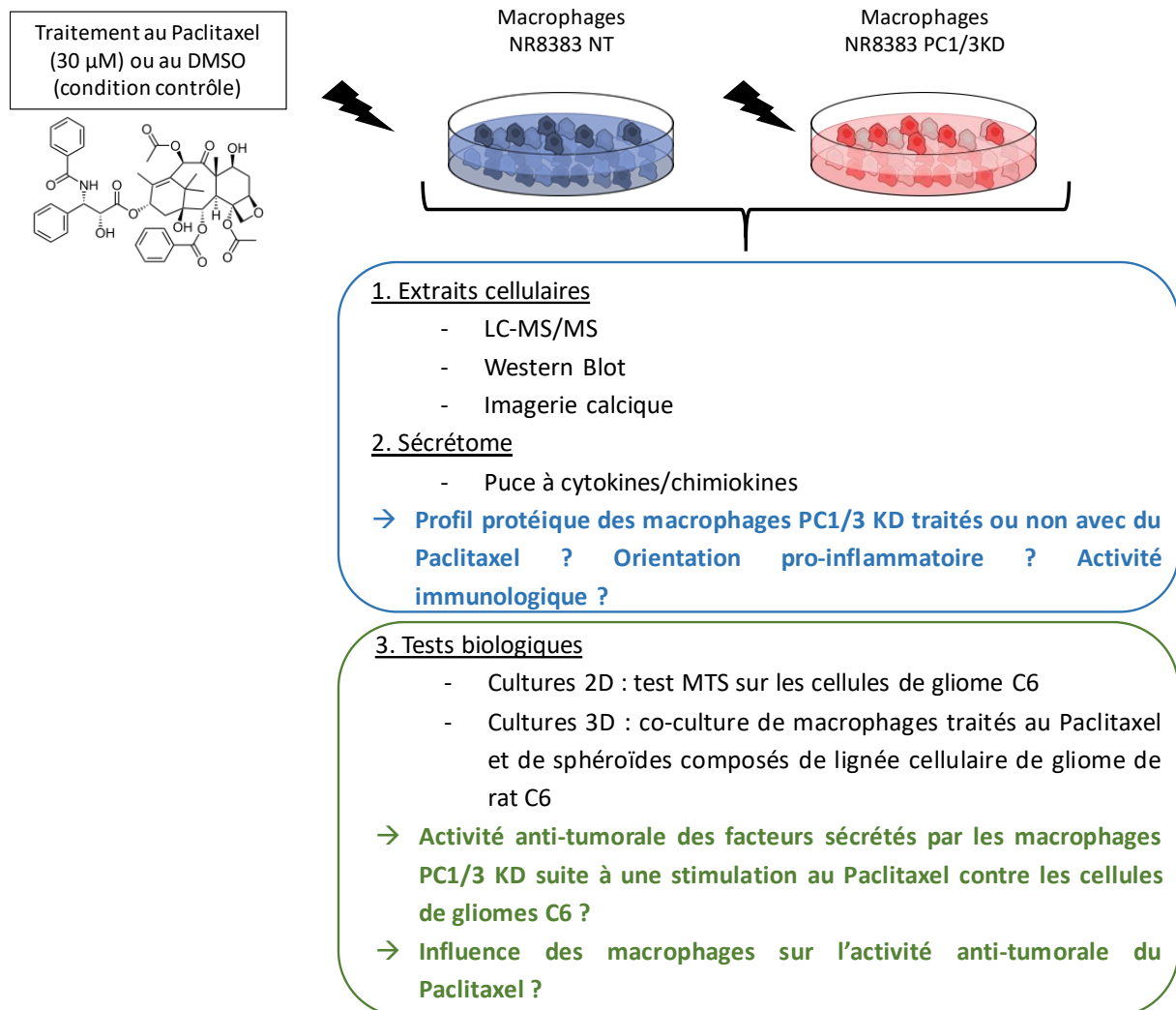


Figure 20 : Objectifs et stratégie expérimentale de l'étude de l'effet du Paclitaxel sur les macrophages PC1/3 KD (d'après Duhamel et al., 2018).

## Résultats

### Influence du Paclitaxel sur le phénotype des macrophages PC1/3 KD

Une analyse protéomique du contenu cellulaire des macrophages NT et PC1/3 KD a tout d'abord été réalisée. Celle-ci démontre que les macrophages PC1/3 KD stimulés au Paclitaxel présentent une sur-expression d'intégrines et de protéines du cytosquelette comme la filamin-a, la calponin 2 ou encore la coronin 1c. Ces résultats suggèrent une réorganisation du cytosquelette des macrophages PC1/3 KD confirmant les observations d'une étude précédente du laboratoire qui décrit les conséquences moléculaires de l'inhibition de PC1/3 au sein de macrophages (Duhamel et al., 2015). Une augmentation de l'expression de l'anoctamin-6 ; liée à la phagocytose ainsi que des protéines de la réponse immunitaire CD36 et galectines 1 et 3, est également observée dans ces cellules suite à une stimulation avec le Paclitaxel. Ce profil protéique traduit une activation des fonctions immunologiques des macrophages et confirme l'implication de PC1/3 dans la modulation du phénotype inflammatoire et immunitaire des macrophages.

L'étude du profil protéique des macrophages NT et PC1/3 KD a été complétée par l'analyse de leurs sécrétomes par spectrométrie de masse et puces à cytokines. Comme décrit précédemment (Duhamel et al., 2015), les macrophages PC1/3 KD sécrètent spontanément plus de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires que les macrophages NT. Certaines de ces cytokines sont spécifiques des macrophages non stimulés, notamment CXCL10, TNF- $\alpha$ , IL-6 et CXCL2. D'autres telles que CCL5 et CXCL1, sont également retrouvées dans le sécrétome des macrophages PC1/3 KD suite à une stimulation au Paclitaxel. De plus, le Paclitaxel induit la sécrétion de cytokines distinctes, telles que CCL3, CXCL3 et IL-1 $\beta$  dont la libération est uniquement observée pour les macrophages stimulés par celui-ci. Ainsi, le Paclitaxel induit, tout comme le LPS, une orientation des macrophages PC1/3 KD vers un phénotype pro-inflammatoire.

Précédemment, le laboratoire a démontré que le LPS avait la capacité d'orienter les macrophages PC1/3 KD vers un phénotype pro-inflammatoire au sein d'un environnement anti-inflammatoire, mimé par une stimulation à l'IL-10 (Duhamel et al., 2015). Nous voulions donc vérifier que le Paclitaxel avait la même activité au sein d'un environnement anti-inflammatoire. Pour cela, nous avons ajouté de l'IL-10 dans le milieu de culture des macrophages avant la stimulation avec du Paclitaxel. L'analyse avec des puces à cytokines ensuite réalisée sur le sécrétome des macrophages a démontré que le profil protéique pro-

inflammatoire des macrophages PC1/3 KD subit quelques modifications suite à une stimulation avec l'IL-10. Leur sécrétion spontanée de cytokines pro-inflammatoires est, en effet, très légèrement réduite mais reste, malgré tout, plus élevée que celle des macrophages contrôles. Une stimulation du TLR4 avec le Paclitaxel ou le LPS permet de renforcer le profil pro-inflammatoire des macrophages PC1/3 KD et aussi de leur apporter une résistance face à un environnement immunosuppresseur. En effet, une stimulation préalable avec l'IL-10 n'induit aucun changement dans la sécrétion de cytokines par les macrophages PC1/3 KD stimulés au Paclitaxel. De plus, des western blots réalisés sur des extraits cellulaires de macrophages PC1/3 KD ont permis de mettre en évidence une forte diminution de la phosphorylation de STAT3 et donc de l'activation de la voie anti-inflammatoire qui en découle. Ceci explique pourquoi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par ces macrophages est maintenue même en présence d'IL-10.

#### Activité anti-tumorale du Paclitaxel et des facteurs sécrétés par les macrophages PC1/3 KD traités au Paclitaxel

Une activité anti-tumorale des facteurs sécrétés par les macrophages PC1/3 KD stimulés au LPS a été mise en évidence sur des lignées cellulaires de cancer du sein et de l'ovaire (Duhamel et al., 2015). Lors de notre étude protéomique, des facteurs pro-tumoraux tels que Stress induced-phosphoprotein 1 (Stip1) et Heat shock proteins (HSP 90-alpha et HSP-90 beta) ont été retrouvés dans le sécrétome de macrophages PC1/3 KD et NT stimulés au Paclitaxel. Cependant, ce dernier induit également la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de protéines impliquées dans différentes fonctions immunologiques des macrophages. Des analyses ont alors été réalisées pour tester l'activité biologique des facteurs sécrétés par ces macrophages stimulés au Paclitaxel. Des tests biologiques évaluant la viabilité et l'invasion ont été réalisés sur la lignée cellulaire de gliome de rat C6. Ainsi, comme décrit dans la littérature, une diminution de la densité cellulaire des C6 est observée 48h suivant le traitement au Paclitaxel. En effet, le Paclitaxel est utilisé dans de nouvelles approches thérapeutiques ciblant les GBMs (Ruan et al., 2017). En revanche, cette diminution est plus rapide et plus robuste lorsque les cellules de gliome sont incubées avec le sécrétome de macrophages PC1/3 KD préalablement stimulés au Paclitaxel. Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition de PC1/3 au sein des macrophages couplée à une stimulation du TLR4 par le Paclitaxel induise la sécrétion de facteurs présentant une activité anti-tumorale.

De plus, le Paclitaxel utilisé à de faibles concentrations (20 à 80 nM) provoque également la diminution de l'invasion des sphéroïdes composés de C6. Cependant, lorsque ces sphéroïdes sont cultivés en présence de macrophages PC1/3 KD ou NT, la diminution de l'invasion provoquée par le Paclitaxel est amoindrie. La présence de macrophages dans l'environnement semble donc donner un effet protecteur aux cellules cancéreuses. Au vu des facteurs pro-tumoraux retrouvés dans le sécrétome des macrophages stimulés au Paclitaxel, ce résultat n'est pas surprenant. Cependant, une stimulation des macrophages au Paclitaxel avant la mise en co-culture avec les sphéroïdes permet de s'affranchir de cet effet protecteur. En effet, en présence de ces macrophages PC1/3 KD ou NT stimulés, l'invasion des sphéroïdes C6 diminue. Ceci laisse envisager que les macrophages NT et PC1/3 KD stimulés au Paclitaxel sécrètent des facteurs anti-tumoraux. Des analyses protéomiques ont été réalisées sur les sécrétomes des sphéroïdes cultivés avec les deux types de macrophages stimulés au Paclitaxel. Celles-ci mettent en évidence que les deux milieux de culture présentent un profil protéique différent. Des marqueurs de l'invasion tumorale tels que l'Ezrin ou encore la Sorcin sont observés spécifiquement dans le milieu des sphéroïdes C6 cultivés avec les macrophages NT pré-stimulés au Paclitaxel. Dans le sécrétome des sphéroïdes cultivés avec les macrophages PC1/3 KD pré-stimulés au Paclitaxel, la sécrétion de facteurs impliqués dans le développement tumoral et de facteurs, au contraire, anti-tumoraux est observée. Ainsi, nous retrouvons notamment Rac1, ayant un rôle majeur dans le développement des gliomes ainsi que Myl6, retrouvée dans les exosomes de GBMs. A l'opposé, la protéine phosphatase 32 (ANP32A, pp32) présente dans les exosomes de macrophages lors d'une inflammation et le facteur de coagulation IX sont connus pour leur activité anti-tumorale au sein des cancers du pancréas (Williams et al., 2010) et des carcinomes (Kitano et al., 2015). Ainsi, bien qu'aucune différence ne soit visible entre l'effet exercé par les macrophages NT et PC1/3 KD sur l'invasion des sphéroïdes C6, ces résultats suggèrent que la résistance au Paclitaxel soit plus modérée en présence des macrophages PC1/3 KD. Les facteurs anti-tumoraux retrouvés dans le sécrétome des sphéroïdes cultivés avec les macrophages PC1/3 KD pourraient, en effet, contrebalancer l'effet des facteurs pro-tumoraux.

La présence de protéines retrouvées dans les exosomes au sein du sécrétome des sphéroïdes nous a amené à nous demander si ces derniers ne seraient pas responsables de l'effet anti-tumoral du sécrétome des macrophages PC1/3 KD stimulés au Paclitaxel. En effet,

des études précédentes ont démontré une augmentation de la formation de corps multivésiculaires au sein des macrophages PC1/3 KD (Duhamel et al., 2015, 2016a). Or, ces corps multivésiculaires sont une source importante de vésicules extracellulaires. Ces dernières sont un moyen de communication intercellulaire et peuvent contenir différents types de molécules telles que des lipides, des acides nucléiques ou des protéines (Minciacchi et al., 2015). Nous voulions déterminer si les facteurs anti-tumoraux sécrétés par les macrophages stimulés au Paclitaxel pourraient être contenus dans ces vésicules. Ainsi, nous avons testé l'effet anti-tumoral de vésicules purifiées à partir du sécrétome de macrophages PC1/3 KD ou NT stimulés au Paclitaxel. Ainsi, une diminution de l'invasion des sphéroïdes est uniquement observée avec les vésicules issues des macrophages PC1/3 KD et ce, après 48h de traitement. Il semblerait donc que les vésicules issues des macrophages PC1/3 KD possèdent une activité anti-tumorale. Cependant, cet effet anti-tumoral disparaît avec le temps. Ceci suggère un effet transitoire qui pourrait être dû à un effet synergique avec d'autres facteurs solubles du sécrétome ou à la dégradation des molécules anti-tumorales au cours du temps.



# Paclitaxel Treatment and Proprotein Convertase 1/3 (PC1/3) Knockdown in Macrophages is a Promising Antiglioma Strategy as Revealed by Proteomics and Cytotoxicity Studies\*

Marie Duhamel<sup>†¶|||</sup>, Mélanie Rose<sup>‡§|||</sup>, Franck Rodet<sup>‡</sup>, Adriana Natalia Murgoci<sup>‡§§</sup>, Lea Zografidou<sup>¶</sup>, Anne Régnier-Vigouroux<sup>¶</sup>, Fabien Vanden Abeele<sup>||</sup>, Firas Kobeissy<sup>\*\*</sup>, Serge Nataf<sup>‡‡</sup>, Laurent Pays<sup>‡‡</sup>, Maxence Wisztorski<sup>‡</sup>, Dasa Cizkova<sup>§§</sup>, Isabelle Fournier<sup>‡</sup>, and Michel Salzet<sup>|||</sup>

High grade gliomas are the most common brain tumors in adult. These tumors are characterized by a high infiltration in microglial cells and macrophages. The immunosuppressive tumor environment is known to orient immune cells toward a pro-tumoral and anti-inflammatory phenotype. Therefore, the current challenge for cancer therapy is to find a way to reorient macrophages toward an antitumoral phenotype. Previously, we demonstrated that macrophages secreted antitumoral factors when they were invalidated for the proprotein convertase 1/3 (PC1/3) and treated with LPS. However, achieving an activation of macrophages via LPS/TLR4/Myd88-dependent pathway appears yet unfeasible in cancer patients. On the contrary, the antitumor drug Paclitaxel is also known to activate the TLR4 Myd88-dependent signaling pathway and mimics LPS action. Therefore, we evaluated if PC1/3 knock-down (KD) macrophages could be activated by Paclitaxel and efficient against glioma. We report here that such a treatment of PC1/3 KD macrophages drove to the overexpression of proteins mainly involved in cytoskeleton rearrangement. In support of this finding, we found that these cells exhibited a  $Ca^{2+}$  increase after Paclitaxel treatment. This is indicative of a possible depolymerization of microtubules and may therefore reflect an activation of inflammatory pathways in macrophages. In such a way, we found that PC1/3 KD macrophages displayed a repression of the anti-inflammatory pathway STAT3 and secreted more pro-inflammatory cytokines. Extra-

cellular vesicles isolated from these PC1/3 KD cells inhibited glioma growth. Finally, the supernatant collected from the coculture between glioma cells and PC1/3 KD macrophages contained more antitumoral factors. These findings unravel the potential value of a new therapeutic strategy combining Paclitaxel and PC1/3 inhibition to switch macrophages toward an antitumoral immunophenotype. *Molecular & Cellular Proteomics* 17: 10.1074/mcp.RA117.000443, 1126–1143, 2018.

Cancer cells share eight common traits (“hallmarks”) that govern their transformation from normal cells and maintenance in the host environment: (1) they stimulate their own growth (self-sufficiency in growth signals), (2) they resist inhibitory signals that might otherwise hinder their growth and proliferation (insensitivity to antigrowth signals), (3) they resist programmed cell death (evading apoptosis) and other cell death mechanisms, (4) they can multiply indefinitely (limitless replicative potential), (5) they stimulate blood vessels growth to supply nutrients to tumors (sustained angiogenesis), (6) they invade local tissues and metastasize to distant sites (tissue invasion and metastasis), (7) they have altered metabolic pathways, and (8) finally, they evade the immune system (1). This last-mentioned feature has radically changed our views on cancer pathophysiology by pointing the crucial in-

From the <sup>†</sup>Inserm U-1192, Laboratoire de Protéomique, Réponse Inflammatoire, Spectrométrie de Masse (PRISM), Université Lille 1, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve D’Ascq, France; <sup>§</sup>Oncovet Clinical Research (OCR), SIRIC ONCOLille, Villeneuve d’Ascq, France; <sup>¶</sup>Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Johann-Joachim-Becher-Weg 15, D-55128 Mainz, Germany; <sup>||</sup>Inserm U-1003, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics, Université Lille 1, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d’Ascq, France; <sup>\*\*</sup>Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, American University of Beirut, 1107 2020 Beirut, Lebanon; <sup>‡‡</sup>Inserm U-1060, CarMeN Laboratory, Banque de Tissus et de Cellules des Hospices Civils de Lyon, Université Lyon-1, Hôpital Edouard Herriot, 69437 Lyon cedex 03, France; <sup>§§</sup>Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, 845 10, Bratislava, Slovak Republic

Received November 1, 2017, and in revised form, March 10, 2018

Published, MCP Papers in Press, March 12, 2018, DOI 10.1074/mcp.RA117.000443



structuring effects exerted by cancer cells on both local and systemic immune responses. Thus, working toward new immunotherapeutic approaches for cancer is now considered as a priority task.

Among the many mechanisms that drive tumor immune evasion, tumor-associated macrophages (TAM)<sup>1</sup> greatly contribute to the resistance to immune responses. Indeed, the local and systemic environments shaped by tumor microenvironment suppress the antitumor functions of macrophages (2, 3). Moreover, TAMs promote tumor growth. In fact, a high TAM number coupled with a low T cell number correlate with poor prognosis in cancer patients (4, 5). Furthermore, the expression of the chemokine CCL2 is associated with TAM migration to the tumor site (6) and the M-CSF factor secreted by tumor cells shapes TAM functional activity. Indeed, M-CSF not only attracts TAMs (7) but also induces a switch from a pro-inflammatory M1 into an anti-inflammatory M2 immunophenotype (8). Accordingly, elevated systemic or local levels of M-CSF are associated with poor outcomes (7, 9, 10). Taken together, these findings highlight the major roles that TAMs play in mediating tumor growth and metastasis. This vital interaction between tumor cells and TAMs implicates a key opportunity for cancer treatment intervention.

Considering the above, we recently demonstrated in proprotein convertase PC1/3 knock-out mice (11), as well as in the pulmonary resident NR8383 rat macrophage PC1/3 knock-down (PC1/3-KD) cell line (12), that PC1/3-deficient macrophages produce high levels of cytokines and chemokines through autocrine and paracrine pathways (13). Challenging these cells with endotoxin/LPS, results in a cytokine storm that impacts cell survival of cancer cells (13). In fact, PC1/3 protein regulates cytokines and chemokines secretion in macrophages. Indeed, under LPS stimulation, the TLR4 MyD88-dependent signaling pathway is enhanced in PC1/3-deficient macrophages promoting a stable pro-inflammatory activated phenotype. Secreted factors from these PC1/3-KD macrophages not only attract naïve T helper cells but also inhibit ovarian and breast cancer cell lines viability via innate immune mechanisms (13).

<sup>1</sup> The abbreviations used are: TAM, Tumor Associated Macrophages; ACN, Acetonitrile; Ca<sup>2+</sup>, Calcium; CCL, Chemokine (CC-motif) Ligand; CSF, Colony Stimulating Factor; CXCL, Chemokine (CXC-motif) Ligand; DTT, Dithiothreitol; EV, Extracellular Vesicle; FASP, Filter Aided Sample Preparation; FBS, Fetal Bovine Serum; FDR, False Discovery Rate; HCD, Higher energy Collisional Dissociation; IL, interleukin; KD, Knock-Down; KO, Knock-Out; LC, Liquid Chromatography; LFQ, Label Free Quantification; LPS, Lipopolysaccharide; MMP, Matrix Metalloproteinase; MS, Mass Spectrometry; NaOH, Sodium Hydroxide; NO, Nitric Oxide; NT, Non-Target; PBS, Phosphate Buffer Saline; PC, Proprotein Convertase; SEM, Standard Error of the Mean; STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription; TFA, Trifluoroacetic Acid; TLR, Toll Like Receptor; TNF, Tumor Necrosis Factor.

However, achieving an activation of TAM via the LPS/TLR4/Myd88-dependent pathway appears yet unfeasible in cancer patients. On the contrary, the sterile ligand Paclitaxel is also known to activate the TLR4 MyD88-dependent signaling pathway mimicking LPS action (14, 15). It has been widely used for the treatment of breast, ovarian, lung, and colon cancers (16). Paclitaxel is an antineoplastic agent that stabilizes microtubules against depolymerization and blocks cells at the G2/M junction of the cell cycle. Although treatment with Paclitaxel has led to improvement in the duration and quality of life for some cancer patients, most Paclitaxel-treated patients eventually develop drug resistance leading to disease progression (17). In addition to its cytostatic and cytotoxic effects, Paclitaxel has immunomodulatory properties that may partly interfere with its antitumoral effects (18). Paclitaxel stimulates tumor cells to secrete different chemoattractant factors such as macrophage colony-stimulating factor 1 (M-CSF) that promote immune evasion. Interestingly, our previous results showed that PC1/3 inhibition in macrophages strongly impacted cytoskeleton organization (13). Therefore, because of the key roles of Paclitaxel in microtubule stabilization and tumor resistance, we aimed to study the impact of Paclitaxel on our PC1/3-KD macrophage cell model (Fig. 1A).

We report here that such a treatment of PC1/3 KD macrophages drove to the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines. In addition, proteomics analysis of whole cell extracts indicated that these macrophages display overexpression of proteins mainly involved in cytoskeleton rearrangement. In support of this finding, we found that these cells exhibited a Ca<sup>2+</sup> increase after Paclitaxel treatment. This is indicative of a possible depolymerization of microtubules and this may therefore act on the activation of inflammatory pathways in macrophages. In such a way, we found that PC1/3 KD macrophages displayed a repression of the anti-inflammatory pathway STAT3. We also isolated extracellular vesicles from these PC1/3 KD cells and showed that their content inhibited glioma growth. Finally, analysis of the cell supernatant collected from the coculture between glioma cells and PC1/3 KD macrophages led to a more important release of antitumoral factors.

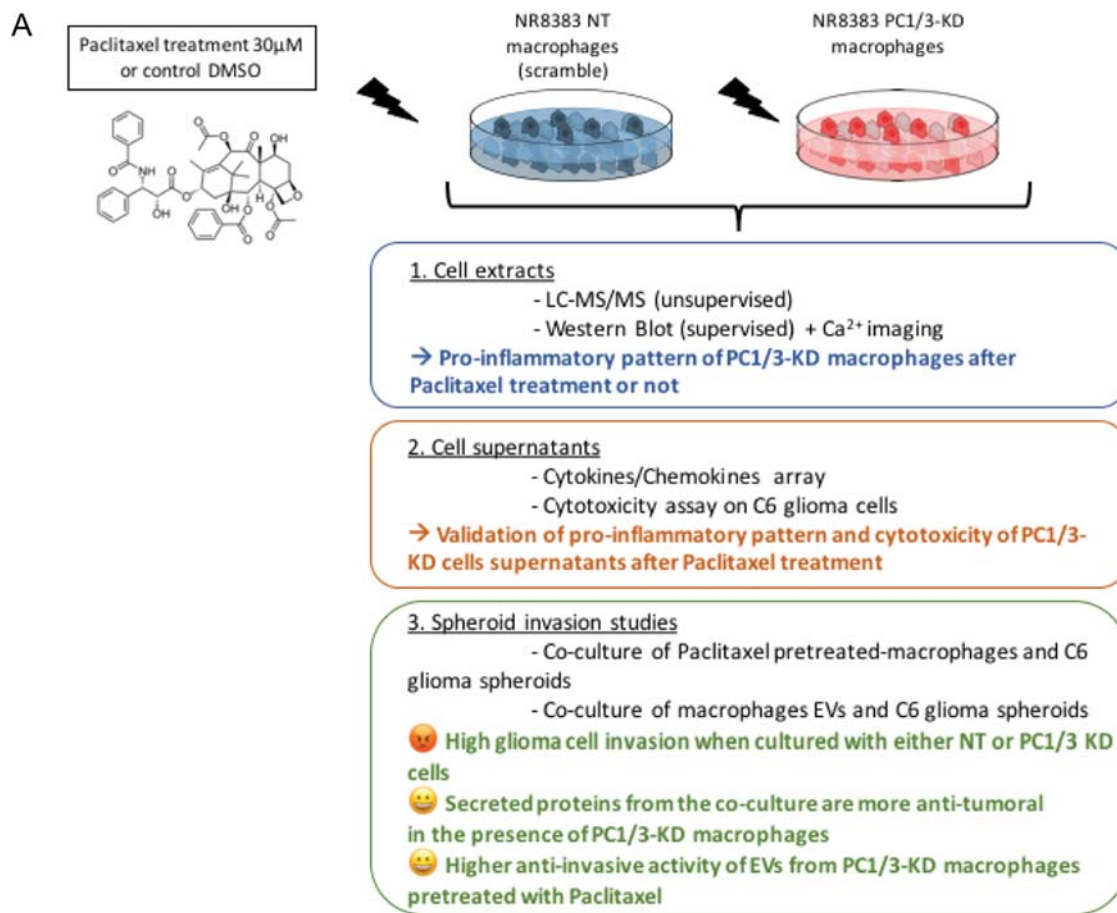
This work will contribute to our understanding on microtubule network dynamics in PC1/3-KD macrophages and Paclitaxel impact on PC1/3-KD cells in term of intracellular signaling, trafficking, and proteins profiles and antitumor activities through EVs production.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Experimental Design and Statistical Rationale*—Shotgun proteomics experiments on PC1/3 knockdown (KD) and nontarget (NT) cells treated with Paclitaxel were conducted in biological triplicate. Spheroids studies, viability tests, Western blotting analyses, calcium imaging experiments were also conducted in biological triplicate.

*Statistical Analysis*—For the proteomics statistical analysis of extracted proteins or secreted media, only proteins presenting as sig-

# Paclitaxel Treatment of PC1/3-KD Macrophages for Glioma Therapy



**B**

<b>Number of identified proteins</b> Differential proteins (p-value < 0.05) Unique proteins	<b>(Suppl.data1)</b> (Heatmap Figure 1)	<b>Cell supernatants 24h stimulation</b> <b>744</b>
	NT Paclitaxel	62
	KD Paclitaxel	65
<b>Number of identified proteins</b> Differential proteins (p-value < 0.05)	<b>(Suppl.data2)</b> (Heatmap Figure 2)	<b>Cell extracts 24h stimulation</b> <b>3745</b>
		272
<b>Number of identified proteins</b> Differential proteins (p-value < 0.05) Unique proteins	<b>(Suppl.data4)</b> (Heatmap Figure 6)	<b>Cell supernatants after 6 days co-culture</b> <b>384</b>
	NT Paclitaxel	2
	KD Paclitaxel	10
	NT Paclitaxel	5
	KD Paclitaxel	23
		8

**FIG. 1. Experimental strategy.** A, Graphical abstract resuming the conducted experiments in this study and the main results for each part. B, Table showing the number of identified proteins in (i) the supernatants of PC1/3-KD and NT macrophages stimulated during 24 h with Paclitaxel (suppl. Data 1), (ii) in the cell extracts after 24 h stimulation with Paclitaxel (suppl. Data 2) and (iii) in the supernatants of the coculture between C6 glioma spheroids and macrophages (supplemental Data S4). The number of differential proteins ( $p < 0.05$ ) and unique proteins is also indicated.

nificant by the ANOVA test were used with FDR 5%. Normalization was achieved using a Z-score with a matrix access by rows. Obtained data from Western blotting were reported as mean  $\pm$  S.E. Mean values among different experimental groups were statistically compared by one-way ANOVA tests using Graph pad PRISM software or

by student *t* test. When we compared NT control cells versus NT treated cells and between the various time points, the tests were performed on a parametric basis because the variance in the group is equal and  $n > 2$ . KD group was analyzed in the same way. By contrast, the variance between NT and KD cells is not equal. There-

fore, we compared these two groups on a non-parametric basis *i.e.* test U Mann-Withney.

Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant ( $p$  value of  $< 0.05$ ,  $**p$  value of  $< 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ). All experiments were performed as 3 independent biological assays (interassays).

**Reagents**—The rat alveolar macrophage NR8383 cell line (CRL-2192) was obtained from ATCC (USA). The rat C6 glioma cell line was kindly provided by Prof. Dr. Bernd Kaina (Institute of Toxicology, University Medical Center, Mainz, Germany). Paclitaxel was obtained from Sigma (Lyon, France) ( $C_{47}H_{51}NO_{14}$ , MW = 853.91). The level of endotoxins of Paclitaxel solution is less than 0.1EU/ml. Antibodies against phospho-STAT3 and STAT3 were obtained from CellSignaling Technology (Leiden, The Netherlands). Antibodies against ANP32A and Factor IX were obtained from Abcam. Ham's F12K, puromycin, phosphate buffer saline (PBS), fetal bovine serum (FBS) were obtained from Invitrogen Life Technologies (Milan, Italy). LysC/Trypsin was obtained from Promega (Madison, WI). Peroxydase-conjugated secondary antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). Rat Cytokine Array Panel A was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). The CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation reagent assay was purchased from Promega (Southampton, UK).

**Cell Culture**—NR8383 PC1/3 KD and NR8383 NT shRNA cell lines were cultured in Ham's F12K medium supplemented with 15% fetal bovine serum and 12  $\mu$ g/ml puromycin at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>). NR8383 PC1/3 knockdown was performed using lentivirus transduction, as described previously (12). C6 cells were cultured in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% L-glutamine (2 mM) and 1% gentamicin (50 units per ml), all from Sigma-Aldrich. This medium is referred to as complete DMEM (cDMEM). The FBS concentration was reduced to 5% in medium used for the coculture experiments (c-DMEM-5).

**Identification of Cytokines and Chemokines Using Rat Cytokine Antibody Arrays**—NR8383 KD and NT cells were plated on sterile 6-well plates to reach confluence. The cells were starved overnight with Ham's F12K medium supplemented with 2% FBS and stimulated for 24 h with 20 ng/ml IL-10 in serum-free medium or were left untreated. Then, the medium was replaced, and the cells were stimulated for 24 h with 30  $\mu$ M Paclitaxel or were left untreated. Cell supernatants were collected, centrifuged at 500  $\times$  g, passed through a 0.22  $\mu$ m filter to remove cells and immediately frozen in liquid nitrogen. The Rat Cytokine Array Panel A from the R&D system was used to probe cytokines in the cell supernatant of stimulated and unstimulated NR8383 cells by following the procedures recommended by the manufacturer. Briefly, the array membranes were first incubated in the blocking buffer for 1 h. In the meantime, cell supernatants were mixed with the Detection Antibody Mixture and incubated for 1 h at room temperature. The volume of cell supernatant used for this experiment was determined according to the number of cells counted after stimulation. Then, after removing the blocking buffer, the sample/antibody mixture was added to array membranes and incubated overnight at 4 °C. After incubation, the membranes were washed 3 times with the wash buffer and then incubated with the Streptavidin-HRP solution for 30 min at room temperature. The membranes were finally washed with wash buffer 3 times, and the bound antibodies were detected by chemoluminescence using the Chemi Reagent Mix. The membranes were quantified by densitometry using ImageJ software. Statistical analysis was carried out using a paired *t* test.

**Total Protein Extractions**—NR8383 KD and NT cells were plated on sterile 6-well plates to reach confluence. For Paclitaxel stimulation, the cells were starved overnight with Ham's F12K medium supplemented with 2% FBS. The cells were stimulated with 30  $\mu$ M Paclitaxel

in serum-free medium or left untreated. After stimulation (24 h for FASP analysis, 1 h and 3 h for Western blot analysis), cells were collected, washed once with ice-cold PBS and then lysed with RIPA buffer for total protein extraction (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1% NP40, 1 mM PMSF, and 1 $\times$  proteases inhibitors). Cells debris were removed by centrifugation (20,000  $\times$  g, 10 min, 4 °C), and supernatants were collected, and protein concentrations were measured using a Bio-Rad Protein Assay according to the manufacturer's instructions.

**Western Blot Analysis**—Total cell NT or PC1/3-KD cells extracts (40  $\mu$ g) were then analyzed by Western blotting assays. First, proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis and then transferred onto a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in TBS-Tween 0.1% + milk 5% and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies directed against rabbit antiphospho STAT3 (1:2000, from Cell Signaling), rabbit anti-STAT3 (1:1000, from Cell Signaling), rabbit anti-Factor IX (1:500, from Abcam) and rabbit anti-ANP32A (1:500, from Abcam). Horseradish peroxidase-coupled goat anti-mouse and goat anti-rabbit secondaries (Jackson ImmunoResearch) were used at 1:30,000 and 1:20,000 respectively. The proteins were visualized with the enhanced chemiluminescence kit (West Dura from Pierce) according to the manufacturer's instructions. ImageJ software was used to quantify the bands. Experiments were done in triplicate ( $n = 3$ ).

**Filter-aided Sample Preparation (FASP)**—Total protein extract (0.1 mg) was used for FASP analysis as described previously. We performed FASP using Microcon devices YM-30 (Millipore, Burlington, MA) before adding trypsin (Promega) for protein digestion (40  $\mu$ g/ml in 0.05 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). The samples were incubated overnight at 37 °C. The digests were collected by centrifugation, and the filter device was rinsed with 50  $\mu$ l of NaCl 0.5 M. Next, 5%TFA was added to the digests, and the peptides were desalted with a Millipore ZipTip device before LC-MS/MS analysis (13). The solution was then dried using the SpeedVac. Dried samples were solubilized in water/0.1% formic acid before LC MS/MS analysis. Experiments were done in triplicate ( $n = 3$ ).

**Proteomics Analysis of the Cell Supernatants**—Cell supernatants obtained from macrophages treated or not with Paclitaxel during 24 h or from the coculture of C6 spheroids and macrophages (after 6 days) were centrifuged at 500  $\times$  g and passed through a 0.22- $\mu$ m filter to remove cells and debris. The experiments were performed in biological triplicates. Four hundred microliters of the cell supernatant were collected for each condition. The volume was reduced to 100  $\mu$ l in a SpeedVac. Cell supernatant digestion was performed as previously described (19). In brief, the cell supernatants were denatured with 2 M urea in 10 mM HEPES, pH 8.0 by sonication on ice. The proteins were reduced with 10 mM DTT for 40 min followed by alkylation with 55 mM iodoacetamide for 40 min in the dark. The iodoacetamide was quenched with 100 mM thiourea. The proteins were digested with 1  $\mu$ g LysC/Trypsin mixture (Promega) overnight at 37 °C. The digestion was stopped with 0.5% TFA. The peptides were desalted with a Millipore ZipTip device in a final volume of 20  $\mu$ l of 80% ACN elution solution. The solution was then dried using the SpeedVac. Dried samples were solubilized in water/0.1% formic acid before LC MS/MS analysis. Experiments were done in triplicate ( $n = 3$ ).

**LC MS/MS Analysis**—Samples were separated by online reversed-phase chromatography using a Thermo Scientific Proxeon Easy-nLC system equipped with a Proxeon trap column (100  $\mu$ m ID  $\times$  2 cm, Thermo Scientific, Waltham, MA) and a C18 packed-tip column (75  $\mu$ m ID  $\times$  50 cm, Thermo Scientific). Peptides were separated using an increasing amount of acetonitrile (5–35% for 100 min) at a flow rate of 300 nL/min. The LC eluent was electrosprayed directly from the analytical column, and a voltage of 1.7 kV was applied via the liquid



junction of the nanospray source. The chromatography system was coupled with a Thermo Scientific Q Exactive mass spectrometer programmed to acquire a data dependent Top 10 method. Survey scans were acquired at a resolution of 70,000 at  $m/z$  400.

**Data Analyses**—All the MS data were processed with MaxQuant (20) (version 1.5.1.2) using the Andromeda (21) search engine. Proteins were identified by searching MS and MS/MS data against Decoy version of the complete proteome for *Rattus norvegicus* of the UniProt database (22) (Release June 2014, 33,675 entries) combined with 262 commonly detected contaminants. Trypsin specificity was used for the digestion mode with N-terminal acetylation and methionine oxidation selected as the variable. Carbamidomethylation of cysteines was set as a fixed modification, and we allowed up to two missed cleavages. For MS spectra, an initial mass accuracy of 6 ppm was selected, and the MS/MS tolerance was set to 20 ppm for HCD data. For identification, the FDR at the peptide spectrum matches (PSMs) and protein level was set to 0.01. Relative, label-free quantification of proteins was performed using the MaxLFQ algorithm (23) integrated into MaxQuant with the default parameters. Analysis of the proteins identified was performed using Perseus software (<http://www.perseus-framework.org/>) (version 1.5.0.31). The file containing the information from identification was used with hits to the reverse database, and proteins only identified with modified peptides and potential contaminants were removed. Then, the LFQ intensity was logarithmized ( $\log_2[x]$ ). Categorical annotation of rows was used to define different groups depending on the following: 1) the cell line (NT or KD), 2) the treatment (Control/Paclitaxel). Multiple-samples tests were performed using an ANOVA test with a FDR of 5% and preserved grouping in randomization. To determine enrichment of categorical annotations (Gene Ontology terms and KEGG pathway), a Fisher's exact test was used, taking in account the results of the ANOVA test for each group. Normalization was achieved using a Z-score with matrix access by rows. Only proteins presenting as significant by the ANOVA tests were used for statistical analysis. A hierarchical clustering was first performed using the Euclidean parameter for distance calculation and an average option for linkage in row and column trees using a maximum of 300 clusters. To quantify fold changes of proteins across samples, we used MaxLFQ. To visualize these fold changes in the context of individual protein abundances in the proteome, we projected them onto the summed peptide intensities normalized by the number of theoretically observable peptides. Functional annotation and characterization of identified proteins were obtained using PANTHER software (version 9.0, <http://www.pantherdb.org>) and STRING (version 9.1, <http://string-db.org>). The GeneMANIA Cytoscape plugin (24) was used to generate 2 distinct coexpression networks from cell extract proteomics data: (1) a << Paclitaxel-treated NT cells >> network composed of 99,556 recognized interactions, generated from the analysis of a data subset gathering control NT cells and Paclitaxel-treated NT cells and (2) a << Paclitaxel-treated KD cells >> network composed of 86,780 recognized interactions, generated from the analysis of a data subset gathering control KD cells and Paclitaxel-treated KD cells. A supervised clustering was then performed to identify the top 100 molecules that coregulated with the following query molecules: Tuba1c/Tuba4a. The list of 100 genes that encoded molecules was identified and was then assessed for gene set enrichment using EnrichR and the GO classification. Finally, subnetworks of genes presenting significant enrichments for specific GO terms were selected and visualized on Cytoscape. For presentation purposes, nodes were assigned equal weights and subnetworks were slightly distorted to avoid node superimposition. Fig. 1B resumed the number of intracellular and secreted proteins in the different experiments we conducted. We also indicated the number of differential proteins between conditions ( $p < 0.05$ ) and unique proteins.

**Cell Proliferation Measured by MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] Assay**—C6 cells were seeded into 96-well white plates at 70% confluence with NR8383 cell supernatants obtained after 24 h of Paclitaxel (30  $\mu\text{M}$ ) stimulation or no stimulation. The assay was conducted for 24, 48, 72 or 96 h. For the time point "96h+medium", conditioned mediums were removed at 72 h and replaced with fresh ones. Cell-Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation reagent (Promega) was added to the wells and incubated at 37 °C for 1 h protected from light. The absorbance was recorded at 490 nm using a 96-well plate reader. The results are expressed as absorbance values. Experiments were performed as four independent experiments.

**Spheroid Generation and Embedding in a Collagen Matrix**—C6 rat glioma cells were resuspended in cDMEM at the final concentration of 12,500 cells in 200  $\mu\text{l}$ . Cells (200  $\mu\text{l}$  per well) were distributed in flat 96-well low attachment surface plates (Corning®). Plates were incubated at standard culture conditions for 96 h. The newly formed C6 cell spheroids were then implanted in the center of each well of a 24-well plate coated with a 2.2 mg/ml collagen mixture (one spheroid per well in 400  $\mu\text{l}$  of collagen mixture per well). The collagen mixture was prepared by mixing 2 ml of PureCol® bovine collagen type I solution (3 mg/ml; Advanced BioMatrix) with 250  $\mu\text{l}$  of 10X minimal essential medium (MEM) (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA) and 500  $\mu\text{l}$  of sodium hydroxide 0.1 M. After cell spheroid embedding, the plate was incubated for 30 min at standard culture conditions to solidify the gels. Thereafter 400  $\mu\text{l}$  of cDMEM was overlaid on the collagen matrix in each well. The complete system was incubated for a total of 6 days.

**Coculture of Paclitaxel Pretreated Macrophages and C6 Spheroids**—For coculture experiments, 800,000 NT or PC1/3 KD macrophages were seeded in a T25 flask and treated for 24 h with 30  $\mu\text{M}$  Paclitaxel in cDMEM medium with 12  $\mu\text{g/ml}$  puromycin or with the corresponding volume of DMSO (control, untreated macrophages). The cell supernatants were collected (cell supernatants 24 h for proteomics analysis), the cells harvested, washed in PBS, resuspended in MEM 10 $\times$  and mixed with components of the collagen mixture as described above. The collagen mixture containing macrophages was distributed in 24-well plates (400  $\mu\text{l}/100,000$  macrophages per well) for embedding of C6 spheroids as described above. Supernatants of all conditions were collected at the end of the coculture, immediately frozen and stored at  $-80$  °C for further proteome analysis (cell supernatant day 6). Experiments were done as four independent experiments ( $n = 4$ ).

**Coculture of Extracellular Vesicles of NR8383 Cell Line with C6 Spheroids**—NT and PC1/3 KD macrophages were treated or not with 30  $\mu\text{M}$  Paclitaxel for 24h. Medium was collected and EVs isolated. Differential steps of centrifugation and ultracentrifugation to pellet extracellular vesicles (EVs) were performed. Membranes and debris were discarded from the cleared medium by centrifugation for 30 min at  $2000 \times g$  at 4 °C. The supernatant was centrifuged once at  $10,000 \times g$  for 30 min, 4 °C and once ultracentrifuged at  $100,000 \times g$  (Beckman Optima TLX Ultracentrifuge) for 70 min, 4 °C. The pellet was washed in 5 ml of phosphate buffered saline (PBS) and reultracentrifuged at  $100,000 \times g$  for 120 min, 4 °C. The EVs pellet were resuspended in MEM 10X, filtrated with 0.20  $\mu\text{M}$  filter and analyzed with a Nanosight NS300 instrument (Malvern, UK) to assess the quality of EVs purification and to determine the amount of exosomes in each condition. An equal amount of EVs were added to the collagen mixture as described above. The collagen mixture containing EVs was distributed in 24-well plates for embedding of C6 spheroids as described above ( $n = 3$ ).

**Quantification of Spheroid Size and Invaded Area**—After the spheroids were embedded, cell invasion out of the spheroid was monitored by digital photography using a Leica DM IL LED Fluo inverted light microscope (Leica DFC450C camera) at room temperature, with the

Leica Application Suite (LAS V4.4). Images were acquired every day (day 0 = time of embedding in collagen; picture taken immediately after embedding) using a 4×/0.10 objective. Image processing and quantification of spheroids and of invasion areas was performed using an in-house software. This in-house software considers cell density and not the (observer-dependent) limits of cell migration in the collagen matrix. The implemented algorithm uses local fluctuations of the image intensity for an automated estimation of the invasion magnitude. It is robust enough to handle micrographs of different generation methods and various qualities without the concept of an invasive front of the spheroids (25). Invasion and spheroid areas are normalized for each day to the invasion and spheroid areas measured at day 0 and expressed in protocol defined units (PDU). These normalized data are reported as relative size to day zero. Relative size of day 0 thus equals 1.

**Calcium Imaging**—NT and PC1/3-KD cells were plated onto glass coverslips and were loaded with 4  $\mu\text{M}$  Fura-2 AM at room temperature for 45 min in the growth medium. Recordings were performed in HBSS containing 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_3$ , 0.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mM glucose and 10 mM HEPES adjusted to pH 7.4 with NaOH. The cells were then washed three times in HBSS. Paclitaxel (30  $\mu\text{M}$ ) was added at the time of analysis. The fluorescent intensity of Fura-2 in each cell was monitored and recorded at 340 nm and 380 nm. To represent the variation in the intracellular free calcium concentration, the fluorescence intensity ratio represented by F340/F380 was used as an indicator of changes in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. Experiments were done in triplicate ( $n = 3$ ).

## RESULTS

**Paclitaxel Induces Secretion of Proinflammatory Cytokines by PC1/3 KD Cells**—To deepen our understanding on the intracellular impact of Paclitaxel treatment on NT and PC1/3 KD macrophages, we performed a complete proteome analyses of cell supernatants and intracellular proteins.

First, we analyzed the protein over or under-secreted by macrophages stimulated during 24 h with 30  $\mu\text{M}$  Paclitaxel (Fig. 2A, supplemental Data S1). Paclitaxel treatment induced a modulation of the amount of proteins released by both cells compared with control condition (Fig. 2A). Cluster 1 corresponded to proteins over-expressed by untreated macrophages, irrespective of PC1/3 expression. In that case, 9 proteins were identified. Most of them were related to immune response and pro-tumoral activities: Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (Irf30), granulins isoform a precursor (Grn), Lysozyme C-1 precursor (Lyz2), Macrophage metalloelastase (MMP12), Beta-2-microglobulin (B2m), Interleukin-1 receptor antagonist protein (Il1rn), proteoglycan 4 precursor (Pgr4), cathepsin D (Ctsd). We also detected the presence of Amyloid beta A4 protein N-APP Soluble, linked to tumor infiltration of macrophages. Fifty-nine proteins were identified in cluster 2 corresponding the proteins over-secreted by macrophages stimulated during 24h with Paclitaxel. The STRING analysis indicated a central huge network focused on ribonucleoproteins and translation (supplemental Fig. 1). It is known that patients treated with Paclitaxel can eventually develop drug resistance leading to disease progression (17). Of note, under Paclitaxel treatment of macro-

phages we found proteins that are known to protect the tumor: Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (Arhgdia), Stress-induced-phosphoprotein 1 (Stip1), the Heat shock proteins (HSP 90-alpha and HSP-90 beta).

In a next step, we focused on unique proteins secreted by NT and PC1/3 KD cells (Fig. 2B). We found that 25 unique proteins were detected in the supernatant of PC1/3 KD cells whereas 65 proteins were identified for NT cells (Table I). For the unique proteins identified in the supernatant of PC1/3 KD cells after 24h of Paclitaxel activation, STRING analysis indicated a single network involving ribosomal and ubiquitin proteins (RPS14, RPS16, RPS35, Eif4e, Pppr21a, Dynlrb1) (Fig. 2Ba). Again, several tumor growth factors were detected: apoptotic inhibitory 5 (Api5), angiopoietin-related protein 3 precursor (ANGPLT3), Dystroglycan precursor (Dag1).

For NT cells, more unique proteins were identified in their supernatant after 24h of Paclitaxel treatment (Table I). The STRING analysis (Fig. 2Bb) revealed at least 3 networks *i.e.* one related to vesicle transport centered on vesicle-fusing ATPase (NSF) protein, the second one is related to proteins involved in translation, the third one is based on ribonucleoproteins. Factors involved in tumor invasion were also detected: CD44, Nuclear migration protein nudC (NudC), tropomodulin-3 (Tmod3), arginase 1 (Arg1), Protein S100-A10 (S100-10).

From these proteomics analysis of macrophages' supernatants, we could establish that immunosuppressive and pro-tumoral factors were released by both cell types, even after Paclitaxel treatment. This observation may explained the resistance to this chemotherapeutic drug well described in the literature (18, 26), partly because of macrophages and the factors they released as we demonstrated here. However, the factors identified with this experiment represent only a part of the whole supernatant of macrophages. Cytokines and chemokines are also important in the tumor environment because they may recruit cytotoxic immune cells. Therefore, to assess the inflammatory phenotypes of NT and PC1/3 KD macrophages, a cytokine array experiment was conducted (Fig. 2C). This showed that PC1/3 KD cells exhibited a more pronounced inflammatory state as depicted by the release of more pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL5, CXCL1, CXCL2 and CXCL10.

Cells were then stimulated with 30  $\mu\text{M}$  Paclitaxel for 24h (Fig. 2C). This revealed that under Paclitaxel treatment, the nature of the cytokines and chemokines was modified. Indeed, TNF- $\alpha$ , IL-6 and CXCL10 specifically released by untreated PC1/3 KD cells were no more secreted after such a treatment. On the contrary, Paclitaxel induced a more important release of CCL3 in PC1/3 KD cells compared with its control and Paclitaxel treated NT cells. Of note, secretion of CXCL3 appeared only after stimulation of PC1/3-KD cells. IL-1 $\beta$  was also detected after Paclitaxel treatment of both cell lines but with higher levels in PC1/3 KD cells. Besides, CXCL1 release decreased in both cells sub-types but the level re-

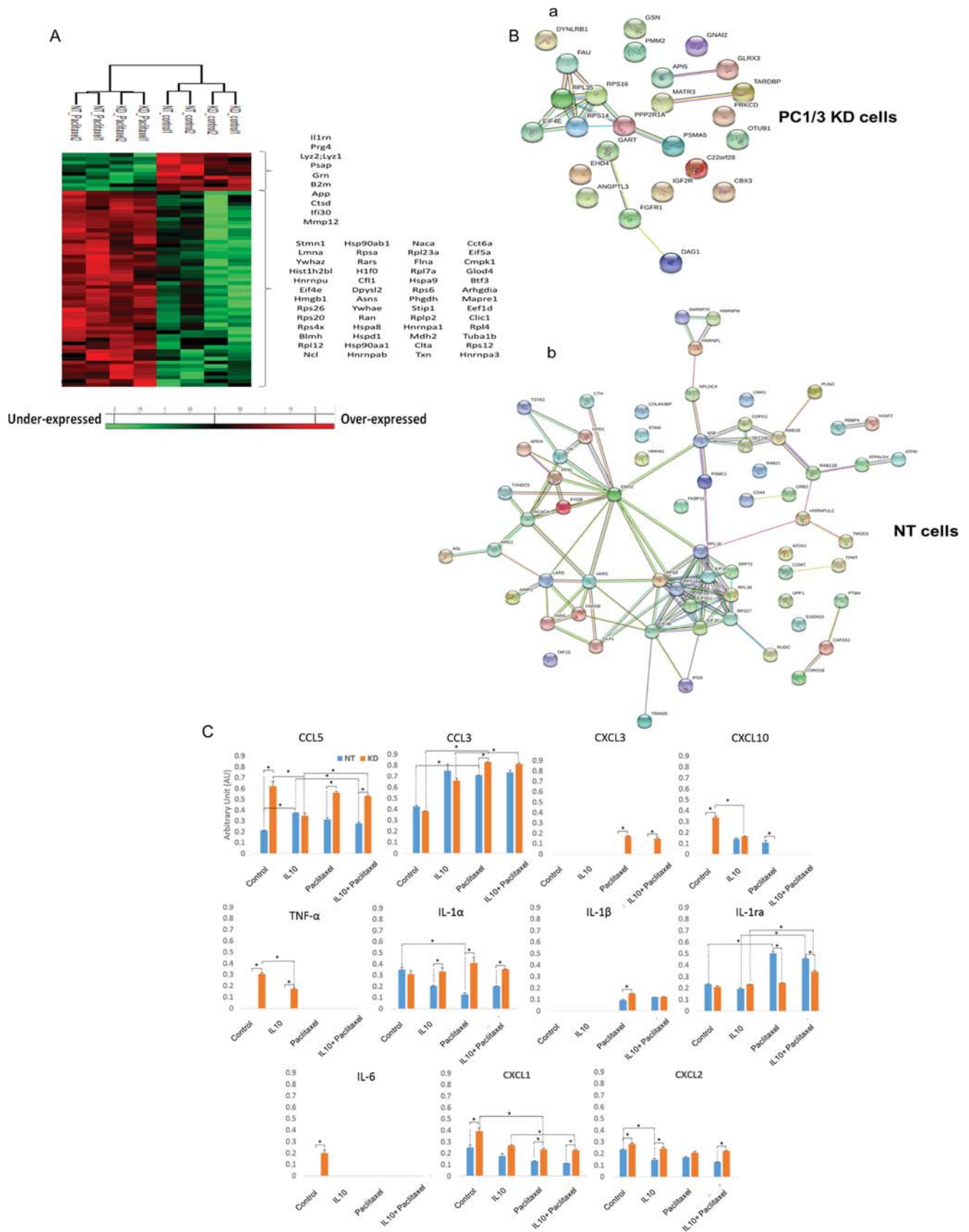




TABLE I

Unique proteins from the cell supernatants of NT and PC1/3 K<sub>D</sub> macrophages obtained after 24h treatment with Paclitaxel

Unique identified proteins			
NT cell supernatant - Paclitaxel		K <sub>D</sub> cell supernatant - Paclitaxel	
H2afz	Rbbp4	Matr3	Gart
Taf15	Eif3c	Eif4e	Tardbp
Sec24c	Cd44	Glrx3	Gnai2
Rab11b	Eif4g1	Api5	Rps14
Nudc	Txndc5	Otub1	Psmas5
Copg1	Ipo5	Pmm2	Rps16
Cth	Srp72	Rpl35	Dynlrb1
Gk	Hmha1	Prkcd	Fau
Atp6v1h	Hnrnpul2	Fgfr1	Cbx3
Tars	Col4a3bp	Dag1	Ppp2r1a
Rpl18	Rpl38	Angptl3	Gsn
Ola1	Fkbp15	Igf2r	Rtcb
Tpmt	Hnrnp1	Ehd4	
Eif3i	Nsf		
Atp6v1g1	Lima1		
Ola1	Hnrnpm		
Coro1b	Eno2		
Apeh	Arg1		
Plin3	Acaca		
Trim28	Asl		
Gpd1	Comt		
Ptma	Grb2		
Rps27l	Lars		
Rps9	Farsb		
Pfkl	Rab21		
Psmc1	Tmod3		
Nploc4	Eif3b		
Atox1	Capza1		
Vars	Snrnp70		
Aimp2	S100a10		
Upp1	Stam		
Pygb	Tsta3		
Rab1b			

mained higher in PC1/3 KD cells. In addition, IL-1 $\alpha$  dropped in NT cells whereas stayed unaffected in PC1/3 KD cells. Of note, the level of the anti-inflammatory cytokine IL-1ra increased strongly in NT cells whereas it was unchanged in PC1/3 KD cells. Altogether, this demonstrated that even if the nature of the cytokines and chemokines detected was modified in both cell lines after Paclitaxel treatment, PC1/3 KD cells continue to exhibit a higher pro-inflammatory state than NT cells. In brief, Paclitaxel induced a profile of secretion characterized by GRO ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), also known as chemokines CXCL1, CXCL2, CXCL3, and interleukin 1 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), which are pro-inflammatory and attractive factors for Polymorphonuclear leukocyte (PMN) cells and which are over-produced in

PC1/3-KD cells. In contrast, the inhibitory and anti-inflammatory factor IL-1ra was only over-produced in NT cells under Paclitaxel stimulation.

As a next step, to mimic the anti-inflammatory tumor environment, macrophages were cultured in an inhibitory medium containing the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Fig. 2C). Again, a treatment with IL-10 led to a modification of the cytokines and chemokines profiles. In such a way, we observed that IL-6 specifically detected in the supernatant of untreated PC1/3 KD cells were no more detected after IL-10 treatment. TNF- $\alpha$  level decreased in these cells but remained secreted. The levels of CCL5 and CXCL10 also diminished in PC1/3 KD cells whereas increased in NT cells to reach a similar level. Moreover, IL-10 treatment decreased the quantities of CXCL2 released by NT cells whereas no change was observed in PC1/3 KD cells. More generally, the levels of most of these secreted factors were higher in PC1/3 KD macrophages compared with NT macrophages even after a treatment with the inhibitory cytokine IL-10. When we combined IL-10 and Paclitaxel treatment, we did not observe any difference for both cell lines compared with Paclitaxel stimulation alone (Fig. 2C).

We then compared the effect of the treatment with IL-10 versus the combined stimulation with IL-10 and Paclitaxel (Fig. 2C). We again observed that CXCL10 and TNF- $\alpha$  were no more detected in PC1/3 KD cells like for Paclitaxel treatment alone. On the contrary, the combination of IL-10 and Paclitaxel triggered the increase of CCL3 in PC1/3 KD cells. Concerning IL-1ra, a higher level was observed in both cell lines but still higher in NT cells compared with PC1/3 KD cells. Then, CCL5 was more secreted only by PC1/3 KD cells. In conclusion, the inhibitory effect observed with the treatment of macrophages with IL-10 was abolished when combined with Paclitaxel.

IL-10 is highly secreted in the tumor microenvironment and is responsible for the immunosuppression observed in many tumors like glioma (27, 28). Here, we demonstrated that PC1/3 KD macrophages were more resistant to the anti-inflammatory effect of IL-10 and that Paclitaxel treatment is not really affected by this cytokine.

Altogether, these analyses revealed that under Paclitaxel treatment, NT and PC1/3 KD macrophages secreted pro-tumoral factor. Conversely and positively, PC1/3 KD macrophages released more pro-inflammatory cytokines and chemokines and were more resistant to an anti-inflammatory

FIG. 2. Paclitaxel induces secretion of pro-inflammatory cytokines by PC1/3 KD cells. NT and KD macrophages were treated with 30  $\mu$ M Paclitaxel for 24 h and supernatants were collected. Proteomics analyses of factors secreted by NT and KD cells after 24 h treatment with 30  $\mu$ M Paclitaxel or DMSO as control. A, MaxQuant and Perseus software were used for the statistical analysis, and a heat map was generated to show proteins that were significantly different between macrophages stimulated or not with Paclitaxel in the supernatants. B, String protein analyses of the unique proteins identified in PC1/3-KD (i) and NT cell supernatants (ii). C, Effect of PC1/3 downregulation on cytokine secretion under Paclitaxel and inhibitory conditions. The rat cytokine array assay was performed with NR8383 cell supernatants (NT/KD). The cells were untreated (control) or treated with IL-10 for 24 h without stimulation (IL-10) or with Paclitaxel for 24 h (IL-10+Paclitaxel). Blue shows NT cell supernatant, and orange indicates KD cell supernatant. The bar diagrams represent the ratio of the spot mean pixel densities/reference point pixel densities. Significant differences were analyzed using Student's *t* test. \**p* < 0.05.

environment. Thus, at this step, it was still unclear if the use of Paclitaxel treated PC1/3 KD macrophages could be a promising antitumoral therapy. Nevertheless, we must consider that macrophages effects against tumor cells do not only rely on secreted factors. Indeed, their immune response may also involve the activities of the cells themselves such as phagocytosis. Therefore, we performed proteomics studies of the intracellular proteins.

**Proteins Overexpressed by PC1/3 KD Cells Are Related to Macrophages Immune Functions**—For these experiments, we analyzed the intracellular proteins of NT and PC1/3 KD macrophages. We used the ANOVA test to perform a clustering of samples grouped on the basis of PC1/3 deficiency (NT versus PC1/3 KD cells) and Paclitaxel treatment (treated versus untreated cells) (Fig. 3A, [supplemental Data S2 and S3](#)). Eight specific clusters were identified. Cluster 1 corresponds to overexpressed proteins under Paclitaxel treatment in PC1/3 KD cells and cluster 3 to overexpressed proteins under Paclitaxel in both cell lines. Cluster 2 is specific for PC1/3 KD cells regardless the treatment. Cluster 6 represents proteins overexpressed in resting PC1/3 KD cells. We investigated using systems biology analysis, the interactome and network of the overexpressed proteins in PC1/3 KD cells after Paclitaxel treatment utilizing the GeoSoftware corresponding to clusters 1 and 2 (Fig. 3B). Differential pathways were generated using the “direct interaction” algorithm to map the relationships of the identified proteins. We found that among the 50 altered proteins, 35 proteins had direct regulatory relationships, including integrins (*i.e.* integrin beta 2 precursor, Protein Itgax, integrin alpha-5), cytoskeleton proteins (*i.e.* twinfilin, filamin-A, calponin 2, emerin, moesin, Alpha-actinin-4, gelsolin, lymphocyte specific 1, coronin 1c), proteasomes (*i.e.* Proteasome subunit beta type-10; Proteasome activator complex subunit 2, WD repeat-containing protein) and ionic channels (the voltage-gated potassium channel subunit beta-2 or the anoctamin-6) (Fig. 3B). Among the altered proteins identified, some of them have functions directly linked to macrophages activities like Anoctamin-6 (Ano6) that contributes to both phagocytosis (29) and macrophage migration. Some specific proteins involved in the immune response were also overexpressed in PC1/3 KD macrophages, *i.e.* galectins (1 and 3) and CD36. Galectins have been identified as modulators of many monocyte/macrophage functions (30).

To complement these unsupervised clustering bioinformatics-based analyses, we performed coexpression network enrichment study to identify molecules that- in Paclitaxel-treated NT or PC1/3 KD cells- were co-upregulated with tubulins, the primary molecular targets of Paclitaxel (31, 32) (Figs. 3Ci and 3Cii). We chose Tuba1c and Tuba4a proteins as query molecules because these 2 tubulins have shown the highest fold change among the 6 identified tubulins that were overexpressed in Paclitaxel-treated cells (*i.e.* Tubb4b, Tubb2b, Tubb6, Tuba4a, Tuba1c, and Tuba1b). We found that in both NT and PC1/3 KD cells, the Paclitaxel-induced upregulation

of Tuba1ac and Tuba4a was accompanied by the co-upregulation of a highly significant number of mitochondria-related molecules (Fig. 3Ci). This result was in line with previous studies that demonstrated that Paclitaxel targets mitochondria (33), possibly as a direct consequence of microtubule network alterations (34). Interestingly, we also observed that Tuba1ac/Tuba4a coexpression networks comprised immune-related molecules that, for some, were distinct when comparing Paclitaxel-treated NT cells versus Paclitaxel-treated PC1/3 KD cells. Anti-inflammatory molecules such as IL1rn and Arg1 were co-upregulated with Tuba1ac/Tuba4a in Paclitaxel-treated NT cells, whereas pro-inflammatory molecules Aif1, B2m, CD44, Sod1 and Calr were co-upregulated with Tuba1ac/Tuba4a in Paclitaxel-treated PC1/3 KD (Fig. 3Cii). This reveals that Paclitaxel-treated KD cells exhibit a stronger proinflammatory state than Paclitaxel-treated NT cells. This was validated by the pro-inflammatory cytokines and chemokines profile observed in Fig. 2C.

Altogether, these proteomics studies showed that a high number of proteins involved in immune response and cytoskeleton were modulated in PC1/3 KD macrophages at basal state and even more after Paclitaxel treatment. Among these cytoskeleton proteins, several were related to  $Ca^{2+}$  signaling. Therefore, our hypothesis was that  $Ca^{2+}$  signaling pathway was modulated in PC1/3 KD macrophages, leading to cytoskeleton rearrangement.

**Paclitaxel Acts as a Signalosome by Stimulating  $[Ca^{2+}]_c$** —We performed calcium imaging experiments using a fura-2AM calcium probe to evaluate the cytosolic calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ) after Paclitaxel treatment on NT and PC1/3-KD macrophages (Fig. 4). We demonstrated that Paclitaxel (30  $\mu M$ ) rapidly induced a pronounced elevation of  $[Ca^{2+}]_c$  in PC1/3 KD cells compared with NT cells (Fig. 4A). Quantification of these experiments is given in Fig. 4B. We also observed that other features of calcium homeostasis were affected in KD NR8383 cells. Indeed, Figs. 4B and 4C show that the resting  $[Ca^{2+}]_c$  levels were significantly increased in PC1/3-KD cells compared with NT cells in accordance with our previous publication (13). This indicates that Paclitaxel induced a higher increase of  $[Ca^{2+}]_c$  in PC1/3 KD cells compared with NT cells, which can act as a depolymerization agent for microtubules (35) and therefore may act on the activation of inflammatory pathways in macrophages. Interestingly, STAT3 is known to mediate an anti-inflammatory signaling through IL-10 activation (36) and tubulins association (37). Several studies have shown the effect of microtubule-targeted chemotherapeutic drug, like Paclitaxel, on the inhibition of STAT3 signaling (37). Paclitaxel-treated PC1/3 KD macrophages exhibits a more pronounced pro-inflammatory state and a cytoskeleton modification partly linked to an increase of  $[Ca^{2+}]_c$ . We, thus, thought that STAT3 activation may be impaired in these cells.

**STAT3 Activation is Decreased in Paclitaxel-treated KD Cells**—To assess signal transducer and activator of transcrip-





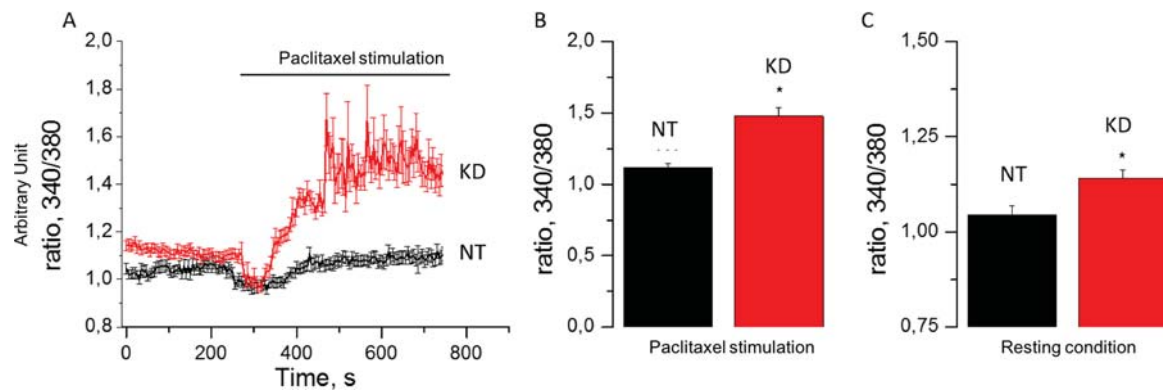


FIG. 4. Paclitaxel stimulates  $[Ca^{2+}]_c$  production in PC1/3 KD macrophages. A,  $[Ca^{2+}]_c$  rise in NT and KD NR8383 cells in response to Paclitaxel (horizontal bar). B, Quantification of Paclitaxel mediated  $[Ca^{2+}]_c$  increase for NT and KD NR8383 cells. C, Quantification of resting  $[Ca^{2+}]_c$  for NT and KD NR8383 cells in basal condition.

tion 3 (STAT3) activation, a time course of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) phosphorylation was studied (Fig. 5A and 5B). The level of the ratio of phosphorylated/total STAT3 was lower in PC1/3 KD than in NT cells at any time point and, in any condition, (Fig. 5B). Following Paclitaxel treatment, it dropped after 1 h in PC1/3-KD cells and went back to the control level at 3 h. IL-10 treatment, which is known to induce STAT3 phosphorylation, induced a similar kinetics than the one observed by Paclitaxel. Taken together, these results clearly indicate that in PC1/3 KD cells, Paclitaxel leads to the decrease of STAT3 activation as expected. Since STAT3 signaling is anti-inflammatory, this is in accordance with our proteomics and cytokine array analysis displaying the higher pro-inflammatory state of PC1/3 KD cells (Fig. 2C). As a result, STAT3 inhibition leads to a stronger activation of PC1/3 KD macrophages as depicted by the secretion of proinflammatory factors. To assess the potential of Paclitaxel-treated PC1/3 KD cells as a good antiglioma therapy, we evaluated the toxicity of their supernatants on glioma cells.

**PC1/3 KD Macrophages Cell Supernatants are Cytotoxic for Glioma Cells**—Tumor viability assay on the rat C6 glioma cell line was performed with the supernatant of macrophages treated with 30  $\mu$ M of Paclitaxel for 24 h (Fig. 6). To test the direct effect of Paclitaxel, C6 cells were also directly cultured with medium containing or not Paclitaxel (conditions F12 Control and F12 Paclitaxel). Viability tests were performed for 24 h, 48 h, 72 h and 96 h. The time point 96 h+medium means that the medium was renewed at 72 h and the viability of

cancer cells was registered 24 h later. These experiments revealed that Paclitaxel itself significantly decreased the viability of C6 glioma cells at 72 h, 96 h and 96 h+medium (Figs. 6A and 6B). On the contrary, the effects of supernatant from NT or PC1/3 KD cells treated with Paclitaxel on C6 glioma cells viability were registered as soon as 24 h and 48 h (Figs. 6A and 6B). Even though no specific differences were observed between NT cells supernatants and PC1/3 KD cells supernatants on the viability of C6 glioma cells, some interesting observations can be made. In fact, significant differences were observed between the supernatants from untreated macrophages and supernatants from Paclitaxel treated macrophages. Indeed, for NT cells these differences were observed at 48 h, 72 h, 96 h and 96 h + medium (Fig. 6A). On the contrary, for cell supernatants of PC1/3 KD cells, these differences were observed as soon as 24 h post-treatment and were observable at each time point of the assay (Fig. 6A). Compared with the situation depicted in NT cells, the supernatants from Paclitaxel treated PC1/3 KD cells not only exert a quicker antitumoral activity but also a more robust effect at 48 h and 72 h as revealed by higher significance levels (Fig. 6B). During the assay, the highest impact on C6 viability (55.08%) was also observed at 96 h, with supernatant from PC1/3 KD cells stimulated with Paclitaxel. In conclusion, these viability assays showed that in addition to the direct effect of Paclitaxel remaining in the medium and compared with NT cells, Paclitaxel treated PC1/3 KD macrophages secreted additional antitumoral factors active against glioma cells. We then decided to further explore the effect of Pacli-

macrophages stimulated or not with Paclitaxel in the cell extracts. Eight clusters are highlighted. B, Global pathway analysis of the overexpressed proteins specifically identified in PC1/3-KD cells. The relationship between the overexpressed proteins with PCSk1/3 (pink) is also showed. C, Co-expression network analyses. i) Co-expression of Tuba1c/Tuba4a with mitochondria-related molecules in Paclitaxel-treated NT versus Paclitaxel-treated KD cells. The 100 genes which encoded molecules were the most tightly coexpressed with Tuba4a/Tuba1c were identified in Paclitaxel-treated NT versus Paclitaxel-treated KD cells. Shown are subnetworks of genes annotated by the GO term "mitochondrion" (adjusted  $p$  value for enrichment significance = 0.11e-3 in Paclitaxel-treated NT cells and 0.10e-5 in Paclitaxel-treated KD cells). ii) Co-expression of tubulins with immune-related molecules in Paclitaxel-treated NT versus Paclitaxel-treated KD cells. The 100 genes which encoded molecules were the most tightly coexpressed with Tuba4a/Tuba1c were identified in Paclitaxel-treated NT versus Paclitaxel-treated KD cells. Shown are subnetworks of immune-related genes.

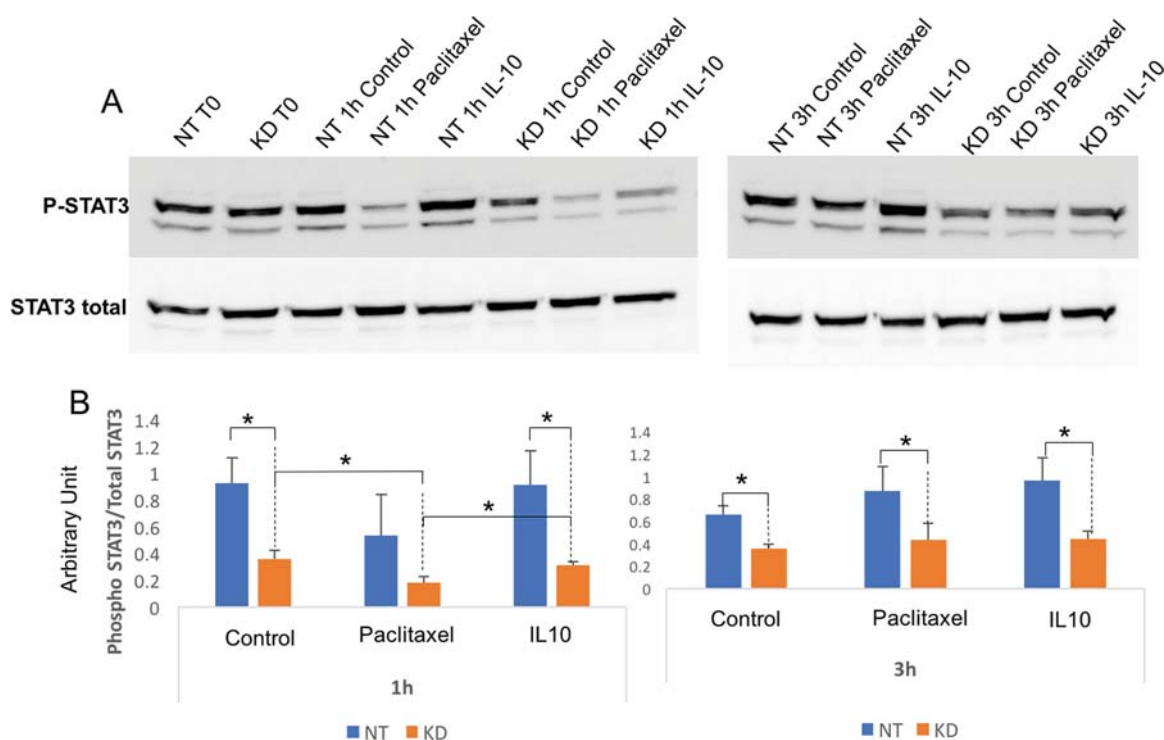


FIG. 5. Paclitaxel inhibits STAT3 signaling in PC1/3 KD macrophages. A, Western blot analysis of phospho STAT3 and total STAT3 in NT or KD PC1/3 NR8383 macrophages after Paclitaxel stimulation (30  $\mu\text{M}$ ), IL10 stimulation (20 ng/ml) or not at 1 h and 3 h. B, Results are depicted through graphic representations of the quantification of phospho STAT3. The data are represented as the ratio of phosphorylated STAT3 on total STAT3 in samples for each conditions. \* Significant differences between NT cells and PC1/3-KD cells ( $p \leq 0.05$ ) by *t* test. Experiments were performed in triplicates.

taxel activation of the macrophages using direct cocultures of pretreated macrophages and tumor cells.

**Paclitaxel Triggers the Secretion of Antiglioma Factors by PC1/3-KD Cells**—As a model for a direct coculture of macrophages and glioma cells, we chose to work with a 3D culture system. Spheroids generated with C6 glioma cells were cocultured for 6 days in a collagen matrix containing untreated or Paclitaxel-treated macrophages (NT or PC1/3-KD cells). The growth of the spheroids and the invasion of the matrix by cells migrating out the initial core were monitored over 6 days. As shown in Fig. 7Aa, neither the NT nor the KD cells present in the collagen impaired the growth and invasion of the spheroids, an observation in line with the reported tumor-supportive effects of macrophages. Addition of low concentrations of Paclitaxel (20 nM, 40 nM, 80 nM) in the culture of spheroids in absence of macrophages induced a decrease of spheroid growth which was concentration-dependent (Fig. 7Ab lower panel). This inhibitory effect was much less pronounced in the presence of macrophages in the collagen matrix and was Paclitaxel concentration-dependent as well (Fig. 7Ab, upper panels). Macrophages thus appeared to exert a protective effect to cancer cells against these low concentrations of Paclitaxel, as already highlighted in the literature (38). Addition however of 30  $\mu\text{M}$  of Paclitaxel (*i.e.* the concentration used to induce the proinflammatory supernatant) directly to the cocultures led to a complete growth and

invasion arrest of the spheroids, irrespective of the presence or absence of the macrophages (data not shown). Thus, with this system we could not distinguish the effect of Paclitaxel alone from the effects of Paclitaxel stimulation on macrophages. By contrast, when the macrophages (NT or PC1/3 KD cells) were pre-activated by 30  $\mu\text{M}$  Paclitaxel before their embedding in collagen, thus avoiding the presence of Paclitaxel during the coculture, tumor growth and invasion were inhibited (Fig. 7Ba). Quantification of the growth and invasion rate indicated that pre-activated NT and KD cells exerted a similar inhibitory effect (Fig. 7Bb).

We also analyzed the conditioned medium obtained after 6 days of coculture between C6 spheroids and Paclitaxel pre-activated NT or PC1/3-KD cells to identify the factors specifically or more secreted. The results showed differences between NT and PC1/3 KD cells (supplemental Data S4). Indeed, 10 unique proteins were identified in the supernatant of C6 spheroids cultured with Paclitaxel preactivated NT macrophages (Figs. 7Ca, Table II). Markers for tumor invasion were observed including the Complement component 1 Q subcomponent-binding protein (C1qbp), pro low-density lipoprotein receptor-related protein 1 precursor (LRP1 LDL), Ezrin (Ezr), sorcin (Sri) and GrpE protein homolog 1 (Grpel1) and Nucleoplasmin. In addition, after coculture, 2 proteins were over-represented in the supernatant of Paclitaxel-pretreated NT cells *i.e.* Mortalin (HSPA9) and SH3 domain-binding glutamic



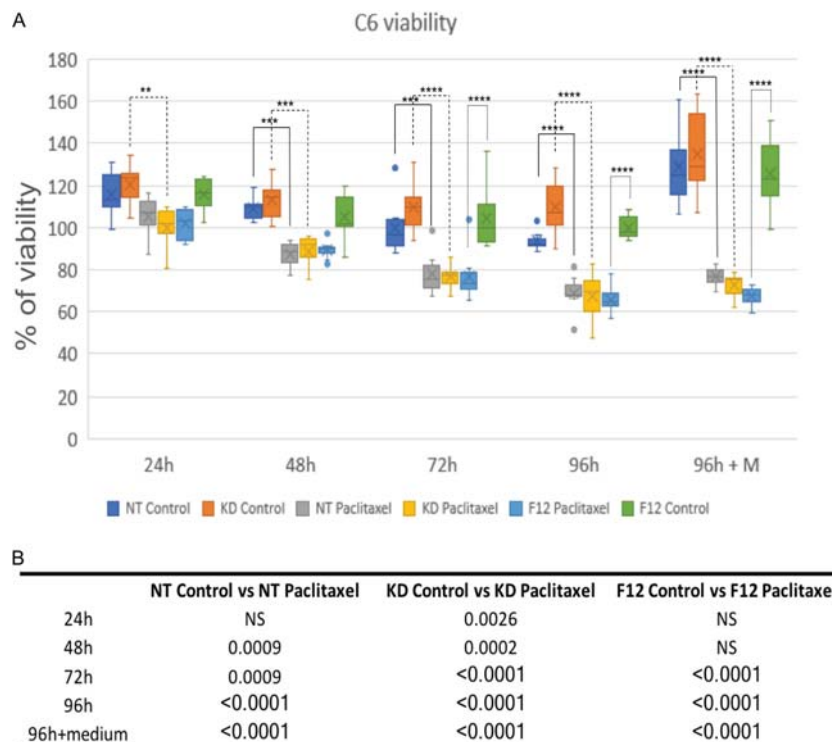


FIG. 6. **Supernatants of PC1/3 KD macrophages are cytotoxic for glioma cells.** The cell viability of C6 rat glioma was determined by the CellTiter Aqueous One Solution Cell Proliferation reagent. The cells were incubated with NR8383 cell supernatants obtained at 24 h with or without Paclitaxel treatment. The assays were conducted for 24 h, 48 h, 72 h and 96 h. For “96h + medium” condition, medium was replaced with fresh medium after 72h of culture. Four experiments were performed independently. A, The results obtained are depicted through a box plot figure. Significant differences were identified using Tukey’s multiple comparisons test with \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$ . B, Raw  $p$  values. NS, non-significant.

acid-rich-like protein 3 (Sh3bgr1) (Fig. 7Cb). These proteins are known to support cancer progression (39, 40) (Fig. 7Cb).

After 6 days of coculture between PC1/3 KD macrophages and C6 spheroids, 5 unique proteins were identified in the cell supernatant (Figs. 7Ca, Table II). Among them, a balance of factors produced by tumor cells was also observed, as indicated by the presence of Rac1 and Myl6. Rac1 is described as a major player in glioma invasion and progression (41) and myosin light polypeptide 6 (Myl6) is found in glioblastoma exosomes (42). However, the three other proteins were related to tumor suppression: (1) NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (Nqo1) known to inhibit the degradation of the tumor suppressor gene p53 and involved in the metabolism of Vitamin K (inhibitor of glioma cell growth) (43), (2) acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A (ANP32A, pp32) present in macrophages exosomes during inflammation (44) and known to inhibit pancreatic cancer cells survival (45), and (3) Coagulation factor IX (F9) known to regulate carcinoma migration (46).

Even if the effect of NT and PC1/3 KD cells on C6 glioma spheroids growth was similar (Fig. 7Ba), these results suggested that in presence of PC1/3 KD cells, a resistance to Paclitaxel treatment could be less developed. As mentioned above, some of the proteins detected are found in exosomes.

Previously, we demonstrated that formation of multivesicular bodies was strongly increased in PC1/3 KD cells (13, 47). Multivesicular bodies are a source of extracellular vesicles (EVs) (48). Therefore, we tested the effects of exosomes purified from the cell supernatants of untreated or Paclitaxel treated NT and PC1/3 KD cells on C6 spheroids growth and invasion.

*Extracellular Vesicles Released by PC1/3 KD Cells after Paclitaxel Treatment Repress More Efficiently the Growth and Invasion of C6 Spheroids*—EVs were isolated from the cell supernatants of NT and PC1/3 KD cells treated or not with 30  $\mu\text{M}$  Paclitaxel for 24h, quantified with Nanosight NS300 and added in equal amount in the collagen matrix before embedding of the C6 spheroids. Spheroid’s growth and cell invasion in the matrix were monitored over 3 days (Fig. 8a). After 24 h, addition of EVs, irrespective of their origin, had no effect on growth and invasion of C6 spheroids. It did exert however a cell- and treatment-dependent inhibitory effect at 48 h. EVs from control NT cells were slightly, though not significantly, more inhibitory than EVs from control KD cells. EVs from Paclitaxel-treated KD cells however showed a stronger inhibitory effect than EVs derived from Paclitaxel-treated NT cells. At 72 h, EVs from both cell lines, irrespective of their treatment, similarly and strongly inhibited growth and inva-

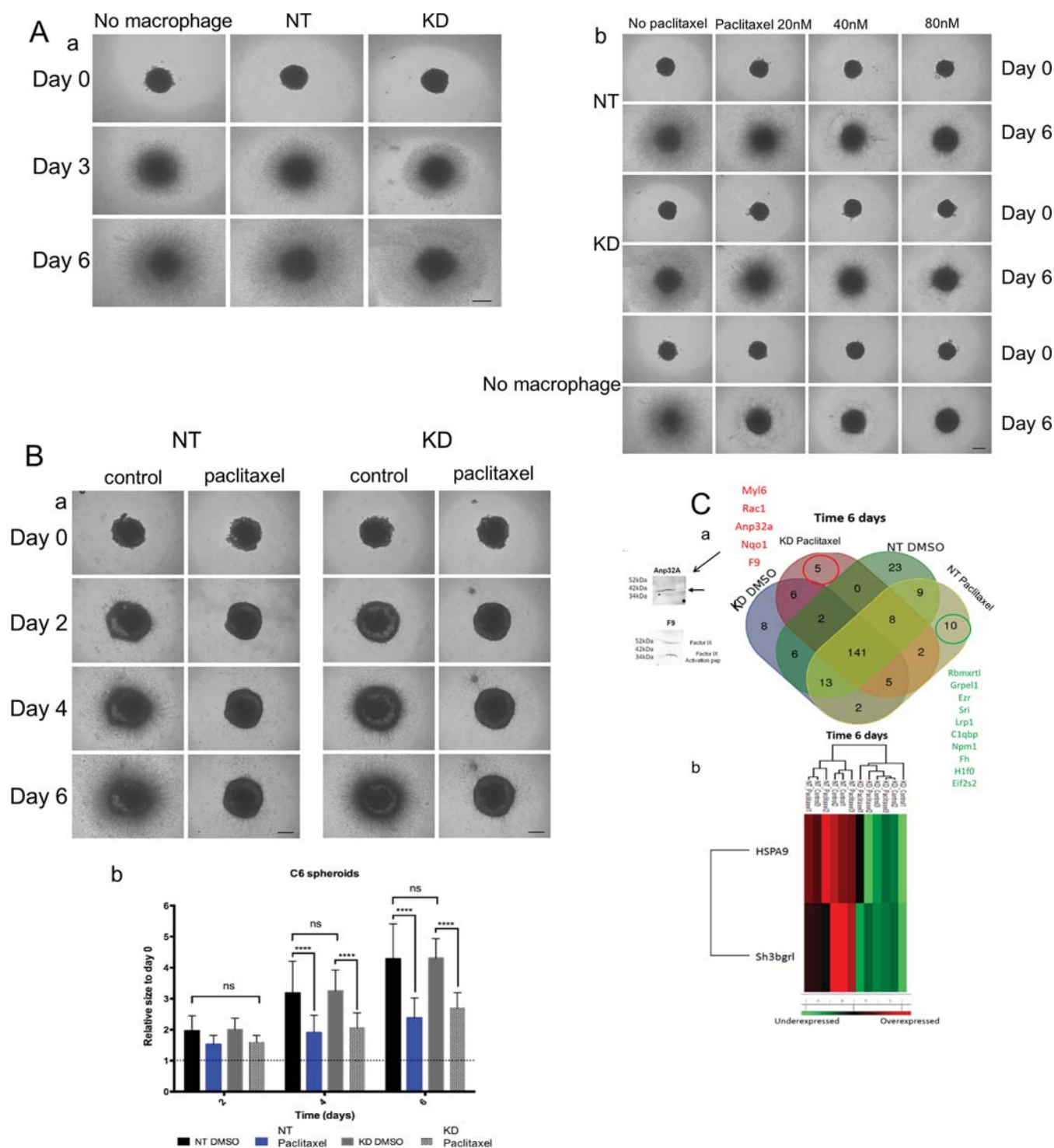


FIG. 7. Paclitaxel triggers the secretion of anti-glioma factors by PC1/3-KD cells cocultured with C6 glioma spheroids. A, Antitumor properties of NR8383 cell supernatants on glioma cells in a 3D coculture. a) Invasion of rat glioma cells (C6) spheroids in the absence (No M $\phi$ ) and in the presence of NR8383 non-target (NT) or PC1/3 knockdown (KD) macrophages. Representative images of the invasion of C6 spheroids in the collagen matrix at day 0, day 3 and day 6. All images were acquired with an inverted light microscope at 4 $\times$  magnification. Scale bar: 500  $\mu$ m. b) Invasion of rat glioma cells (C6) spheroids in the absence (No M $\phi$ ) and in the presence of NR8383 non target (NT) or PC1/3 knockdown (KD) macrophages treated or not with increasing concentrations of Paclitaxel (20 nM, 40 nM, 80 nM). Representative images of the invasion of C6 spheroids in the collagen matrix at day 0 and day 6. All images were acquired with an inverted light microscope at 4 $\times$  magnification. Scale bar: 500  $\mu$ m. B, Invasion of rat glioma cells (C6) spheroids in the presence of NR8383 NT or PC1/3 KD macrophages pretreated or not with 30  $\mu$ M Paclitaxel for 24h. a) Representative images of the invasion of C6 spheroids in the collagen matrix at day 0, day

## Paclitaxel Treatment of PC1/3-KD Macrophages for Glioma Therapy

TABLE II

Unique proteins from the cell supernatant of NT and PC1/3  $K_D$  macrophages in co-culture with C6 spheroids obtained after 6 days of invasion into the collagen matrix (Day 6). Macrophages were preactivated with Paclitaxel or not during 24 h and then embedded into collagen with C6 spheroids. The cell supernatants from the co-culture were collected after 6 days

Unique identified proteins			
NT cells Paclitaxel Time 6 days (Coculture)	NT cells Control Time 6 days (Coculture)	$K_D$ cells Paclitaxel Time 6 days (Coculture)	$K_D$ cells Control Time 6 days (Coculture)
Rbmxrt1	Stmn1	Myl6	Thbs4
Grpel1	C5	Rac1	Tgfb1
Ezr	Ak2	Anp32a	Hba1
Sri	Prdx2	Nqo1	Plod1
Lrp1	Plod2	F9	Inhba
C1qbp	Psm1		Dpysl2
Npm1	Alyref		Cand1
Fh	Atp5b		Wdr1
H1f0	Fkbp3		Eef1g
Eif2s2	Calu		Dstn
	Igf2r		
	Dbi		
	Rpl30		
	Rpl10a		
	Pgm1		
	Arhgdib		
	Fus		
	Il1r1		
	Etfb		
	Capg		
	Gm2a		
	Pabpc1		
	Atox1		

sion of C6 spheroids. Expression of the data as fold change of growth/invasion after Paclitaxel treatment does support these effects and their cell- and treatment-specificity (Fig. 8b).

### DISCUSSION

Since the last decade, many studies have demonstrated that the density of TAMs is associated with a poor prognosis, suggesting macrophages as a target for clinical therapy (49–55). Macrophages can be activated through cytokines or via secondary signals supplied by either antibodies or LPS/endotoxin/TLR stimulants. Thus, new therapeutic strategies have been elaborated to counteract tumor outgrowth by either inhibiting macrophages infiltration or by promoting a macrophages pro-inflammatory phenotype (49). Strategies targeting TLR4 pathway have shown some success in antitumoral activity (56, 57). Paclitaxel, an antitumor drug, is also known to activate the TLR4 pathway and therefore

could be a potential strategy to reactivate macrophages within tumors. This drug is currently used for the treatment of breast, ovarian, lung, and colon cancers (16). More recently different strategies based on liposomes or nanoparticles with Paclitaxel have also been investigated in glioma (58–61). Based on this knowledge, this work aimed to investigate the possibility to trigger macrophage mediated tumor cytotoxicity based on a TLR4 activation using Paclitaxel drug as ligand.

Previously, we have shown that PC1/3 KD macrophages were able to produce pro-inflammatory cytokines in autocrine and paracrine ways and were more pro-inflammatory compared with macrophages expressing PC1/3 (12, 13). We thus concluded that this PC1/3 enzyme controlled the activation of macrophages. In the present study, we also revealed by proteomics approaches differences between NT and PC1/3 KD cells after Paclitaxel stimulation (Fig. 1A). In PC1/3 KD macrophages proteins involved in microtubule cytoskeleton assembly, actin organization, cell-cell adhesion and cell matrix adhesion modifications are upregulated. The overexpression of cytoskeleton proteins is expected to impact the endosomal and phagosome movements (62, 63), which would also lead to a higher secretion of immune factors. This modulation of cytoskeleton organization is supported by the high increase of  $Ca^{2+}$  release in these cells (Fig. 4). We also confirmed the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines by untreated and Paclitaxel-treated PC1/3 KD macrophages reflective of a higher level of activation of these cells (Fig. 2 and 5). Of note, this secretory activity was not really affected by the presence of the anti-inflammatory cytokines IL-10. Among the factors released by PC1/3 KD cells after Paclitaxel stimulation, we found growth related oncogene (GRO) ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) and interleukin 1 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ). These factors are known to elicit recruitment of PMN cells. GRO ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), also known as chemokines CXCL1, CXCL2, CXCL3, mediates varied functions such as attracting neutrophils to sites of inflammation, regulating angiogenesis, and modulating neurotransmitter release. However, in cancer, they are involved in tumor initiation, progression, and metastasis (64, 65). For example, GRO- $\beta$  forms an autocrine loop that activates the Ras-Erk1/2 signaling pathway (66) which is linked to phosphorylation of STAT3 (67) signal transducer activator of transcription which is important for cell proliferation. At a first sight, this did not support that Paclitaxel treated PC1/3 KD cells may exert a stronger antitumoral activity. However, we cannot exclude that (i) combination of other molecules contained in the cell supernatant may exhibit antitumoral activity and (ii) in a coculture with

2, day 4 and day 6. b) Graph representing the quantification of C6 spheroids invasion into the collagen. C, Analysis of the supernatants after 6 days of coculture between macrophages and C6 spheroids. a) At day 6 after invasion, the cell supernatants were harvested and analyzed by mass spectrometry (Time 6 days). Venn Diagram of the all coculture conditions used (Paclitaxel, control DMSO) for PC1/3 KD and NT cells is presented. Western blots detecting antitumoral proteins (F9, Anp32a) in the supernatant of KD cells treated with Paclitaxel are also presented. b) A heat map was generated to show proteins that significantly differed between the supernatants of NT and PC1/3-KD NR8383 macrophages after 6 days of coculture.

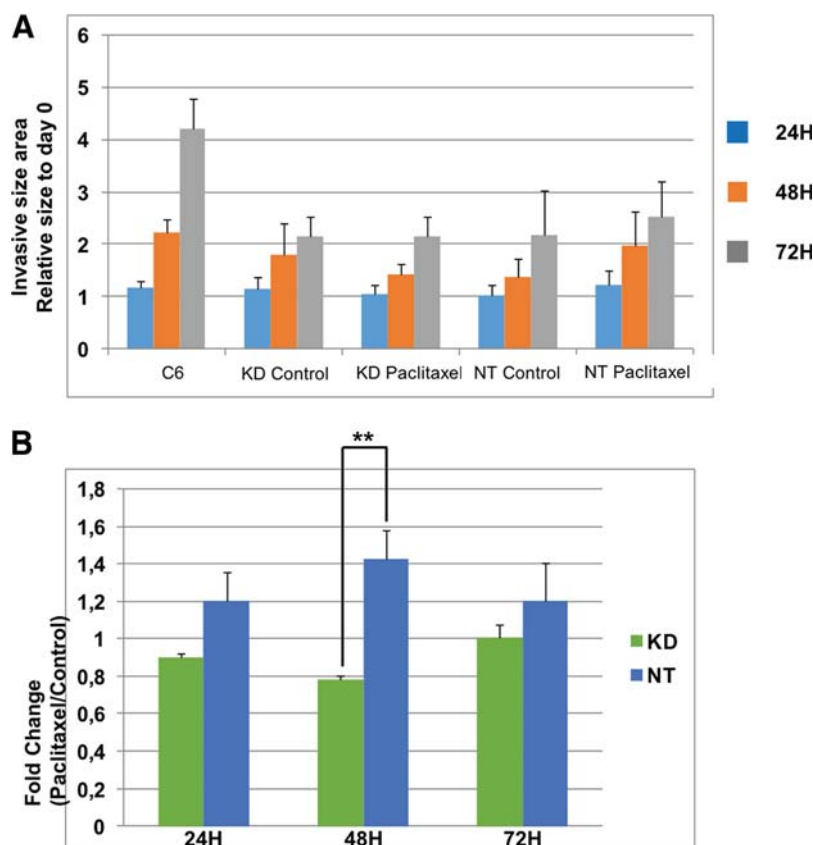


FIG. 8. EVs from PC1/3 KD macrophages supernatants repress more efficiently the growth and invasion of C6 spheroids. a) NT and KD macrophages were treated with 30  $\mu$ M Paclitaxel for 24h and secreted EVs were isolated by ultracentrifugation. An equal amount of EVs for each condition were diluted in the collagen matrix prior embedding with C6 glioma spheroids. Images of the invasion of C6 spheroids in the collagen matrix were taken every 24 h during 3 days. All images were acquired with an inverted light microscope at 5 $\times$  magnification. Images were quantified with the in-house software as described in Material and Methods. b) Graphic representation showing ratio of C6 area invasion of Paclitaxel condition over control condition at each time point. \* Significant differences between NT cells and PC1/3-KD cells ( $p \leq 0.05$ ) by *t* test.

tumor cells the nature of the factors secreted will vary. Therefore, we decided to evaluate the potential cytotoxic activity of the supernatant of NT and PC1/3 KD cells after Paclitaxel stimulation. This revealed that the supernatant of PC1/3 KD macrophages stimulated with Paclitaxel exerted an antitumor activity on C6 glioma cells (Fig. 6). Of note, we showed that the effect observed is higher than the direct effect of Paclitaxel alone. In 3D coculture experiments, untreated or treated with low doses of Paclitaxel, macrophages supported the growth and invasion of glioma cells (Fig. 7Ab), as expected from previous observations with murine microglia and human tumor-associated microglia/macrophages (68, 69). We showed that these supportive activities were suppressed by a pre-treatment of macrophages with Paclitaxel, which triggered an efficient antitumor response. Indeed, growth of spheroids and cell invasion in the matrix were severely decreased by macrophages pre-activated with Paclitaxel, irrespective of their PC1/3 content. However, in the supernatant of the coculture between C6 glioma cells and Paclitaxel pre-treated PC1/3 KD macrophages cocultures, we found that expression of tumor supportive proteins such as Mortalin or

SH3BGRL was lower. We could also identify unique proteins exhibiting antitumor properties such as Nqo1, ANP32A and Coagulation factor IX. This unique profile of secreted proteins suggests a possible scenario whereby these factors may stabilize P53, inhibit its degradation through Nqo1 and inhibit cancer cell survival and facilitate drug efficacy thanks to ANP32A production (45). It may also block the tumor migration with Coagulation factor IX in conjunction of production of immune factors (46).

We also demonstrated that several proteins identified in the supernatant of the coculture between glioma C6 spheroids and PC1/3 KD macrophages were related to exosomes. Interestingly, at 48 h, extracellular vesicles (EVs) from control NT cells had the tendency to block C6 spheroids growth and invasion (Fig. 8). Quite the opposite, EVs from Paclitaxel-treated NT cells did not exert this inhibitory effect. In this case, growth and invasion were restored to a similar level as those observed for untreated C6 cells. This suggests that EVs may contribute to the development of drug resistance observed after Paclitaxel treatment (17). On the contrary, we demonstrated that PC1/3 inhibition in macrophages abolished this



phenomenon. Indeed, EVs from Paclitaxel-treated PC1/3 KD cells showed an inhibitory effect on growth and invasion of the C6 spheroids at 48 h of coculture. This effect was however limited in time. In fact, after 72 h, EVs from both NT and KD cells were equally effective in inhibiting C6 spheroids to an extent comparable to the one observed with cocultures of macrophages and spheroids. This transient effect might reflect the capacity of glioma cells to re-program macrophages in a way that is PC1/3 independent and/or that masks the inhibitory capacity of PC1/3 KD cells-derived EVs through secreted molecules.

In conclusion of this study, we showed that Paclitaxel increased the cytosolic calcium concentration  $[Ca^{2+}]_c$ , diminishes STAT3 activation and reveals a potential of the coaction of PC1/3 inhibition and Paclitaxel treatment in macrophages for glioma therapy. The invasion assays in complement to proteomics analyses of the cell supernatants of C6 spheroids cultured with Paclitaxel pre-activated NT or PC1/3-KD cells, demonstrated that PC1/3 KD cells secrete antitumor factors active toward C6 glioma but they were not sufficient to observe an effect on their invasion in a spheroid coculture assay. In this context, because PC1/3 KD cells have constitutively a higher amount of MVBs, we thought that EVs release through Paclitaxel treatment may influence glioma spheroids growth. Indeed, we showed that EVs from Paclitaxel treated PC1/3 KD cells could escape glioma resistance to treatment. To conclude, these experimental observations lay the basis for a cell therapy based on EVs released by PC1/3 KD macrophages activated with Paclitaxel.

*Acknowledgments*—We thank the labcom o'dreams (PRISM-OCR) for its contribution to this project.

**DATA AVAILABILITY**

The data sets and the Perseus result files used for analysis were deposited at the ProteomeXchange Consortium (70) (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via the PRIDE partner repository (71) with the dataset identifier PXD004444 for cellular extracts.

\* This research was supported by grants from the Ministère de L'Éducation Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche, ANR (IF), Région Nord-Pas de Calais ARCIR (IF), the Université de Lille (MD) SIRIC ONCOLille (IF, MD), Grant INCa-DGOS-Inserm 6041aa, the CCMIC, APVV 15 0613(DC), and INSERM.

☒ This article contains [supplemental material](#).

✉ To whom correspondence should be addressed: U-1192 Inserm, Laboratoire de Protéomique, Réponse Inflammatoire, Spectrométrie de Masse (PRISM), Université de Lille 1, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve D'Ascq, France. E-mail: [marie.duhamel@univ-lille1.fr](mailto:marie.duhamel@univ-lille1.fr).

||| These authors have contributed equally to this work.

Author contributions: M.S. and M.D. have written the paper. M.D., M.R., A.N.M., F.R., M.W., M.S., D.C., I.F., F.V.A., F.K., L.Z., A.R.V., S.N., and L.P. have done the experiments. M.S. and I.F. have got financial support to the project and corrected the manuscript. All authors have reviewed the manuscript.

**REFERENCES**

- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674
- De Palma, M., and Lewis, C. E. (2011) Cancer: Macrophages limit chemotherapy. *Nature* **472**, 303–304
- K., F., and A., K. (2012) The Role of tumor-associated macrophage in tumor progression. *Frontiers in Bioscience - Scholar* **4S**, 787–798
- Taskinen, M., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Nyman, H., Eerola, L. M., and Leppä, S. (2007) A high tumor-associated macrophage content predicts favorable outcome in follicular lymphoma patients treated with rituximab and cyclophosphamide- doxorubicin-vincristine-prednisone. *Clin. Cancer Res.* **13**, 5784–5789
- Shree, T. et al. (2011) Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev.* **25**, 2465–2479
- Svensson, S. et al. (2015) CCL2 and CCL5 are novel therapeutic targets for estrogen-dependent breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 3794–3805
- D., L., E., van O., P., de B., and J.A., van G. (2014) Functional relationship between tumor-associated macrophages and macrophage colony-stimulating factor as contributors to cancer progression. *Front. Immunol.* **5**, no pagination
- Mantovani, A., and Locati, M. (2013) Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization lessons and open questions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 1478–1483
- Zhu, Y. et al. (2014) CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res.* **74**, 5057–5069
- Hung, J. Y. et al. (2014) Colony-stimulating factor 1 potentiates lung cancer bone metastasis. *Lab. Invest.* **94**, 371–381
- Refaie, S. et al. (2012) Disruption of proprotein convertase 1/3 (PC1/3) expression in mice causes innate immune defects and uncontrolled cytokine secretion. *J. Biol. Chem.* **287**, 14703–14717
- Gagnon, H. et al. (2013) Proprotein convertase 1/3 (PC1/3) in the rat alveolar macrophage cell line NR8383: localization, trafficking and effects on cytokine secretion. *PLoS ONE* **8**
- Duhamel, M. et al. (2015) Molecular consequences of proprotein convertase 1/3 (PC1/3) inhibition in macrophages for application to cancer immunotherapy: a proteomic study. *Mol. Cell. Proteomics* **14**, 2857–2877
- Kawasaki, K., Nogawa, H., and Nishijima, M. (2003) Identification of mouse MD-2 residues important for forming the cell surface TLR4-MD-2 complex recognized by anti-TLR4-MD-2 antibodies, and for conferring LPS and taxol responsiveness on mouse TLR4 by alanine-scanning mutagenesis. *J. Immunol.* **170**, 413–420
- Kawasaki, K. et al. (2001) Involvement of TLR4/MD-2 complex in species-specific lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J. Endotoxin Res.* **7**, 232–236
- Edwards, S. J., Barton, S., Thurgar, E., and Trevor, N. (2015) Topotecan, pegylated liposomal doxorubicin hydrochloride, paclitaxel, trabectedin and gemcitabine for advanced recurrent or refractory ovarian cancer: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.* **19**, 1–480
- Orr, G. A., Verdier-Pinard, P., McDavid, H., and Horwitz, S. B. (2003) Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* **22**, 7280–7295
- Javeed, A. et al. (2009) Paclitaxel and immune system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **38**, 283–290
- Meissner, F., Scheltema, R. A., Mollenkopf, H.-J., and Mann, M. (2013) Direct proteomic quantification of the secretome of activated immune cells. *Science* (80). **340**, 475–478
- Cox, J., and Mann, M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1367–1372
- Cox, J. et al. (2011) Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* **10**, 1794–1805
- UniProt Consortium. (2012) Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **40**, D71–D75
- Cox, J. et al. (2014) Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 2513–2526
- Montejo, J. et al. (2010) GeneMANIA cytoscape plugin: Fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics* **26**, 2927–2928



25. Cisneros Castillo, L. R., Oancea, A.-D., Stüllein, C., and Régnier-Vigouroux, A. (2016) A Novel Computer-Assisted Approach to evaluate Multicellular Tumor Spheroid Invasion Assay. *Sci. Rep.* **6**, 35099
26. DeNardo, D. G. *et al.* (2011) Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* **1**, 54–67
27. Huettner, C., Czub, S., Kerkau, S., Roggendorf, W., and Tonn, J. C. (1997) Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro. *Anticancer Res.* **17**, 3217–3224
28. Huettner, C., Paulus, W., and Roggendorf, W. (1995) Messenger RNA expression of the immunosuppressive cytokine IL-10 in human gliomas. *Am. J. Pathol.* **146**, 317–322
29. Ousingsawat, J. *et al.* (2015) Anoctamin 6 mediates effects essential for innate immunity downstream of P2X7 receptors in macrophages. *Nat. Commun.* **6**, 6245
30. Dhirapong, A., Lleo, A., Leung, P., Gershwin, M. E., and Liu, F. T. (2009) The immunological potential of galectin-1 and -3. *Autoimmunity Reviews* **8**, 360–363
31. Schiff, P. B., and Horwitz, S. B. (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 1561–1565
32. Schiff, P. B., Fant, J., and Horwitz, S. B. (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**, 665–667
33. Patel, N. *et al.* (2010) Rescue of paclitaxel sensitivity by repression of Prohibitin1 in drug-resistant cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 2503–2508
34. Shprung, T., and Gozes, I. (2009) A novel method for analyzing mitochondrial movement: Inhibition by paclitaxel in a pheochromocytoma cell model. *J. Mol. Neurosci.* **37**, 254–262
35. O'Brien, E. T., Salmon, E. D., and Erickson, H. P. (1997) How calcium causes microtubule depolymerization. *Cell Motil. Cytoskeleton* **36**, 125–135
36. Murray, P. J. (2006) STAT3-mediated anti-inflammatory signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 1028–1031
37. Walker, S. R., Chaudhury, M., Nelson, E. A., and Frank, D. A. (2010) Microtubule-targeted chemotherapeutic agents inhibit signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling. *Mol. Pharmacol.* **78**, 903–908
38. Murray, S., Briasoulis, E., Linardou, H., Bafaloukos, D., and Papadimitriou, C. (2012) Taxane resistance in breast cancer: Mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treatment Reviews* **38**, 890–903
39. Lu, W.-J. *et al.* (2011) Mortalin-p53 interaction in cancer cells is stress dependent and constitutes a selective target for cancer therapy. *Cell Death Differ.* **18**, 1046–1056
40. Wang H. *et al.* (2015) Dual-faced SH3BGRL: oncogenic in mice, tumor suppressive in humans. *Oncogene* 1–11. doi:10.1038/nc.2015.391
41. Chan, A. Y. *et al.* (2005) Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene* **24**, 7821–7829
42. Skog, J. *et al.* (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1470–1476
43. Oztopçu, P., Kabadere, S., Mercangoz, A., and Uyar, R. (2004) Comparison of vitamins K1, K2 and K3 effects on growth of rat glioma and human glioblastoma multiforme cells in vitro. *Acta Neurol. Belg.* **104**, 106–110
44. Eldh, M. *et al.* (2010) Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. *PLoS ONE* **5**, 1–8
45. Williams, T. K. *et al.* (2010) pp32 (ANP32A) expression inhibits pancreatic cancer cell growth and induces gemcitabine resistance by disrupting HuR binding to mRNAs. *PLoS ONE* **5**
46. Kitano, H., Mamiya, A., Tomomi, I., Shinichiro, K., and Chiaki, H. (2015) Coagulation factor IX regulates cell migration and adhesion in vitro. *Cell Biol. Int.* **39**, 1162–1172
47. Duhamel, M. *et al.* (2016) The proprotein convertase PC1/3 regulates TLR9 trafficking and the associated signaling pathways. *Sci. Rep.* **6**, 19360
48. Minciocchi, V. R., Freeman, M. R., and Di Vizio, D. (2015) Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Sem. Cell Develop. Biol.* **40**, 41–51
49. Tang, X., Mo, C., Wang, Y., Wei, D., and Xiao, H. (2013) Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated macrophages. *Immunology* **138**, 93–104
50. Tang, X. (2013) Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Lett* **332**, 3–10
51. Siveen, K. S., and Kuttan, G. (2009) Role of macrophages in tumour progression. *Immunol. Lett.* **123**, 97–102
52. Laoui, D. *et al.* (2011) Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int. J. Dev. Biol.* **55**, 861–867
53. Jung, K. Y. *et al.* (2015) Cancers with higher density of tumor-associated macrophages were associated with poor survival rates. *J. Pathol. Transl. Med.* **49**, 318–324
54. Chen, P. *et al.* (2011) Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner. *Clin. Cancer Res.* **17**, 7230–7239
55. Allavena, P., and Mantovani, A. (2012) Immunology in the clinic review series; focus on cancer: Tumour-associated macrophages: Undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin. Exp. Immunol.* **167**, 195–205
56. Palsson-Mcdermott, E. M. *et al.* (2015) Pyruvate kinase M2 regulates hif-1 $\alpha$  activity and il-1 $\beta$  induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab.* **21**, 65–80
57. Tarassishin, L., Suh, H.-S., and Lee, S. C. (2011) Interferon regulatory factor 3 plays an anti-inflammatory role in microglia by activating the PI3K/Akt pathway. *J. Neuroinflammation* **8**, 187
58. Nance, E. *et al.* (2014) Brain-penetrating nanoparticles improve paclitaxel efficacy in malignant glioma following local administration. *ACS Nano* **8**, 10655–10664
59. Liu, Y. *et al.* (2014) Paclitaxel loaded liposomes decorated with a multifunctional tandem peptide for glioma targeting. *Biomaterials* **35**, 4835–4847
60. Hu, Q. *et al.* (2013) Glioma therapy using tumor homing and penetrating peptide-functionalized PEG-PLA nanoparticles loaded with paclitaxel. *Biomaterials* **34**, 5640–5650
61. Chirio, D. *et al.* (2014) Positive-charged solid lipid nanoparticles as paclitaxel drug delivery system in glioblastoma treatment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **88**, 746–758
62. Jahraus, A. *et al.* (2001) ATP-dependent membrane assembly of F-actin facilitates membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* **12**, 155–170
63. Guerin, I. (2000) Disruption of the actin filament network affects delivery of endocytic contents marker to phagosomes with early endosome characteristics: The case of phagosomes with pathogenic mycobacteria. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 735–749
64. Zhu, Q., Han, X., Peng, J., Qin, H., and Wang, Y. (2012) The role of CXC chemokines and their receptors in the progression and treatment of tumors. *J. Mol. Histol.* **43**, 699–713
65. Keeley, E. C., Mehrad, B., and Strieter, R. M. (2010) CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Adv. Cancer Res.* **106**, 91–111
66. Wang, B. *et al.* (2009) A key role for early growth response-1 and nuclear factor-kappaB in mediating and maintaining GRO/CXCR2 proliferative signaling in esophageal cancer. *Mol. Cancer Res.* **7**, 755–764
67. Plaza-Menacho, I. *et al.* (2006) Ras/ERK1/2-mediated STAT3 Ser727 Phosphorylation by Familial Medullary Thyroid Carcinoma-associated RET Mutants Induces Full Activation of STAT3 and Is Required for c-fos Promoter Activation, Cell Mitogenicity, and Transformation. *J. Biol. Chem.* **282**, 6415–6424
68. Kees, T. *et al.* (2012) Microglia isolated from patients with glioma gain antitumor activities on poly (I:C) stimulation. *Neuro. Oncol.* **14**, 64–78
69. Mora, R. *et al.* (2009) TNF- $\alpha$ - and TRAIL-resistant glioma cells undergo autophagy-dependent cell death induced by activated microglia. *Glia* **57**, 561–581
70. Vizcaino, J. A. *et al.* (2014) ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat. Biotechnol.* **32**, 223–226
71. Vizcaino, J. A. *et al.* (2013) The Proteomics Identifications (PRIDE) database and associated tools: Status in 2013. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1–8

## Conclusions et perspectives

L'ensemble de nos résultats confirme que l'effet du Paclitaxel est similaire à celui du LPS. En effet, nous avons observé des similarités quant au profil protéique des macrophages PC1/3 KD stimulés avec l'un ou l'autre des ligands. Par exemple, la sécrétion de la cathepsine D est réduite sous LPS et l'est également sous Paclitaxel. Aussi, la sur-expression de CD36, des galectines 1 et 3, protéines impliquées dans la réponse immunitaire et d'Ano6, protéine clé de la phagocytose, est observée suite à la stimulation des macrophages au LPS ou au Paclitaxel. De plus, les deux ligands induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, bien que différentes selon le ligand. En effet, sous LPS, les macrophages ne libèrent pas CCL5, CCL3 ou CXCL3 (Duhamel et al., 2015), pourtant retrouvées dans le sécrétome de macrophages stimulés au Paclitaxel. En revanche, les cytokines CXCL9 et CCL20 sont sécrétées spécifiquement par les macrophages PC1/3 KD stimulés au LPS (Duhamel et al., 2015). L'ensemble des différences de sécrétion de cytokines est regroupé dans le Tableau 3. Ainsi, le Paclitaxel accentue l'orientation pro-inflammatoire des macrophages PC1/3 KD et déclenche la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'expression de protéines impliquées dans la réponse immunitaire. Cette orientation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire est également observée au sein d'un environnement immunosuppresseur, mimé par une stimulation à l'IL-10.

De plus, les facteurs sécrétés par les macrophages PC1/3 KD stimulés au Paclitaxel montrent une activité anti-tumorale contre les cellules de gliome (Figure 21). Depuis, cette stratégie de réactivation des macrophages par le Paclitaxel a été étudiée (Wanderley et al., 2018). En effet, cette étude a démontré *in vitro* et *in vivo* l'orientation de macrophages dérivés de moelle épinière de souris vers un phénotype M1 pro-inflammatoire après la stimulation du TLR4 par le LPS ou le Paclitaxel. Cette orientation est également observée au sein d'un environnement immunosuppresseur mimé par une stimulation à l'IL-4 ainsi que pour des macrophages préalablement orientés vers un phénotype anti-inflammatoire à l'aide d'une stimulation à l'IL-4.

Tableau 3 : Sécrétion des cytokines par les macrophages PC1/3 KD selon le ligand du TLR4 utilisé et l'impact d'un environnement immunosuppresseur (d'après Duhamel et al. 2015 et Duhamel et al., 2018).

Les cases **rouges** indiquent que les macrophages PC1/3 KD sécrètent une quantité plus importante de cytokines par rapport aux macrophages contrôles NT. Les cases **grises** indiquent qu'aucune différence de sécrétion n'est observée entre les macrophages NT et PC1/3 KD. Enfin, les cases blanches correspondent à un manque d'information pour les cytokines données. L'impact d'un environnement immunosuppresseur, mimé par une stimulation avec l'IL-10, sur la sécrétion des cytokines par les macrophages PC1/3 KD est indiqué par des symboles où « = » indique l'absence de changement et « ↓ » indique une diminution de sécrétion des cytokines par rapport au niveau de libération observé sans IL-10 dans le milieu.

Cytokines	PC1/3 KD		Paclitaxel		LPS	
		IL-10		IL-10		IL-10
<b>CCL5</b>		↓		=		=
<b>CXCL10</b>		↓		=		=
<b>TNF-α</b>		↓		=		=
<b>IL-6</b>		=		=		=
<b>CXCL1</b>		↓		=		=
<b>CXCL2</b>		=		=		=
<b>CCL3</b>		=		=		=
<b>CXCL3</b>		=		=		
<b>IL-1β</b>		=		=		=
<b>CXCL9</b>		=				=
<b>CCL20</b>		=				=

Il serait intéressant d'étudier l'influence des facteurs sécrétés par les macrophages PC1/3 KD stimulés au Paclitaxel sur d'autres cellules immunitaires. En effet, il a été précédemment mis en évidence que les facteurs sécrétés par les macrophages PC1/3 KD stimulés au LPS exercent une activité chimioattractive sur les lymphocytes CD4+ naïfs (Duhamel et al., 2015). Grâce à un test de chimiotactisme avec une chambre de Boyden nous pourrions étudier l'effet du sécrétome des macrophages PC1/3 KD sur la migration de différentes populations de lymphocytes, tels que les Tregs ou encore les lymphocytes T cytotoxiques. L'ensemble des cytokines pro-inflammatoires retrouvé parmi ces facteurs pourrait également activer les fonctions immunologiques d'autres cellules immunitaires. Aussi, le Paclitaxel agit directement sur d'autres cellules immunitaires. Il peut réduire le

nombre de lymphocytes T régulateurs ou encore stimuler la présentation d'antigènes par les cellules dendritiques (Javed et al., 2009). Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'efficacité du Paclitaxel dans un environnement tumoral plus complexe, regroupant différentes populations cellulaires et notamment plusieurs types de cellules immunitaires.

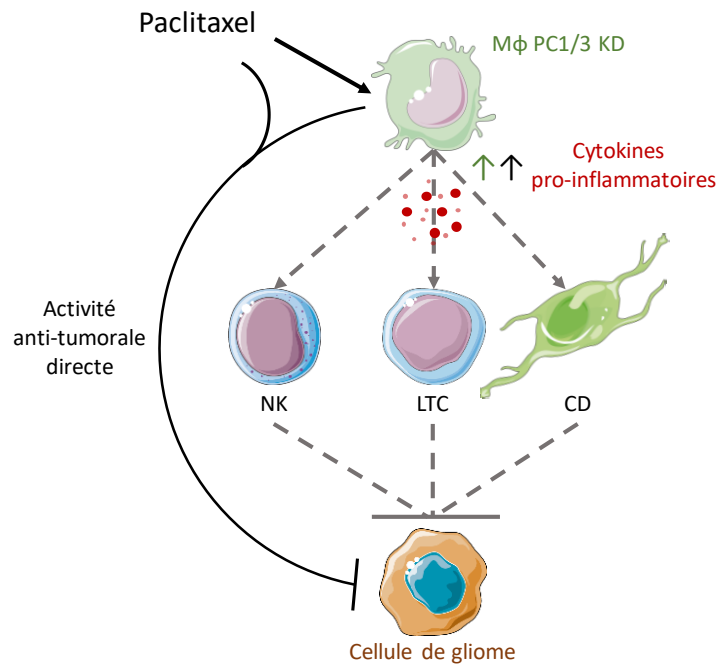


Figure 21 : Schéma récapitulatif de l'effet du Paclitaxel et des macrophages PC1/3 KD sur les cellules de gliome.

En plus de son effet sur les macrophages, le Paclitaxel démontre une activité anti-tumorale contre les cellules de gliome (Figure 21). Cependant, dans notre étude, nous étions confrontés à une résistance au Paclitaxel lorsque celui-ci était utilisé à de faibles concentrations sur des sphéroïdes composés de cellules de gliomes cultivées avec des macrophages NT ou PC1/3 KD. Les macrophages semblent responsables d'une résistance au traitement puisque les sphéroïdes cultivés seuls sont sensibles au Paclitaxel, même à de faibles concentrations. Néanmoins, cette résistance a pu être contournée par une pré-stimulation des macrophages au Paclitaxel, ce qui laisse envisager la possibilité d'une thérapie cellulaire qui utiliserait des macrophages préalablement orientés vers un profil anti-tumoral. Les thérapies cellulaires sont très attrayantes dans le cadre des tumeurs cérébrales, protégées par la BHE qui entrave les chimiothérapies. L'utilisation de cellules telles que les macrophages ou encore les neutrophiles est devenue une stratégie très étudiée pour l'amélioration de l'administration de chimiothérapie comme l'ont démontré Jingwei Xue et ses collègues. Ces

derniers ont modifié des neutrophiles avec des liposomes contenant du Paclitaxel (Xue et al., 2017). Ces cellules ont été injectées suite à une résection chirurgicale par voie intraveineuse au sein d'un modèle murin de greffe orthotopique. La réaction inflammatoire suivant la chirurgie est accompagnée par la libération de facteurs inflammatoires qui attirent les neutrophiles sur le site tumoral. Sous l'action des différents facteurs inflammatoires, les neutrophiles vont libérer les liposomes ainsi que le Paclitaxel. Ainsi, cette stratégie améliore le taux de survie des modèles mais n'inhibe pas complètement la repousse tumorale. L'association de chimiothérapies et des macrophages PC1/3 KD stimulés au Paclitaxel, macrophages anti-tumoraux qui semblent capables de réactiver la réponse immunitaire, pourrait donc être une stratégie encourageante dans le cadre du traitement des GBMs.

L'activité anti-tumorale des vésicules extracellulaires des macrophages PC1/3 stimulés au Paclitaxel laisse envisager une autre possibilité de thérapie. Formées à partir de corps multivésiculaires issus de la membrane plasmique, elles peuvent contenir plusieurs types de molécules, tels que des acides nucléiques, des protéines, ou encore des lipides qu'elles transportent d'une cellule à une autre. Elles délivrent leur contenu en fusionnant avec la membrane de la cellule cible et sont donc essentielles à la communication intercellulaire. L'utilisation des vésicules extracellulaires est très étudiée dans différentes stratégies thérapeutiques, notamment dans l'acheminement de médicaments (Bunggulawa et al., 2018). En effet, elles peuvent être modifiées pour contenir des acides nucléiques tels qu'un siRNA (Alvarez-Erviti et al., 2011) ou encore des substances pharmacologiques comme le Paclitaxel (Wang et al., 2019) et transporter leur contenu jusqu'aux cellules cibles. Ainsi, dans notre stratégie thérapeutique, nous pourrions envisager d'isoler les vésicules extracellulaires provenant de macrophages PC1/3 KD stimulés au Paclitaxel et les utiliser pour acheminer un siRNA contre PC1/3. Ces vésicules extracellulaires pourront non seulement exercer leur activité anti-tumorale mais aussi induire l'inhibition de PC1/3 au sein des macrophages présents dans l'environnement tumoral et ainsi reprogrammer les macrophages au sein de la tumeur vers le phénotype précédemment décrit, un phénotype pro-inflammatoire. Leur participation au développement tumoral sera ainsi réduite et l'efficacité des chimiothérapies pourrait être augmentée.

En vue d'une réactivation des macrophages, il serait intéressant de coupler l'inhibition de PC1/3 avec l'inhibition de la furine qui est également impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire et dans le phénotype inflammatoire des macrophages (Cordova et al., 2016). Dans cette optique, nous nous sommes tournés vers l'utilisation d'un inhibiteur commercial ciblant plusieurs PCs.

## CHAPITRE II

---

### L'INHIBITION DE PROPROTEINES CONVERTASES RALENTIT LE DEVELOPPEMENT TUMORAL ET ORIENTE LES MACROPHAGES VERS UN PHENOTYPE PRO-INFLAMMATOIRE ET ANTI-TUMORAL

#### Introduction

L'implication de PC1/3 dans la régulation du phénotype inflammatoire et la réponse immunitaire des macrophages n'est plus à démontrer. En effet, son inhibition au sein de macrophages induit leur orientation vers un phénotype pro-inflammatoire. Par ailleurs, cette inhibition combinée à la stimulation de TLR provoque la sécrétion de facteurs anti-tumoraux ayant une activité contre plusieurs types de cancers notamment le cancer du sein, de l'ovaire et les gliomes (Duhamel et al., 2015, 2016a, 2018). PC1/3 n'est pas le seul membre des PCs à être impliqué dans la régulation de la réponse inflammatoire et immunitaire. En effet, plusieurs études ont mis en avant l'implication de la furine dans l'activité de cellules immunitaires. Au sein des macrophages, son inhibition mène à l'expression de gènes liés à leur activation tels que *Serpinb1a*, *Serpinb2*, *Il6*, *Il1-β*, *Ccl2*, et *Ccl7*. L'expression de gènes codants pour les cytokines pro-inflammatoires, notamment TNF-α et IL-6, a également été observée (Cordova et al., 2016). C'est pourquoi, il pourrait être avantageux d'inhiber plusieurs PCs, notamment PC1/3 et la furine, au sein des macrophages. De plus, l'implication de PACE4 dans le cancer de l'ovaire (Longuespée et al., 2014) et de la prostate (D'Anjou et al., 2011) a été démontrée. Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur à spectre large pourrait impacter à la fois les macrophages et la tumeur. Dans cette optique, nous avons utilisé un inhibiteur peptidomimétique qui agit comme un substrat compétitif des PCs, ciblant PC1/3, la furine mais aussi PC4, PACE4 et PC5/6 (Becker et al., 2012).

L'inhibition de différentes PCs est d'autant plus intéressante que plusieurs d'entre elles jouent un rôle clé dans le développement tumoral. En effet, plusieurs de leurs substrats sont impliqués dans les processus de croissance tumorale. Par exemple, le TGF-β est un facteur essentiel dans le développement de la tumeur et de l'environnement immunosuppresseur et est activé suite au clivage de son précurseur par la furine (Siegfried et al., 2020). Il en est de même pour le VEGF, impliqué dans l'angiogenèse, ou encore les MMPs, responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire et ainsi des processus métastatiques (Siegfried et al.,

2020). Plusieurs études ont démontré l'intérêt thérapeutique de l'inhibition de PCs au sein de cancers. En effet, l'application d'un inhibiteur de PCs diminue la taille de la tumeur au sein d'un modèle murin de carcinome (Bassi et al., 2010) et ralentit la progression tumorale au sein d'un modèle murin de xénogreffe de cancer de la prostate (Levesque et al., 2015).

### Objectifs

Ainsi, l'objectif sous-jacent à l'utilisation d'un inhibiteur ciblant plusieurs de ces enzymes est d'agir à la fois sur les macrophages et les cellules cancéreuses. L'inhibition de la furine et de PC1/3 au sein des macrophages pourrait induire leur orientation vers un phénotype pro-inflammatoire et anti-tumorale. Par ailleurs, l'inhibition de l'ensemble des PCs dans les cellules cancéreuses permettrait de ralentir le développement tumoral.

Ainsi, pour déterminer l'impact de l'inhibiteur sur les différents types cellulaires, des analyses protéomiques ont été réalisées sur les cellules et les sécrétomes des cellules de gliome C6 préalablement utilisées (Duhamel et al., 2018) et sur les macrophages de rat NR8383 de type sauvage (WT). Des tests de viabilité et d'invasion ont permis d'étudier la toxicité résultant de l'inhibition des PCs sur les cellules cancéreuses et les macrophages, en co-culture ou non.



## Résultats

Dans un premier temps, des RT-PCRs ont été réalisées pour déterminer quelles sont les proprotéines convertases qui sont exprimées par les différentes lignées cellulaires utilisées. Ainsi, les macrophages NR8383 expriment PC1/3 et la furine et les cellules de gliome C6, quant à elles, expriment PACE4 et également la furine.

A l'instar des macrophages PC1/3 KD (Duhamel et al., 2015), les macrophages WT traités avec l'inhibiteur de PCs semblent s'orienter vers un profil pro-inflammatoire. Les analyses protéomiques du sécrétome de ces macrophages ont, en effet, révélé la présence de cytokines pro-inflammatoires telles que CCL6 ou la Peroxiredoxin 5. Cet effet est également observé au sein d'une lignée humaine de macrophages, les THP1 qui, suite à un traitement avec l'inhibiteur, sur-expriment des protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette tout comme cela avait été observé pour les macrophages PC1/3 KD (Duhamel et al., 2015). Des protéines impliquées dans l'activation de la réponse immunitaire, notamment la Peroxiredoxin-1 qui active les NK et induit une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Shichita et al., 2012), sont également retrouvées parmi les protéines sur-exprimées par les THP1 traités avec l'inhibiteur de PCs. Ainsi, la sur-expression de cytokines pro-inflammatoires et de protéines impliquées dans la réponse immunitaire suggère que l'inhibiteur de PCs oriente les macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire.

Outre le profil pro-inflammatoire, une sous-expression de protéines impliquées dans le développement tumoral est observée dans les macrophages NR8383 WT incubés avec l'inhibiteur. En effet, les études protéomiques réalisées sur leurs sécrétomes ont mis en évidence une sous-expression de la protéine Macrophage migration inhibitory factor (MIF), connue pour être impliquée dans le développement des GBMs (Mittelbronn et al., 2011). Des protéines liées à l'activité des macrophages telles que la protéine Macrophage-capping protein (CAPG) et la Transgeline-2 ou au métabolisme (Purine nucleoside phosphorylase et L-lactate dehydrogenase B chain) sont également sur-exprimées. Des résultats similaires sont obtenus avec les THP1. Après leur traitement avec l'inhibiteur de PCs, une sous-expression de CD44 est observée. Cette protéine est habituellement sur-exprimée dans les gliomes et impliquée dans plusieurs processus du développement tumoral tels que la prolifération, l'angiogenèse ou encore la métastase (Mooney et al., 2016). L'Apolipoprotéine E, marqueur du phénotype anti-inflammatoire (Baitsch et al., 2011), est également sous-exprimée par les

THP1 incubés avec l'inhibiteur. L'inhibiteur semble donc influencer le phénotype des macrophages en favorisant une orientation pro-inflammatoire et en réduisant leur implication dans le développement tumoral.

Non seulement l'inhibiteur agit favorablement sur le phénotype des macrophages mais il est aussi toxique pour les cellules cancéreuses tout en épargnant les macrophages. En effet, il réduit la viabilité des cellules de gliome de rat de 40% et ce, dès l'utilisation d'une concentration de 10  $\mu\text{M}$ . Ceci est plus efficace que le TMZ, couramment utilisé dans le traitement des GBMs. En effet, 400  $\mu\text{M}$  de TMZ sont nécessaires pour réduire de 30% la viabilité des C6 lorsque 100  $\mu\text{M}$  d'inhibiteur de PCs suffisent. En revanche, à ces concentrations la viabilité des macrophages n'est pas impactée.

Les analyses protéomiques ont également démontré que l'inhibiteur de PCs diminue le potentiel tumoral des cellules cancéreuses et leur capacité à établir un environnement immunosuppresseur. En effet, une incubation avec 150 $\mu\text{M}$  d'inhibiteur de PCs conduit à une sous-expression de facteurs impliqués dans le développement tumoral tels que Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit (RAB3GAP2), responsable de la prolifération cellulaire ou encore du C-type mannose receptor 2 (MRC2) qui induit l'invasion cellulaire. De plus, l'analyse du sécrétome des cellules cancéreuses traitées avec l'inhibiteur de PCs démontre une diminution de la sécrétion de protéines clés dans le développement de l'environnement immunosuppresseur telles que CSF1. En effet, celle-ci joue un rôle majeur dans le recrutement et la suppression de l'activité immunologique des macrophages (Mantovani et al., 2017).

Ces premiers résultats ont permis de démontrer que l'inhibition de PCs impacte à la fois les cellules cancéreuses et les macrophages. L'inhibiteur utilisé dans cette étude pourrait avoir un effet anti-tumoral direct et indirect à travers l'orientation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire et en diminuant leur implication dans le développement tumoral. Pour déterminer si ces effets seraient observés au sein d'un environnement tumoral plus complexe, nous avons utilisé un modèle de co-culture où les cellules cancéreuses C6 et les macrophages NR8383 WT sont réunis sous forme de sphères 3D.

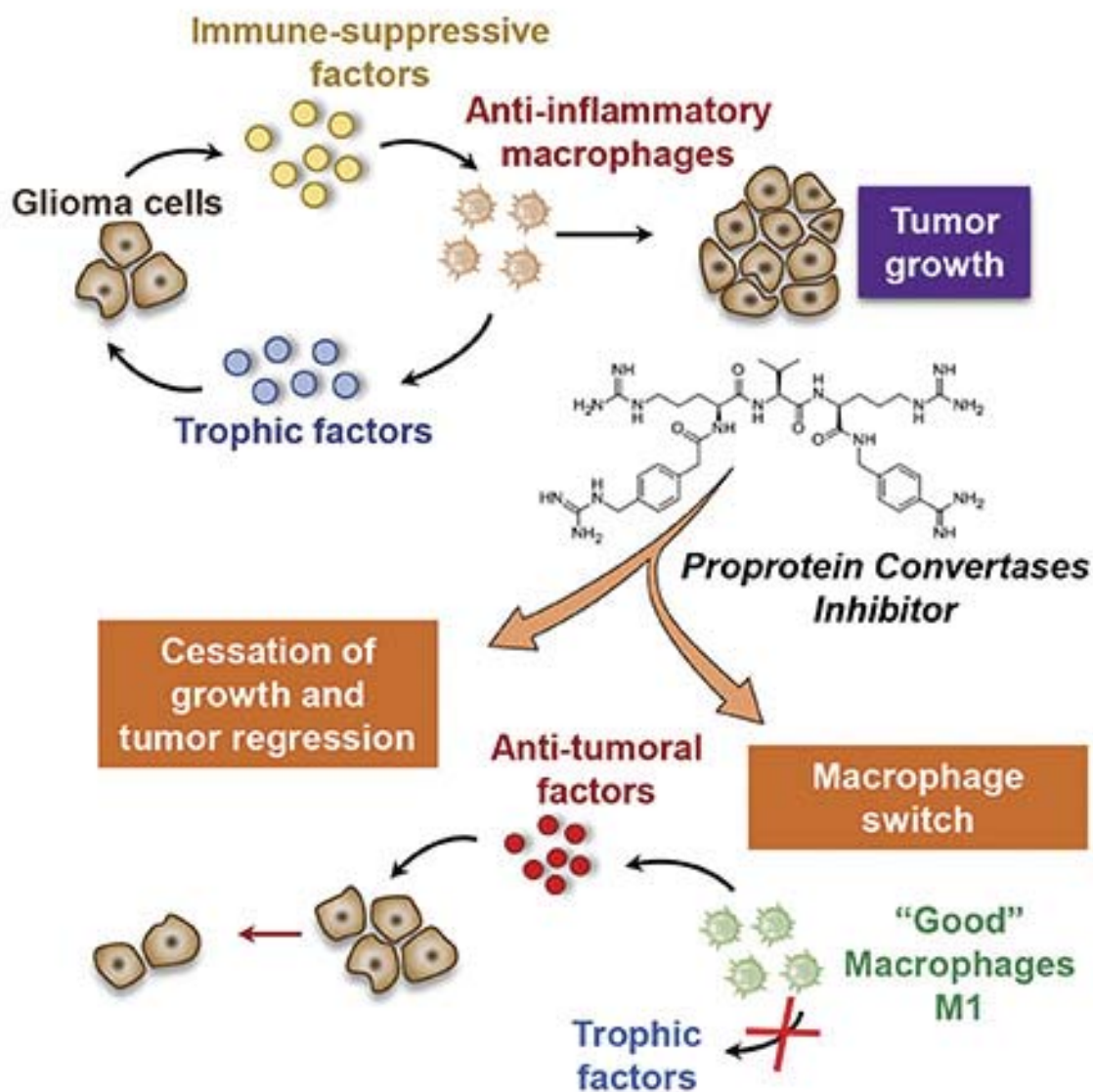
Dans un premier temps, nous voulions déterminer le degré d'infiltration de l'inhibiteur au sein du sphéroïde. L'imagerie par spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence

une pénétration de l'inhibiteur au centre du sphéroïde dès 16h d'incubation. Ce dernier reste détectable jusqu'à 72h après le traitement.

Ces sphéroïdes, mixtes ou non, ont permis d'étudier l'invasion des cellules cancéreuses ainsi que l'impact de l'inhibiteur sur le profil protéique d'un environnement proche de l'environnement tumoral. Une diminution de l'invasion de 50% est observée quatre jours après le traitement des sphéroïdes avec l'inhibiteur de PCs et ce, même lorsque les macrophages sont associés aux cellules cancéreuses. Cette diminution est plus importante que celle observée avec une concentration six fois plus importante de TMZ. Il semblerait donc que l'inhibiteur de PCs conserve son activité anti-tumorale même au sein d'un environnement regroupant les cellules de gliome et les macrophages. Des analyses protéomiques ont également été conduites pour déterminer l'impact qu'exerce l'inhibiteur de PCs sur cet environnement tumoral. Comme observé sur les cultures indépendantes de cellules cancéreuses et de macrophages, le traitement des sphéroïdes mixtes avec l'inhibiteur de PCs conduit à la sous expression de protéines impliquées dans le développement de la tumeur et de l'environnement immunosuppresseur. C'est le cas des Procollagen-lysine 1 et 2 qui modulent la maturation du collagène et ainsi contribuent au processus métastatique ou encore du répresseur transcriptionnel Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1 (Lrrfip 1) qui est un inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B. Les protéines impliquées dans la réponse pro-inflammatoire et immunitaire sont quant à elles sur-exprimées suite à une incubation avec l'inhibiteur de PCs. La galectine-3 et ICAM-1, décrites comme des inhibiteurs de l'orientation vers un phénotype anti-inflammatoire sont également retrouvées dans ce groupe de protéines sur-exprimées. La protéine Eps8 impliquée dans la phagocytose et la protéine Sdha, essentielle à l'orientation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire sont aussi sur-exprimées par les sphéroïdes traités avec l'inhibiteur de PCs. Ainsi, ce dernier conserve son effet anti-tumoral et son impact sur le phénotype des macrophages, même lorsque les deux types cellulaires sont associés.

# Molecular Therapy Oncolytics

Volume 17  
June 26, 2020



# The Role of a Proprotein Convertase Inhibitor in Reactivation of Tumor-Associated Macrophages and Inhibition of Glioma Growth

Mélanie Rose,<sup>1,2,4</sup> Marie Duhamel,<sup>1,4</sup> Soulaïmane Aboulouard,<sup>1</sup> Firas Kobeissy,<sup>3</sup> Emilie Le Rhun,<sup>1</sup> Annie Desmons,<sup>1</sup> Dominique Tierny,<sup>2</sup> Isabelle Fournier,<sup>1</sup> Franck Rodet,<sup>1</sup> and Michel Salzet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM), INSERM U1192, Université de Lille, 59000 Lille, France; <sup>2</sup>Oncovet Clinical Research (OCR), SIRIC ONCOLille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France; <sup>3</sup>Department of Psychiatry, McKnight Brain Institute, University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA

**Tumors are characterized by the presence of malignant and non-malignant cells, such as immune cells including macrophages, which are preponderant. Macrophages impact the efficacy of chemotherapy and may lead to drug resistance. In this context and based on our previous work, we investigated the ability to reactivate macrophages by using a proprotein convertases inhibitor. Proprotein convertases process immature proteins into functional proteins, with several of them having a role in immune cell activation and tumorigenesis. Macrophages were treated with a peptidomimetic inhibitor targeting furin, PC1/3, PC4, PACE4, and PC5/6. Their anti-glioma activity was analyzed by mass spectrometry-based proteomics and viability assays in 2D and 3D *in vitro* cultures. Comparison with temozolomide, the drug used for glioma therapy, established that the inhibitor was more efficient for the reduction of cancer cell density. The inhibitor was also able to reactivate macrophages through the secretion of several immune factors with antitumor properties. Moreover, two proteins considered as good glioma patient survival indicators were also identified in 3D cultures treated with the inhibitor. Finally, we established that the proprotein convertases inhibitor has a dual role as an anti-glioma drug and anti-tumoral macrophage reactivation drug. This strategy could be used together with chemotherapy to increase therapy efficacy in glioma.**

## INTRODUCTION

Proprotein convertases (PCs) are proteases of the subtilisin/kexin family that cleave proproteins through limited proteolysis and convert them into bioactive proteins and peptides.<sup>1–3</sup> Mammalian PCs include PC subtilisin/kexin type 1 (PCSK1), PCSK2, furin, PCSK4, PCSK5, PCSK6, and PCSK7, which are known to cleave proproteins at paired basic residues.<sup>4</sup> PCs cleave a variety of precursor proteins within the secretory pathway, including neuropeptides, hormones, growth factors and their respective receptors, adhesion molecules, bacterial toxins, and viral glycoproteins.<sup>5</sup> However, deregulation of these enzymes has been associated with pathological conditions, including endocrinopathies,<sup>6</sup> Alzheimer's disease,<sup>7</sup> and tumors.<sup>8</sup> Among these PCs, furin is one of the major PCs known to

be involved in tumor progression. Its expression has been confirmed in a large spectrum of cancers.<sup>1</sup> The importance of furin activity for the processing of many cancer-related substrates has been shown, and it has been proposed to promote the malignant phenotype of cancer cells.<sup>8,9</sup> Platelet-derived growth factor A (PDGF-A), insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R), transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP), vascular endothelial growth factor C (VEGF-C), and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAM-TS) are the best known cancer-related furin substrates.

Despite significant advances in cancer treatment, resistance to the applied therapy remains a major problem.<sup>10,11</sup> The increased efflux of the drugs, the enhancement of repair/increased tolerance to DNA damage, the high anti-apoptotic potential, and the decreased permeability and enzymatic deactivation would enable cancer cells to survive chemotherapy.<sup>10</sup> Indeed, multidrug resistance is one of the most significant problems in oncology today.<sup>12–14</sup>

Nevertheless, among the emerging therapies that are in development, immunotherapy represents one with the most promise.<sup>15</sup> The goal of immunotherapy is to eliminate cancer cells through the transfer of *ex vivo* expanded and activated immune cells. Immune cells such as

Received 6 February 2020; accepted 20 March 2020;  
<https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.03.005>.

<sup>4</sup>These authors contributed equally to this work.

**Correspondence:** Michel Salzet, Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM), INSERM U1192, Université de Lille, Faculté des Sciences, Campus Cité Scientifique, Bât SN3, 1er étage, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

**E-mail:** [michel.salzet@univ-lille.fr](mailto:michel.salzet@univ-lille.fr)

**Correspondence:** Marie Duhamel, Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM), INSERM U1192, Université de Lille, Faculté des Sciences, Campus Cité Scientifique, Bât SN3, 1er étage, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

**E-mail:** [marie.duhamel@univ-lille.fr](mailto:marie.duhamel@univ-lille.fr)

**Correspondence:** Franck Rodet, Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM), INSERM U1192, Université de Lille, Faculté des Sciences, Campus Cité Scientifique, Bât SN3, 1er étage, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

**E-mail:** [franck.rodet@univ-lille.fr](mailto:franck.rodet@univ-lille.fr)



dendritic cells (DCs), natural killer (NK) cells, cytotoxic T cells, and cytokine-induced killer (CIK) cells have been investigated as targets for immunotherapy against cancer.<sup>15</sup> Additionally, the passive transfer of monoclonal antibodies has been an effective treatment for some cancers.<sup>16</sup>

Promising trials evaluating the safety and efficacy of immunotherapy for prostate cancer, renal cell carcinoma, and gastric and colorectal cancers have opened the door to research in the area of oncoimmunology, which integrates immunotherapy along with conventional cancer treatments.<sup>16</sup> Tumors are heterogeneous and characterized by the presence of many malignant and benign cell types. Among the non-malignant cells, specific immune cells are present, known as tumor-associated macrophages (TAMs), which represent a key element for tumor microenvironment interaction. These TAMs are switched to the protumoral phenotype through cancer cell-tissue microenvironment interaction.<sup>15</sup> Thus, one challenge is to reactivate these TAMs and combat cellular immune suppression. PCs have been identified in immune cells and shown to control the Toll-like receptor (TLR)/myeloid differentiating factor 88 (MyD88)/nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-dependent pathway through PC1/3<sup>17–22</sup> and the TLR/MyD88/NF- $\kappa$ B independent pathway through furin in antigen-presenting immune cells such as macrophages or DCs.<sup>18,23,24</sup>

Interestingly, the inhibition of PC1/3 in knockout (KO) mice or the knock down (KD) of the resident lung macrophage cell line (NR8383) led to a pro-inflammatory response. The NR8383 rat pulmonary macrophage cell line was previously shown as a good model to study the role of PC1/3 in the macrophage innate immune response.<sup>18–20,22</sup> The pro-inflammatory response in NR8383 PC1/3 KO macrophages is characterized by the secretion of chemotactic effectors attracting cytotoxic T cells and anti-tumoral factors against glioma and gynecological cancers.<sup>18,19</sup> In this way, finding an inhibitor acting on furin in cancer cells that can also push toward PC1/3 in TAMs can be a novel alternative in cancer immunotherapy. Several inhibitors have been designed against PCs, and several targeting the furin protein<sup>25–27</sup> or PACE4<sup>28,29</sup> are used for cancer therapy.

In this context, we are using a peptidomimetic PC inhibitor that can act against furin and has been shown to inhibit several other PCs, including PC1/3, PC4, PACE4, and PC5/6, but with no effect on PC2 and PC7. This inhibitor has been developed by Becker et al.<sup>30</sup> This is a cell-permeable tripeptide derivative containing an Arg-X-Arg motif that acts as a highly potent and reversible furin inhibitor ( $K_i$  of 16 pM) and PC1/3, PC4, PACE4, and PC5/6 inhibitor with almost similar potency. Other peptidomimetic PC inhibitors are used for anti-tumoral assays such as PACE4 inhibitor,<sup>31</sup> Multi-Leu peptide PACE4 inhibitor,<sup>32</sup> or furin inhibitor.<sup>33</sup> These inhibitors are used in tumor cell cultures at a concentration ranging from 25 to 100  $\mu$ M. For this reason, we investigated, via a concentration/response pharmacodynamic approach (10–600  $\mu$ M), proteomic platforms, and biochemical anti-tumoral assays, the ability of such a peptidomimetic PC inhibitor to act against glioma cells and macrophages at the same time. We also evaluated its ability to reactivate the mac-

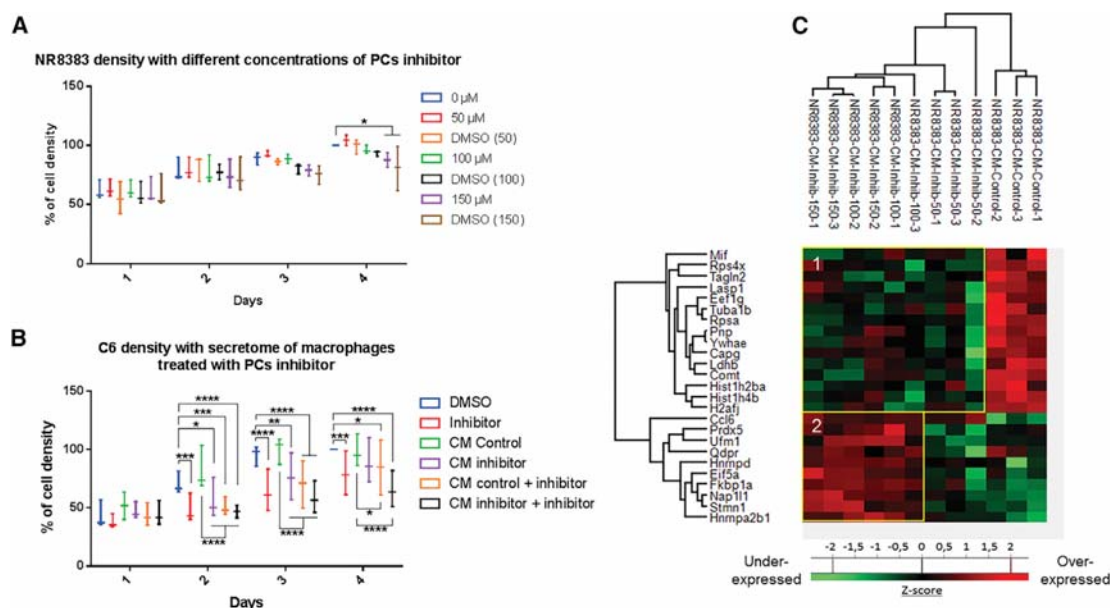
rophages within the tumor. We established that the PC inhibitor is active on glioma cells at a lower dose (2-fold less) than the key drug used in glioma treatment, i.e., temozolomide (TMZ). Moreover, this PC inhibitor is active toward TAMs by reactivating them to be cytotoxic in the intimacy of the tumor environment.

## RESULTS

### The PC Inhibitor Triggers the Secretion of Anti-tumoral Factors by Macrophages and Decreases C6 Glioma Cell Viability

We have previously demonstrated that PC1/3, a PC, is involved in macrophage activation and that its inhibition induces anti-tumoral properties.<sup>19</sup> The present study aimed to evaluate the potential use of a peptidomimetic inhibitor of PCs as a potential anti-cancer therapy through tumor inhibition and macrophage reactivation. We first established, using RT-PCR analyses, the expression of PCs in C6 glioma. We previously demonstrated the expression of PC1/3 and furin in NR8383 cells.<sup>22</sup> Also, we only observed the expression of PACE4 and furin in C6 glioma. No PC1/3 has been detected (Figure S1). In this context, since the peptidomimetic PC inhibitor ( $C_{35}H_{55}N_{15}O_4$ ) is active toward furin, PACE4, and PC1/3 at the same efficiency ( $K_i$  of 16 pM), we selected this PC inhibitor for our study. In order to know whether this PC inhibitor can trigger the secretion of anti-tumoral factors by macrophages, as previously described with the NR8383 PC1/3 KD cell line, we performed a viability assay on the rat C6 glioma cell line (Figure 1B). Based on the literature for the concentration used in cells or tissue cultures for such types of an inhibitor,<sup>30–33</sup> we used this inhibitor at the micromolar range. In the first step, we evaluated the toxicity of the PC inhibitor directly on the macrophages in order to select the right concentration of inhibitor to use. As shown in Figure 1A, the PC inhibitor did not affect the viability of macrophages at 50 and 100  $\mu$ M. A slight decrease was observed after 4 days of stimulation with 150  $\mu$ M PC inhibitor due to the toxicity of dimethyl sulfoxide (DMSO), as revealed by the control DMSO (150  $\mu$ M). At the highest concentration of 300  $\mu$ M PC inhibitor, the significant impact was shown at 3 days post-treatment (Figure S2A). With a volume of DMSO corresponding to the concentration of 150  $\mu$ M inhibitor, we noticed a decrease in the proliferation of the macrophages. Therefore, for the following experiment, we treated the macrophages with 100  $\mu$ M PC inhibitor to avoid the DMSO toxicity effect. We then tested the anti-tumor properties of the conditioned medium of macrophages treated with or without the PC inhibitor at 100  $\mu$ M during 24 h (Figure 1B). The conditioned medium of the untreated macrophages (CM control) was not toxic for glioma cancer cells since the same viability was identified in the control condition at different time points (control). The conditioned medium of macrophages treated beforehand with the PC inhibitor (100  $\mu$ M) decreased the viability of the C6 cells (CM inhibitor) by 30% compared to the control and to the CM control as early as 2 days after the incubation of C6 glioma cells with the macrophage-conditioned medium. However, we observed that the inhibitor alone had the same effect as the conditioned medium of macrophages. We cannot exclude that the inhibitor was still present in the medium of macrophages, which may have caused a decrease in C6 cell viability. When we added the inhibitor into the treated macrophage-conditioned medium, an additive effect seemed to be observed after 3 and 4 days, even if it was not statistically significant (CM





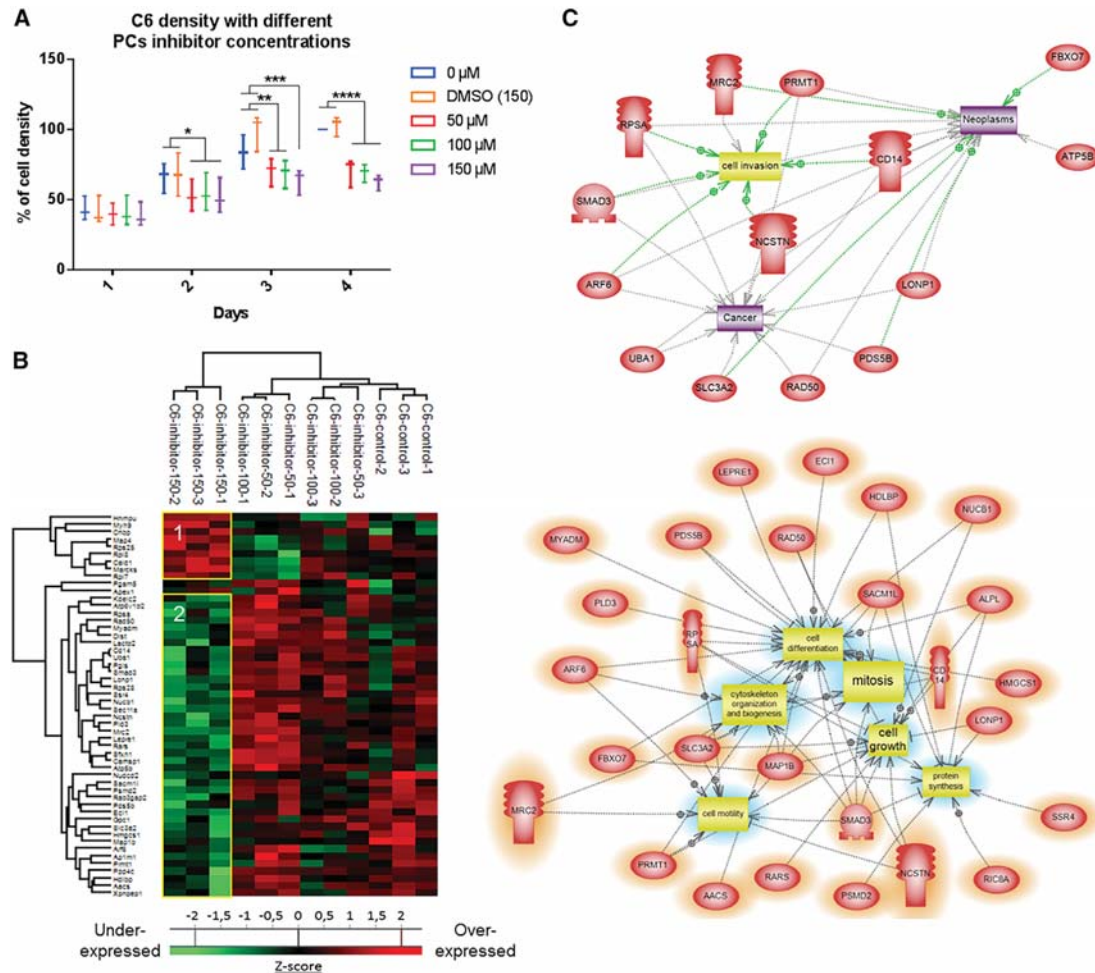
**Figure 1. PC Inhibitor Triggers a Molecular Change in Protein Secretion of NR8383 Macrophages**

(A and B) The cell density of NR8383 macrophages (A) and C6 rat glioma cells (B) was determined by an MTS assay. The assays were conducted for 1, 2, 3, and 4 days. All results are representative of three independent experiments. Significant differences were identified using a Tukey’s multiple comparisons test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . (A) NR8383 macrophages were incubated with different concentrations of PC inhibitor (50, 100, or 150  $\mu\text{M}$ ) or with vehicle (DMSO). (B) The C6 cells were incubated with DMSO (1) or 100  $\mu\text{M}$  PC inhibitor (2) or with NR8383 conditioned media (CM) obtained after 24-h DMSO (3) or 100  $\mu\text{M}$  PC inhibitor (4) treatment. In the condition “CM control + inhibitor” (5) and “CM inhibitor + inhibitor” (6), the cells were incubated with CM from macrophages treated with DMSO (5) or PC inhibitor (6) supplemented with PC inhibitor. (C) NR8383 macrophages were treated or not with PC inhibitor (50, 100, or 150  $\mu\text{M}$ ). CM were digested and analyzed with LC-MS/MS. MaxQuant and Perseus software were used for the statistical analysis, and a heatmap was generated to show proteins that were significantly different between treated and untreated NR8383 CM. Two clusters are highlighted (1 and 2).

inhibitor + inhibitor). This cumulative effect was not observed when the inhibitor was added in the conditioned medium of the untreated macrophages (CM control + inhibitor). Therefore, the inhibitor had a direct effect on C6 cancer cells but seemed also to induce the secretion of anti-tumoral factors by macrophages since an effect of the conditioned medium was observed.

In order to answer this question, a proteomic study was then conducted to analyze the composition of the conditioned medium of macrophages treated with the PC inhibitor at different concentrations (50, 100, and 150  $\mu\text{M}$ ). Shotgun proteomic analysis of secreted proteins was performed 24 h after PC inhibitor treatment of macrophages. A total of 884 secreted proteins were identified. A comparison of the proteins between PC inhibitor-treated macrophages and non-treated macrophages allowed the identification of 25 proteins with significant differential regulation (Figure 1C; Table S1). As a criterion of significance, we applied an ANOVA test with a significance threshold of  $p < 0.05$ , and a heatmap was created. Among these proteins, 10 were more secreted by PC inhibitor-treated macrophages at concentrations of 100 and 150  $\mu\text{M}$  compared to control macrophages. Interestingly, some pro-inflammatory phenotype markers were found such as chemokine (C-C motif) ligand 6 (CCL6) and PRDX5 (PRDX5), suggesting that the inhibitor was also able to induce the activation of macrophages as previously described for the NR8383 PC1/3 KD macrophages.<sup>19</sup>

CCL6 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (HNRNP) proteins, more secreted by treated macrophages, are involved in cytokine signaling. Another interesting protein identified was peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (FKBP1A), which is known to have antitumor properties. FKBP1A also prevents TGF- $\beta$  receptor activation.<sup>35</sup> We also noticed that 50  $\mu\text{M}$  PC inhibitor was not enough to induce the secretion of these proteins by macrophages. A concentration of 100 or 150  $\mu\text{M}$  is therefore more suited for our study. Alternatively, 15 proteins were down-secreted by PC inhibitor-treated macrophages at concentrations of 50, 100, and 150  $\mu\text{M}$  compared to control macrophages treated with DMSO (Figure 1C; Table S1). The PC inhibitor seems to impair some macrophage functions as demonstrated by a down-secretion of migration-related proteins (macrophage migration inhibitory factor [MIF] and LIM and SH3 domain protein 1 [LASP1]) and phagocytosis-related proteins (macrophage-capping protein [CAPG] and transgelin-2 [TAGLN2] proteins). Of interest, the macrophage migration inhibitory factor (MIF) is also known to be involved in glioblastoma progression.<sup>36</sup> Moreover, several proteins related to the metabolism process such as purine nucleoside phosphorylase (PNP), lactate dehydrogenase B (LDHB), and catechol-*O*-methyltransferase (COMT) were also less secreted under PC inhibitor treatment of macrophages, indicating a change in macrophage activity. In conclusion, proteins more secreted by macrophages treated with 100 and 150  $\mu\text{M}$  of the inhibitor are more



**Figure 2. PC Inhibitor Toxicity for C6 Rat Glioma Cells**

(A) The cell density of C6 rat glioma cells was determined by an MTS assay after stimulation with 50, 100, or 150 μM PC inhibitor or with DMSO. The assays were conducted for 1, 2, 3, and 4 days. All results are representative of three independent experiments. Significant differences were identified using a Tukey's multiple comparisons test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . (B) C6 cells were treated or not with PC inhibitor (50, 100, or 150 μM) and lysed before FASP and LC-MS/MS analysis. MaxQuant and Perseus software were used for the statistical analysis, and a heatmap was generated to show proteins that were significantly different between treated and untreated C6 in the cell extracts. Two clusters are highlighted (1 and 2). (C) Global pathway analyses of cluster 2.

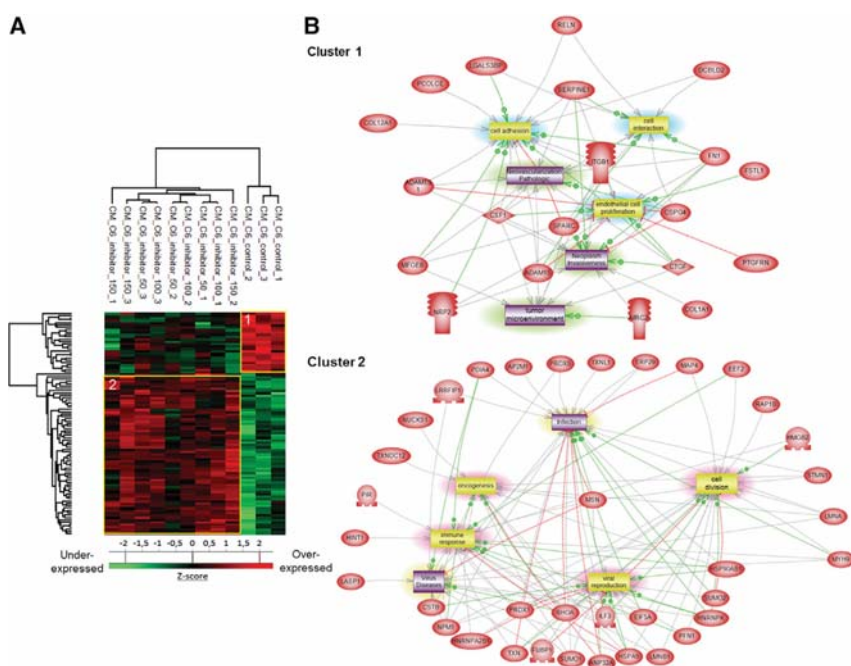
pro-inflammatory, as we previously described for the NR8383 PC1/3 KD cell line. We have also identified some anti-tumoral factors that can explain the decrease of the viability of C6 cells observed in Figure 1B. We have also confirmed these proteomics results on the THP1 human macrophages cell line (Figure S3). Thus, PC inhibition triggers the secretion of pro-inflammatory factors by THP1 as well as NR8383 and decreases the secretion of proteins involved in tumorigenesis processes and the anti-inflammatory microenvironment.

#### The PC Inhibitor Acts on C6 Glioma Cells by Decreasing Their Viability and Their Expression of Microenvironmental-Related Proteins

Since the inhibition of PCs in C6 glioma cancer cells triggered a decrease of cell viability, we examined the dose-dependent effects of

the PC inhibitor. For that, we have cultured C6 cells with the inhibitor at 50, 100, or 150 μM for 4 days as was performed for macrophages (Figure 2A). We also checked the effect for lower concentrations (1 and 10 μM) and higher concentrations (300 and 400 μM). No effect was observed prior to the 10 μM treatment. At 10 μM, a decrease of C6 cell proliferation was seen, but it was lower than for concentrations above 50 μM (Figure S2B). We also noticed a significant effect at 300 and 400 μM at 2 days post-treatment (Figure S2B). The PC inhibitor decreased the viability of the glioma cells by 40% at any concentration >50 μM used compared to the control without inhibitor at 4 days post-treatment. Interestingly, a volume of DMSO corresponding to the one used at the highest concentration of the inhibitor (400 μM) did not influence the viability of the glioma cells. Therefore, the effect observed was clearly due to the inhibitor.





**Figure 3. PC Inhibitor Decreases the Secretion of Tumor Microenvironment-Related Proteins and Increases the Secretion of Immune Proteins**

(A) C6 cells were treated or not with PC inhibitor (50, 100, or 150  $\mu\text{M}$ ). Conditioned media were digested and analyzed with LC-MS/MS. MaxQuant and Perseus software were used for the statistical analysis, and a heatmap was generated to show proteins that were significantly different between treated and untreated C6 conditioned media. Two clusters are highlighted (1 and 2). (B) Global pathway analyses of clusters 1 and 2.

Next, in order to decipher the molecular impact of the PC inhibitor on C6 glioma cancer cells, we performed a proteomic study of the cellular contents after 24-h treatment with the inhibitor at different concentrations. The control cells (C6-control) were only treated with the volume of DMSO corresponding to the highest concentration of the inhibitor (150  $\mu\text{M}$ ). Shotgun proteomic analysis of C6 glioma cells yielded 1,942 protein identifications across all samples. Twelve proteins were exclusive to 50  $\mu\text{M}$ , 33 proteins to 100  $\mu\text{M}$ , 43 proteins to 150  $\mu\text{M}$ , and 26 proteins to the control (Figure S4A; Data S1). Among the 12 proteins identified after the 50  $\mu\text{M}$  PC inhibitor, the immunity-related GTPase family M protein (*LRGM*) known to activate macrophage migration has been identified as well as the repressor of translation initiation protein that regulates EIF4E activity (*Eif4ebp1*) and the latexin, which acts as a tumor suppressor.<sup>37</sup> For the proteins identified at 100  $\mu\text{M}$ , the TRPM4 transient receptor has been identified as well as semaphorin-3A, known to have a controversial effect on the tumor (promote<sup>38</sup> or inhibit<sup>39</sup>), and netrin receptor UNC5B, which acts toward angiogenesis.<sup>40</sup> The proteins detected at 150  $\mu\text{M}$  included the WD repeat-containing protein 26 (*Wdr26*), an inhibitor of the mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway,<sup>41</sup> the melanoma-associated antigen D1 (*MAGED1*), which inhibits cell cycle progression and facilitates NGFR-mediated apoptosis,<sup>42</sup> and also *SMAD2* and *SMAD9*, which can switch the macrophage phenotype to M2.<sup>43</sup> We then looked at the differentially expressed proteins. Again, as a criterion of significance, we applied an ANOVA significance threshold of  $p < 0.05$ , and a heatmap was created, from which 52 proteins showed a significant difference in label-free quantification (LFQ) expression between 150  $\mu\text{M}$ -treated C6 glioma cells and the other conditions (inhibitor at 50  $\mu\text{M}$ , inhibitor at 100  $\mu\text{M}$ , and control). Two main clusters were highlighted (Figure 2B;

Data S2). Nine proteins were upregulated in the 150  $\mu\text{M}$ -treated C6 cells when compared to the other conditions, including myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (*MARCKS*), which is involved in the reduction of glioblastoma growth and induction of senescence.<sup>36</sup> In contrast, 41 proteins were upregulated in the control cells and the C6 cells treated with lower concentrations of PC inhibitor (50 and 100  $\mu\text{M}$ ), corresponding to cluster 2. Such upregulated proteins include *PDS5B* (*PDS5B*) and Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit (*RAB3GAP2*), proteins that are implicated in cell proliferation, and C-type mannose receptor 2 (*MRC2*) protein, which mediates tumor cell invasion. We also identified *SMAD3*, which is a transcription factor known to be activated after TGF- $\beta$  binding on its receptor. *SMAD3* regulates the expression of target genes involved in angiogenesis, cancer cell migration, and immunosuppression. CD14 was also found to be upregulated in C6 cells untreated or treated with low doses of PC inhibitor. CD14-high cancer cells express higher levels of inflammation mediators and form larger tumors. All of these proteins are downregulated after treatment of the C6 glioma cells with the PC inhibitor at 150  $\mu\text{M}$ . Taken together, 150  $\mu\text{M}$  PC inhibitor seems to prevent the induction of an anti-inflammatory environment by the cancer cells. Subnetwork analyses (Figure 2C) confirmed that proteins involved in neoplasia, cell invasion, and cancer are downregulated for a concentration of 150  $\mu\text{M}$  PC inhibitor.

The same approach was then applied to the conditioned medium of C6 glioma cells treated with the PC inhibitor to analyze the secreted factors (Figure 3). The proteomic analysis yielded a total of 1,101 proteins identified across all samples, and none was specific to one concentration of inhibitor (Figure S4B). Ninety-five proteins were statistically significant between the PC inhibitor-treated C6 cells and the untreated C6 cells with a  $p$  value of 0.05. Twenty-six proteins were upregulated in the untreated control cells when compared to treated ones, while 69 proteins were significantly upregulated after PC inhibitor stimulation (Figure 3A; Data S3). In the control condition, proteins commonly found in the tumor microenvironment and involved in tumor cell migration, tumor growth, and metastasis were identified, which included the connective tissue growth factor

(*CTGF*), chondroitin sulfate proteoglycan 4 (*CSPG4*), and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 (*ADAMTS1*). Macrophage colony-stimulating factor 1 (*CSF1*) protein, which has a key role in the recruitment and pro-tumoral activation of macrophages, was shown to be highly secreted by the control C6 glioma cells. Some pro-tumoral proteins were also found such as anamorsin (*CIAPIN1*), ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 (*USP7*), and cartilage oligomeric matrix protein (*COMP*). Subnetwork pathway analyses of cluster 1 confirmed pathways involved in neoplasia and cell migration (Figure 3B). All of these proteins and their corresponding pathways (Figure 3B) were less secreted in the presence of the inhibitor at any concentration used. The second cluster groups all proteins that are more secreted in the presence of the PC inhibitor. Among these, we can find some proteins involved in viral reproduction (interleukin enhancer-binding factor 3 [*ILF3*]) and immune response (heat shock protein 90 alpha family class B member 1 [*HSP90AB1*], *PRDX1*). Proteins thioredoxin-like 1 (*TXNLI*), thioredoxin (*TXN*), and the peroxiredoxin family members (*PRDX1*, *PRDX2*, and *PRDX5*) reflect an oxidative stress state of the cells caused by the PC inhibitor. Pathways involving immune response activation and oncogenesis decrease have been identified (Figure 3B).

In conclusion, the inhibitor impacts the C6 glioma cells by reducing their tumorigenesis potential. These results are in line with our previous work showing that the tumorigenesis of ovarian and prostate cancers is inhibited by PACE4 silencing.<sup>44</sup> The inhibitor may, therefore, have an effect on several PCs involved in several cancer types.

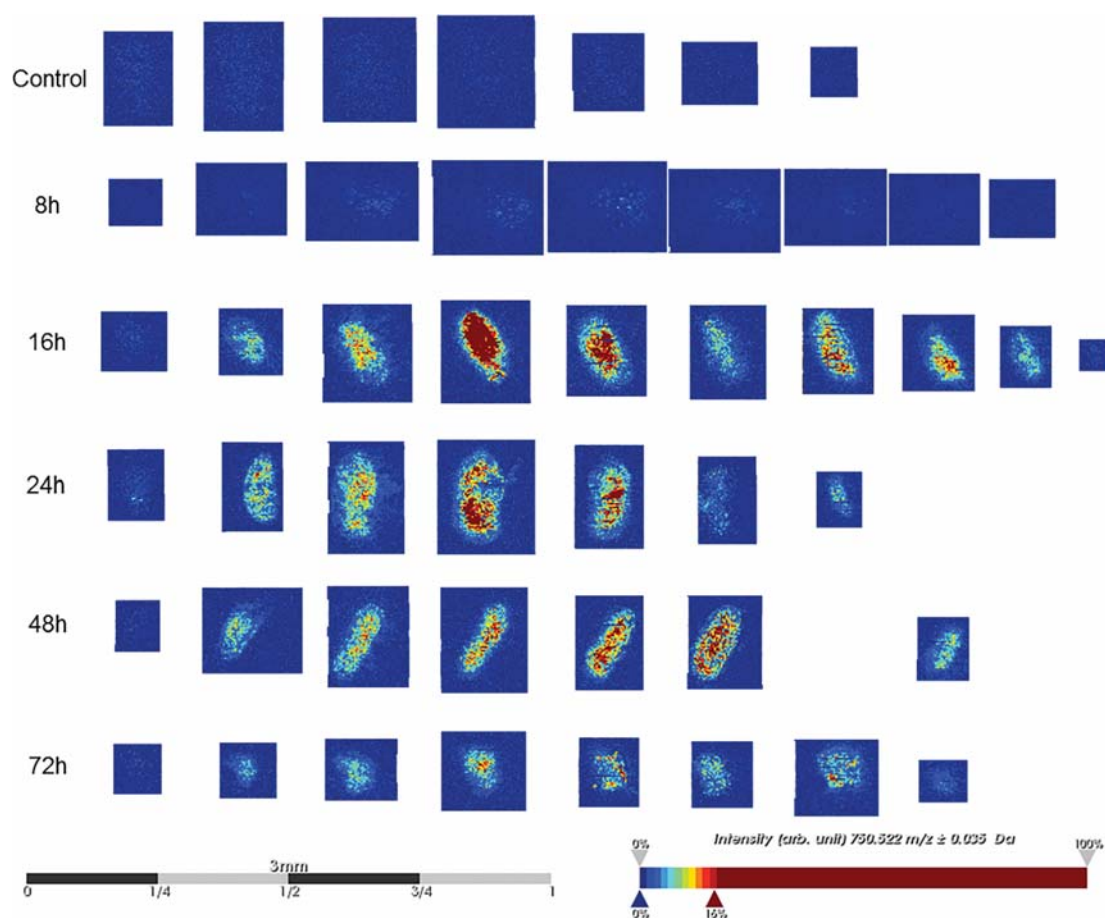
### The PC Inhibitor Decreases the Invasion of 3D Mixed Glioma and Macrophage Spheroids

In order to go deeper into the characterization of the effects of the inhibitor on glioma growth, we tested it on 3D micro-tumors. First, we evaluated the distribution of the PC inhibitor in C6 glioma spheroids. Glioma spheroids were treated with 100  $\mu$ M inhibitor at different time points (8–72 h). Consecutive sections of each spheroid were analyzed to study the distribution of the inhibitor across the entire spheroid. As shown in Figure 4, the PC inhibitor (mass-to-charge ratio [*m/z*] of 750.5) was detected predominantly into the core region of the spheroids after 16 h of treatment, while no drug signal was observed after 8 h of treatment and in the control, untreated sample. We could observe a slight decrease in the signal at 48 h and a marked decrease at 72 h. Then, we assessed the effects of the inhibitor on the growth and invasion of the cancer cells in 3D. The spheroids were cultured for 4 days in the presence or absence of 50, 100, or 150  $\mu$ M PC inhibitor. Their growth and the invasion of the matrix by cells migrating out the initial core were monitored during these 4 days.<sup>18,45</sup> Spheroids containing only C6 cells (Figure 5Ai) were compared to spheroids containing a mix of C6 and NR8383 cells (Figure 5Aii) to assess the tumor-supportive effects of macrophages as reported in the literature.<sup>15,46</sup> For C6 spheroids treated with PC inhibitor, blockage of spheroid growth and invasion started after 2 days of treatment and increased progressively across time (Figure 5Bi). This was observed for all concentrations of PC inhibitor tested. However, this effect was not concentration-dependent since the various concentrations applied gave the same magnitude

of inhibition (Table S2). It reached a maximum of 18% on the second day and a maximum of 54.2% on the fourth day. As depicted in Figure 5Bii, in the absence of PC inhibitor treatment, the presence of macrophages did not prevent the spheroids from growing. Conversely, a reduction of spheroid growth and invasion was again observed after the addition of PC inhibitor. Similar to the C6 spheroid, it also started after 2 days of treatment, it intensified in a time-course experiment, it was identical for the various concentrations tested, and it was not concentration-dependent. However, in the presence of macrophages, the magnitude of inhibition exerted by PC inhibitor was slightly less significant. It reached a maximum of 13.4% the second day and a maximum of 43.8% the fourth day. These data suggest that macrophages may exert a slight protective effect on C6 cells against PC inhibitor since the invasion of cancer cells is a bit enhanced in the presence of macrophages. However, the inhibitor still exerts its activity. Altogether, this revealed that PC inhibitor is effective to block spheroid growth and invasion, even in the presence of macrophages.

### The PC Inhibitor Reactivates Macrophages in Mixed Spheroids

A proteomic study was conducted on C6 and mixed C6/NR8383 spheroids in order to decipher the molecular impact of the PC inhibitor on the C6 glioma cancer cells and macrophages in a tumor microenvironment interaction. Spheroids were treated with 100  $\mu$ M PC inhibitor for different time points (8, 16, and 72 h). Shotgun proteomic analysis yielded 1,299 protein identifications across all samples. 95 proteins were exclusive to the untreated C6 spheroids and 132 to the untreated mixed spheroids (Figure S5A). These proteins are implicated in different biological processes of tumorigenesis such as positive regulation of cell migration, as well as positive regulation of cell proliferation and the mitotic cell cycle (Figure S5B). Additionally, syntenin-1 positively regulates TGF- $\beta$ 1-mediated SMAD2/3 activation.<sup>47</sup> Fourteen proteins were exclusively expressed by mixed spheroids after 72 h of stimulation with PC inhibitor. Among these proteins, TRPV2 is implicated in inflammatory processes and is essential to macrophage functions.<sup>48</sup> Adam17 (a substrate of PC1/3) has been described as responsible for cleavage of IL-6R, TNF $\alpha$ , and pro-inflammatory factors.<sup>49</sup> In addition, *GpnmB* has been found in macrophages upon induction by IFN- $\gamma$  or lipopolysaccharide (LPS) and was described as a regulator of the pro-inflammatory response.<sup>50</sup> We then created two heatmaps (Figures 6A and 6B). Figure 6A represents the heatmap of the 146 proteins that showed a significant difference in LFQ expression between untreated C6 spheroids and C6 spheroids after 72 h of PC inhibitor. Figure 6B represents the heatmap with 187 proteins statistically significant between PC inhibitor-treated mixed spheroids and control mixed spheroids. A difference of protein expression is only observed after 72 h of PC inhibitor treatment for both types of spheroid. Two clusters can be highlighted for both heatmaps. 59 proteins for C6 spheroids (cluster 1, Figure 6A; Data S4) were found in the tumor microenvironment and involved in cell migration and invasion, similar to LAP3, up-regulated in glioma or Namp1, known to be involved in M2 orientation and Eef1g, which has been described with a pro-tumorigenic role in brain tumor but also in liver, kidney, and prostate.<sup>51–53</sup> In a same way, 91 proteins for C6/macrophage spheroids were found to be down-regulated in cluster 1 at 72 h (Figure 6B; Data S5). Among these proteins,



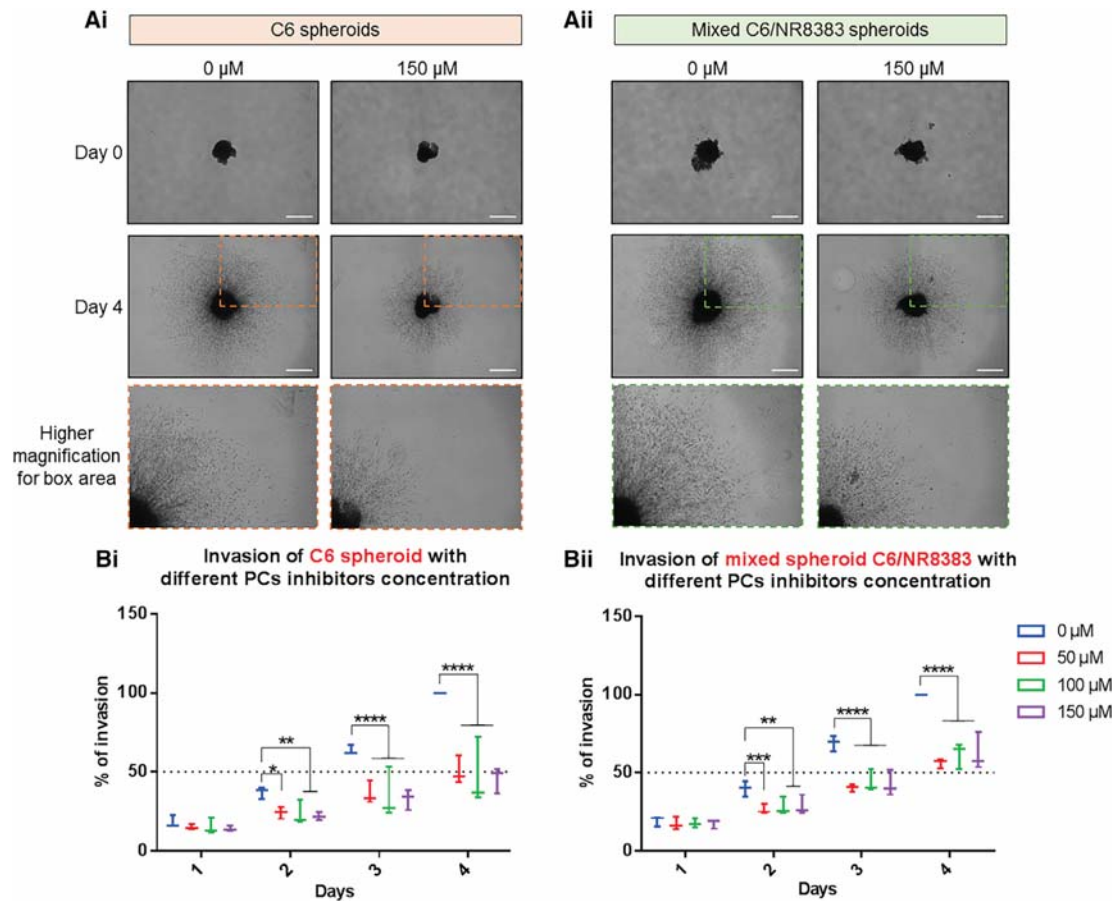
**Figure 4. PC Inhibitor Was Found at the Core of Mixed C6/NR8383 Spheroids at 16 h of Stimulation until 72 h**

Mixed C6/NR8383 spheroids were treated with 100  $\mu$ M PC inhibitor or with DMSO (control) for different times. Then, they were fixed, frozen, and entirely cut. Lipid images were acquired using a RapiFlex II MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) instrument at 10- $\mu$ m lateral resolution and spectra were exported in SCI.LS Lab version 2015b software. PC inhibitor is represented by an  $m/z$  of 750.522. Each row represents the different stimulation time. Each column represents a different slice of the spheroid, from the beginning on the left to the end on the right.

nestin expression is related to poor prognosis in high-grade gliomas, and ACLY (ATP citrate lyase) has been described as a positive regulator of glycolysis in glioblastomas.<sup>54,55</sup> Likewise, knocking down nucleolin expression in glioma decreased tumor growth and triggered cell cycle arrest.<sup>56</sup> Proteins involved in the inflammatory response and macrophage orientation were also found in this cluster. ROCK2 inhibition seems to decrease M2-like macrophage orientation, and PDLIM1 acts as an inhibitor of NF- $\kappa$ B-mediated inflammation.<sup>57,58</sup> Some proteins were found in cluster 1 for both C6 spheroids and mixed C6/macrophage spheroids. Plod1 and Plod2 modulate collagen cross-linking and maturation and thereby contribute to cancer progression.<sup>59</sup> Lrrfp1, an inhibitor of NF- $\kappa$ B signaling, has been described as a potential target gene for anti-glioma therapy.<sup>60</sup> All of these proteins involved in cancer progression and in the maintenance of tumor microenvironment were under-expressed after 72 h of PC inhibitor treatment (Figure 6C). Alternatively, 87 proteins were found upregulated in cluster 2 for C6 spheroids (Figure 6A). Among these proteins, tenascin-R has

been found in low-grade glioma with non-invasive behavior. A decrease in tenascin-R expression is correlated with increasing malignancy. In fact, grade IV glioblastoma has a low level of tenascin-R expression.<sup>61</sup> Smad3, described before in proteomic analysis of C6 cells, was also found. In contrast, granulins have been described as an amplifier of acute inflammation and they stimulate the production of neutrophil-attracting chemokines.<sup>62</sup> Also, flotillin-1 could have a role in CXCR4-mediated T cell migration, adhesion, and signaling.<sup>63</sup> For mixed C6/macrophage spheroids, 92 proteins were found in cluster 2 (Figure 6B). Some markers of activated macrophages and pro-inflammatory response were identified like calectin-3 or Icam1 described as a suppressor of M2 macrophages orientation. Ccdc22, an activator of NF- $\kappa$ B signaling, was also found.<sup>64,65</sup> Eps8 protein, involved in phagocytosis by increasing TLR4-Myd88 interaction and Sdha protein, essential for pro-inflammatory polarization of macrophages, were both found in cluster 2 for C6 spheroids and mixed C6/macrophage spheroids,<sup>66,67</sup> as well as annexin A1, essential in the innate immune





**Figure 5. PC Inhibitor Decreases C6 and Mixed C6/NR8383 Spheroids Invasion**

C6 (i) and mixed C6/NR8383 (ii) spheroids were incubated with different concentrations of PC inhibitor (50, 100, 150  $\mu\text{M}$ ) or with vehicle (DMSO). Images of spheroids in the collagen matrix were taken every 24 h for 4 days. (A) Representative images of the invasion of C6 (i) spheroids and mixed C6/NR8383 (ii) spheroids in the collagen matrix incubated with DMSO or 150  $\mu\text{M}$  PC inhibitor at day 0 and day 4. All images were acquired with an inverted light microscope at  $\times 5$  original magnification. Scale bars, 500  $\mu\text{m}$ . (B) Graphic representation showing the percentage of spheroids invasion with different concentrations of PC inhibitor (0, 50, 100, or 150  $\mu\text{M}$ ). Spheroids invasion areas were acquired with in-house software. They are normalized for each day to the relative size of day 0 and transformed into the percentage of invasion. All results are representative of three independent experiments. Significant differences were identified using a Tukey's multiple comparisons test. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

response and inflammatory process and Lta4h, involved in the pro-inflammatory response. All of these immune and inflammatory-related proteins were overexpressed after 72 h of stimulation with PC inhibitor (Figures 6A and 6B). In conclusion, the mixed spheroids treated with the inhibitor are progressing toward a pro-inflammatory response.

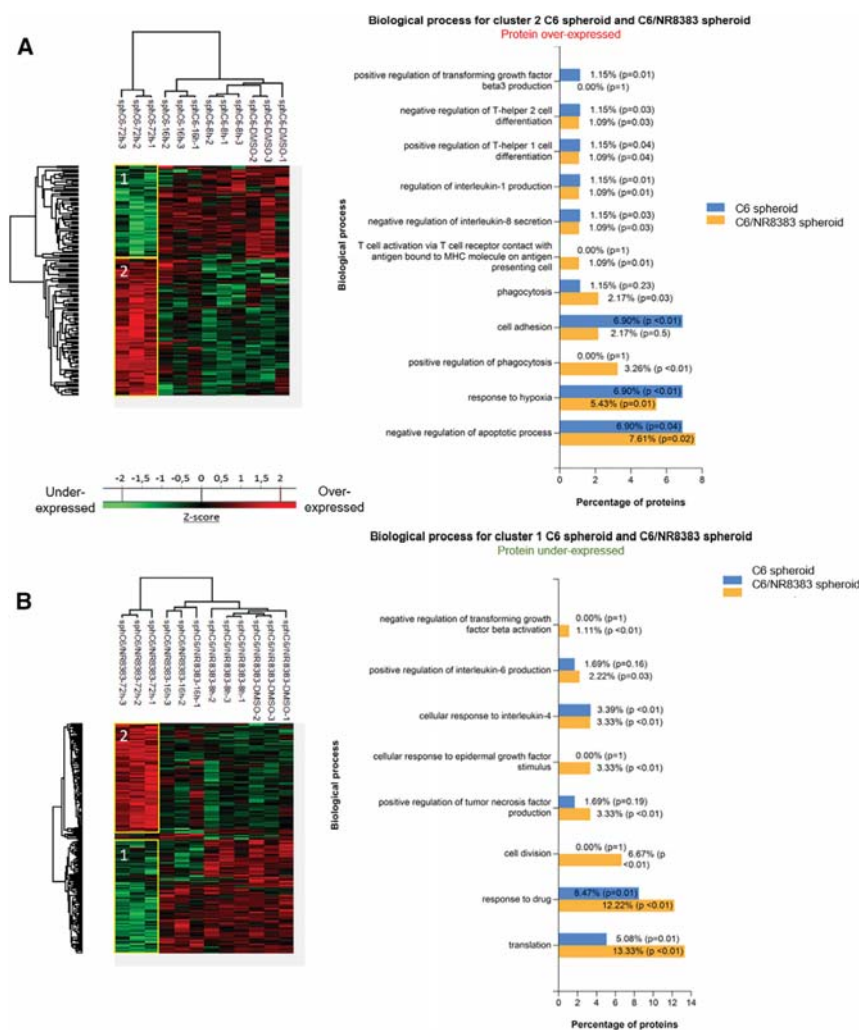
Taken together, based on these proteomics data, signaling pathways related to cancer are modulated under PC inhibition. Moreover, markers of the pro-inflammatory phenotype were also identified in the mixed spheroids condition after inhibitor treatment and can suggest the activation of macrophages.

In the same line, cross-analyses were performed between the identified proteins in C6/macrophages at 72 h after treatment and the 104 key genes that were shared between human glioblastoma multiforme (GBM) and lower-grade glioma (LGG), with significant

correlation with patients' survival. This selected list was based on next-generation sequencing data obtained from The Cancer Genome Atlas for gene expression analysis.<sup>68</sup> Four proteins have been identified in common (cathepsin B [CTSB], cathepsin Z [CTSZ], myosin 1C [MYO1C], and polymerase I transcript releasing factor [PTRF]) (Figure 7). CTSZ is identified from the list of 10 genes (CTSZ, EFEMP2, ITGA5, KDELR2, MDK, MICALL2, MAP2K3, PLAUR, SERPINE1, and SOCS3) that can potentially serve as indicators to estimate the prognosis of patients with gliomas.<sup>68</sup> This gene has been shown to be a good patient survival indicator between GBM and LGG.

#### The PC inhibitor Is More Effective Than TMZ in Reducing the Density of Glioma Cells and Inhibiting C6 Spheroid Growth and Invasion

TMZ is one of the main drugs used to treat high-grade gliomas.<sup>69</sup> Therefore, in the context of therapy, we wanted to compare the



**Figure 6. PC Inhibitor Triggers Molecular Changes in Protein Profiles of C6 Spheroid and Mixed C6/NR8383 Spheroids**

(A and B) C6 spheroids (A) and mixed C6/NR8383 spheroids (B) were treated with 100 μM PC inhibitor or with DMSO (control) and lysed before FASP and LC-MS/MS analysis. MaxQuant and Perseus software were used for the statistical analysis, and heatmaps were generated to show proteins that were significantly different between treated and untreated spheroids. Different clusters are highlighted. Biological process for clusters of spheroids C6 and C6/NR8383. The analysis was performed with FunRich.

respectively (Figure 8), of tumor growth. In comparison with TMZ, the magnitude of decrease of C6 cell density induced by the PC inhibitor was higher for all of the concentrations tested. Moreover, the IC<sub>50</sub> was reached after a challenge with 600 μM PC inhibitor. This demonstrated that a lower concentration of PC inhibitor was needed to diminish the density of glioma cells compared to TMZ.

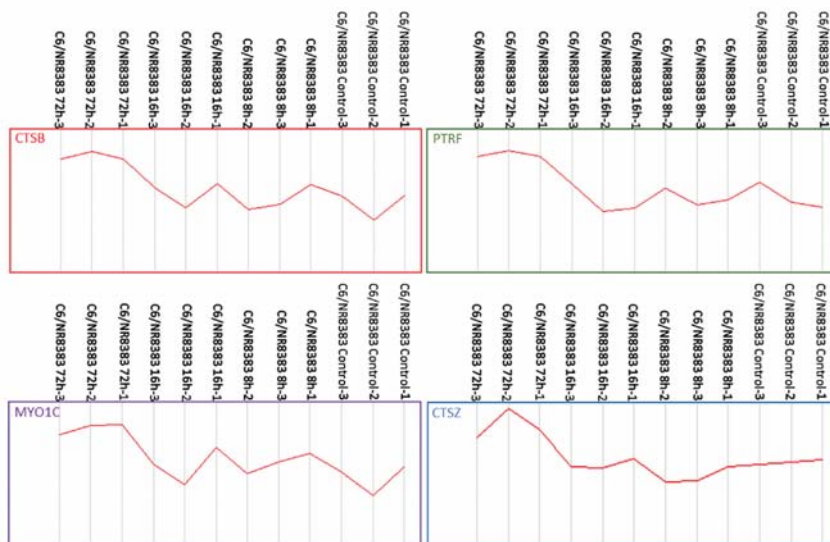
Next, we wanted to compare the effect of TMZ and PC inhibitor on spheroid growth and invasion after 4 days of treatment (Table 1). This experiment was conducted on spheroids containing only C6 cells and on spheroids containing a mix of C6 and NR8383 cells. For the PC inhibitor, we used a concentration of 100 μM since it was efficient to decrease C6 cell density and inhibit spheroid growth and invasion (Figures 2 and 6) without any effect of the DMSO on macrophage survival (Figure 1).

The concentration chosen for TMZ was 600 μM since it induced the more important decrease in C6 cell density (Figure 6A). PC inhibitor treatment led to a stronger diminution of C6 spheroid growth and invasion than with TMZ. Indeed, they were reduced by 52.34% with PC inhibitor challenge whereas they were decreased by 25.63% after TMZ treatment. On C6/NR8383 spheroids, the protective effect of macrophages to C6 cells against PC inhibitor was again observed since growth and invasion were only reduced by 38.38%. Conversely, the presence of macrophages did not drop the effect of TMZ since a diminution of 26.16% was found. However, at this concentration, we cannot exclude that DMSO impacted the physiology of macrophages. Altogether, this showed that PC inhibitor inhibited spheroid growth and invasion more efficiently than did TMZ.

## DISCUSSION

In the present study, we have demonstrated that the PC inhibitor acts on macrophage activation, as demonstrated by the proteomic study, without affecting their viability. Some pro-inflammatory phenotype markers were found to be secreted by macrophages after PC inhibitor

potency of TMZ and PC inhibitor to decrease C6 rat glioma cell density after 4 days of treatment (Figure 8). To determine their respective 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>s) *in vitro*, we performed dose-response studies. TMZ and PC inhibitor were dissolved in DMSO. Therefore, for each concentration tested, the same percentage of DMSO was added in control conditions. An inhibitory effect of this compound on C6 rat glioma cell density was only observed for the 600 μM condition. It reduced glioma cell density by 11.5%. This value was subtracted from the values obtained after the treatment of C6 cells with 600 μM TMZ or PC inhibitor (Figure 8). Therefore, only the direct effects exerted by each drug are represented in the graph. These data revealed that TMZ treatment significantly decreased C6 cell density at every concentration tested. The treatment with 100, 200, 400, and 600 μM TMZ induced a diminution of 13.4%, 16.1%, 25.2%, and 27%, respectively (Figure 8). Of note, the IC<sub>50</sub> was not attained even after a challenge with a higher concentration, such as 600 μM. The PC inhibitor also significantly reduced C6 cell density at each concentration used. The treatment with 100, 200, 400, and 600 μM PC inhibitor led to a decrease of 30.8%, 25.8%, 47.5%, and 50.2%,



**Figure 7. PC Inhibitor Increases the Expression of Biomarkers Related to Glioma Survival in Mixed C6/NR8383 Spheroids**

Mixed C6/NR8383 spheroids were treated with 100  $\mu$ M PC inhibitor for different times (8, 16, and 72 h) or with DMSO (control) and lysed before FASP and LC-MS/MS analysis. MaxQuant and Perseus software were used for the statistical analysis. Graphs represent LFQ intensities showing expression of cathepsin B (CTSB), polymerase I and transcript release factor (PTRF), unconventional myosin-Ic (MYO1C), and cathepsin Z (CTSZ) between mixed C6/NR8383 spheroids treated or not with PC inhibitor are shown. The genes are involved in GBM and LGG patients' survival. All of these proteins are overexpressed after 72 h of treatment with PC inhibitor.

treatment, such as CCL6 and PRDX5, suggesting that the inhibitor was also able to induce the activation of macrophages as previously described for the NR8383 PC1/3 KD macrophages.<sup>19</sup> Moreover, some of the factors secreted by the PC inhibitor-treated macrophages have anti-tumoral effects. For example, FKBP1A, known to have anti-tumoral properties, has been detected.<sup>35</sup> The inhibitor seems to orient macrophages toward an anti-tumoral phenotype. Interestingly, the combination of the PC inhibitor and the factors secreted by PC inhibitor-treated macrophages seems to have a cumulative effect by inhibiting C6 glioma cell viability. In addition to influencing macrophages, the inhibitor presents a strong anti-proliferative activity toward the C6 glioma cells directly. It decreases their viability already at 50  $\mu$ M. The C6 cells are deeply affected by the inhibitor since their intracellular and secreted protein profiles are completely different. In fact, proteins related to cell growth and viability are downregulated. Some anti-tumoral factors are produced by the glioma cells in the presence of PC inhibitors such as latexin, or angiogenesis inhibitors such as UNC95B. Additionally, factors known to be involved in tumor cell migration, tumor growth, and metastasis, such as CTGF, CSPG4, and ADAMTS1, are under-expressed in C6 glioma cells such as some pro-tumoral factors, including CIAPIN1, USP7, and COMP. Proteins involved in immune cell recruitment and activation and extracellular matrix remodeling are also less secreted in the presence of the inhibitor. In fact, CSF1 protein is produced by tumor cells and released in the tumor microenvironment where its main role is the recruitment of macrophages and the promotion of their pro-tumoral phenotype.<sup>15</sup> The production of this protein is inhibited in C6 glioma cells under PC inhibitor treatment. Therefore, the inhibitor may modulate the glioma cell microenvironment by regulating the secretion profile of tumor cells. These results suggest that the inhibitor may act both on cancer cells and macrophages in an anti-cancer therapeutic strategy.

Furthermore, a time course proteomic study was realized on C6 and mixed C6/NR8383 spheroids treated or not with the PC inhibitor.

This study allowed us to decipher the molecular impact of the PC inhibitor on C6 glioma cancer cells and macrophages in a tumor microenvironment interaction. In this context, the cross-analyses between all proteomic studies revealed a clear differentiation between C6/macrophages treated with the PC inhibitor at 72 h from the other conditions (Figure 6). FunRich analyses have confirmed the presence of specific proteins involved in immune response reactivation such as Th1 cell activation, phagocytosis, and T cell activation via major histocompatibility complex (MHC) presentation. In the same way, compared to C6 alone, C6/macrophage spheroids present a decrease in cell adhesion, response to hypoxia, and no regulation to TGF- $\beta$ 3 production, confirming the reactivation of the immune cells in the tumor microenvironment. *CTSZ* and *PLAUR* were also identified in the mixed spheroids and can potentially serve as indicators to estimate the prognosis of patients with gliomas.<sup>68</sup> These two genes have been shown to be good patient survival indicators between GBM and LGG.

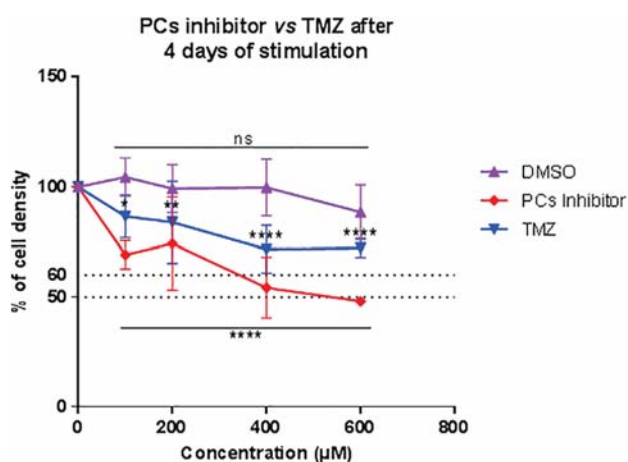
Collectively, in this work, we have established that the PC inhibitor exerts a dual activity at the same time by its anti-tumoral effect on glioma cells and its ability to switch macrophages to an anti-tumoral phenotype. In this way, we can imagine controlling at a distance macrophage reactivation by using a combination of the PC inhibitor and TLR agonists as previously demonstrated.<sup>17,18,20</sup>

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental Design and Statistical Rationale

Shotgun proteomics experiments were conducted in biological triplicates ( $n = 3$ ). Spheroid studies were conducted in biological triplicates ( $n = 3$ ), as were all biological assays. For the proteomics statistical analysis, extracted proteins or secreted media proteins presenting as significant by the ANOVA test analysis were used ( $p < 0.05$ ). Normalization was achieved using a Z score with matrix access by rows. For cell density and invasion tests, results obtained were depicted through a boxplot figure. Significant differences were identified using a





**Figure 8. A Lower Concentration of PC Inhibitor Is Needed to Decrease C6 Cell Density Compared to Temozolomide**

The cell density of C6 rat glioma cells was determined by an MTS assay after 4 days of stimulation with different concentrations of PC inhibitor or temozolomide (TMZ) (100, 200, 400, and 600 µM). All results are representative of three independent experiments. Significant differences were identified using Tukey's multiple comparisons test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . ns, not significant. The cell density of NR8383 cells was determined by an MTS assay for 48, 72, and 96 h with 300 µM PC inhibitor and 600 µM TMZ.

Tukey's multiple comparisons test (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ ).

### Chemicals and Reagents

Water (H<sub>2</sub>O), formic acid, acetonitrile (ACN), and trifluoroacetic acid (TFA) were obtained from Biosolve (Dieuze, France). 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), a ProteoMass MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) calibration kit, DL-dithiothreitol (DTT), thiourea, TMZ, PC inhibitor (ref. 537076), and iodoacetamide were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Lys-C/trypsin was purchased from Promega (Charbonnières, France). Polylysine-coated slides, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Ham's F12K medium, heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), trypsin, phosphate-buffered saline (PBS), and penicillin and streptomycin were purchased from Thermo Scientific (Braunschweig, Germany). NR8383 is a rat alveolar macrophage cell line (CRL-2192) obtained from the ATCC (USA). The rat C6 glioma cell line was kindly provided by Dr. Bernd Kaina (Institute of Toxicology, University Medical Center, Mainz, Germany).

### Cell Culture

Rat alveolar wild-type NR8383 macrophages<sup>19</sup> were cultured in Ham's F12K medium supplemented with 15% FBS and 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL). Human THP1 macrophages were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine (2 mM), and 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL). Rat glioma C6 cells were cultured in DMEM and supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine (2 mM), and 1% penicillin/strepto-

**Table 1. PC Inhibitor Is More Efficient than Temozolomide (TMZ) on the Spheroid Invasion Decrease**

	Mean of the Percentage of Invasion after 4 Days of Stimulation	
	100 µM PC Inhibitor	600 µM TMZ
C6 spheroids	47.66% ± 16.41%	74.37% ± 9.06%
	$p < 0.0001$	$p = 0.0037$
Mixed C6/macrophages spheroids	61.62% ± 6.41%	73.84% ± 5.49%
	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$

C6 and mixed C6/NR8383 spheroids were incubated with 100 µM PC inhibitor or with 600 µM TMZ. All images were acquired with an inverted light microscope at ×5 original magnification. The percentages of spheroids invasion are shown. All results are representative of three independent experiments. Significant differences were identified using a Tukey's multiple comparisons test. PC, proprotein convertase; TMZ, temozolomide.

mycin (100 U/mL). All cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>).

### RNA Extraction and PCR

The RNA of NR8383 macrophages and C6 glioma cells were extracted with TRIzol reagent. 1 µg of RNA was reverse transcribed and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out to determine the expression of PCs. The primers used were as follows: (1) actin, forward 5'-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3', reverse 5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3', (2) PC1/3, forward 5'-TTGGCTGAAAGGGAAAGG-3', reverse 5'-ATCTTTGATGATTGCTTTG-3', (3) furin, forward 5'-CTATGGCTACGGCTGTTGG-3', reverse 5'-CCTCGCTGGTATTTTCAATCTC-3', (4) PACE4, forward 5'-TATGGATTTGGCTTGGTGGATG-3', reverse 5'-GGCTCCATCTTTCAACTTTCC-3', (5) PC4, forward 5'-CTTGTGGCCATCAGACCCTTG-3', reverse 5'-GAACAGGCA GTGTAGTCGCTG-3', and (6) PC5/6, forward 5'-AGTGCCTC CATCTACAAAGC-3', reverse 5'-GTCAGTGCAGTGATCCGGT C-3'.

### Cell Supernatant Collection and Total Protein Extraction

NR8383 and C6 cells were plated on sterile 24-well plates and cultured until they reached confluence. THP1 was plated on sterile six-well plates and differentiated with 10 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 24 h. For stimulation, cells were starved overnight in Ham's F12K medium, DMEM, or RPMI 1640 medium supplemented with 2% FBS. Cells were then stimulated in a serum-free medium with different concentrations of PC inhibitor (50, 100, or 150 µM) with or without DMSO. At 24 h, cell supernatants were centrifuged at 500 × g and passed through a 0.22-µm filter to remove cells and debris. Four hundred microliters of the cell supernatant was collected for each condition. Cells were washed three times with ice-cold PBS and then lysed with radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer for total protein extraction (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 1 mM PMSF, and 1× protease inhibitors). After three 30-s sonications, cell debris was removed by centrifugation (16,000 × g, 10 min, 4°C), supernatants were collected, and protein

concentrations were measured using a Bio-Rad protein assay kit, according to the manufacturer's instructions.

#### Filter-Aided Sample Preparation

The samples were processed using a shotgun bottom-up proteomic approach. Total protein extract (0.04 mg) was used for filter-aided sample preparation (FASP) digestion as described previously.<sup>70–72</sup> We performed FASP using Microcon YM-10 devices (Millipore) before adding Lys-C trypsin (Promega) for protein digestion (40 µg/mL in 0.05 M Tris-HCl). An equivalent volume of reduction solution (0.1 M DTT) was added to each sample followed by an incubation step at 95°C for 15 min. Then the samples were processed following the FASP protocol using a filter with a nominal molecular mass limit of 10,000 Da (Amicon Ultra-0.5 10K, Millipore). Briefly, each sample was mixed with 200 µL of denaturant buffer (8 M urea, 0.1 M Tris/HCl [pH 8.5]) and transferred to FASP filters. The samples were centrifuged at 14,000 × g, 20°C, for 15 min. For the alkylation step, 100 µL of 0.05 M iodoacetamide in denaturant buffer was added to each sample, followed by incubation in the dark for 20 min at room temperature. Samples were washed twice with 100 µL of denaturant buffer followed by two washes with 100 µL of 0.05 M ammonium bicarbonate (AB) buffer. After each washing step, centrifugation was performed at 14,000 × g, 20°C, for 15 min. The proteins were digested by adding 40 µL of trypsin at 40 µg/mL in AB buffer and then incubated at 37°C overnight. The peptides were eluted by adding 50 µL of saline solution (0.5 M NaCl) and centrifuged at 14,000 × g, 20°C, for 15 min. The digestion was stopped by adding 10 µL of 5% TFA. The samples were desalted using ZipTip C-18 (Millipore) and eluted with a solution of ACN/0.1% TFA (7:3, v/v). The samples were dried with a SpeedVac and resuspended in 20 µL of ACN/0.1% formic acid (0.2:9.8, v/v) just before processing using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Experiments were done in biological triplicates (n = 3).

#### Proteomics Analysis of Cell Supernatants

Supernatant volumes obtained from the NR8383 and THP1 macrophages and C6 cells treated with PC inhibitor or DMSO were reduced to 100 µL in a SpeedVac. Cell supernatants were denatured with 2 M urea in 10 mM HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid) (pH 8.0) by sonication on ice. The proteins were reduced with 10 mM DTT for 40 min at 56°C followed by alkylation with 55 mM iodoacetamide for 40 min in the dark. The iodoacetamide was quenched with 100 mM thiourea. The proteins were digested with 1 µg Lys-C/trypsin mixture (Promega) overnight at 37°C. The digestion was stopped with 0.5% TFA. The samples were desalted using ZipTip C-18 (Millipore) and eluted with a solution of ACN/0.1% TFA (7:3, v/v). The samples were dried with SpeedVac and resuspended in 20 µL of ACN/0.1% formic acid (0.2:9.8, v/v) just before processing using LC-MS/MS. Experiments were done in biological triplicates (n = 3).

#### LC-MS/MS Analysis

Mass spectrometry proteomics analysis of digested proteins was performed using a nanoAcquity UPLC (ultra-performance LC) system

(Waters) coupled with the Q Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific) via a nanoelectrospray source. The samples were separated by means of online reversed-phase LC chromatography, using a preconcentration column (nanoAcquity Symmetry C18, 5 µm, 180 µm × 20 mm) and an analytical column (nanoAcquity BEH C18, 1.7 µm, 75 µm × 250 mm). The peptides were separated by applying a linear gradient of ACN in 0.1% formic acid (5%–35%) for 2 h, at a flow rate of 300 nL/min. The Q-Exactive instrument was operated in a data-dependent mode defined to analyze the 10 most intense ions of MS analysis (top 10). The MS analysis was performed with an *m/z* mass range between 300 and 1,600, a resolution of 70,000 full width at half maximum (FWHM), an automatic gain control (AGC) of 3e6 ions, and a maximum injection time of 120 ms. The MS/MS analysis was performed with an *m/z* mass range between 200 and 2,000, an AGC of 5e4 ions, a maximum injection time of 60 ms, and a resolution set at 17,500 FWHM.

#### Protein ID and Data Analysis

Proteins were identified by comparing all MS/MS data with the proteome database of the complete reviewed proteome of *Rattus norvegicus* (UniProt: R2018\_07, release July 2018, 8,054 entries), using MaxQuant software version 1.6.1.0.<sup>73,74</sup> Lys-C trypsin specificity was used for the digestion mode with two missed cleavages. The carbamidomethylation of cysteines was set as a fixed modification. N-terminal acetylation and methionine oxidation were selected as the variable modifications. For MS spectra, an initial mass tolerance of 6 ppm was selected, and the MS/MS tolerance was set to 20 ppm for higher energy collisional dissociation (HCD) data.<sup>75</sup> For identification, the false discovery rate (FDR) at the peptide spectrum matches (PSMs) and protein level was set to 0.01. Relative, label-free quantification of proteins was performed using the MaxLFQ algorithm integrated into MaxQuant with the default parameters.<sup>76</sup> Analysis of the proteins identified was performed using Perseus software (version 1.6.2.1, <http://www.perseus-framework.org/>).<sup>77</sup> The file containing the information from identification was used with hits to the reverse database, and proteins identified with modified peptides and potential contaminants were removed. Then, the LFQ intensity was logarithmized ( $\log_2[x]$ ). Categorical annotation of rows was used to define different groups depending on the concentration of the PC inhibitor used (0, 50, 100, or 150 µM). Multiple-sample tests were performed using an ANOVA test with a *p* value of 0.05 and preserved grouping in randomization. The results were normalized by *Z* score and represented as hierarchical clustering. Functional annotation and characterization of identified proteins were obtained using PANTHER software (version 14.0, <http://www.pantherdb.org>) and STRING (version 10.5, <http://string-db.org>).

#### Sub-network Enrichment Pathway Analysis

Using Elsevier's Pathway Studio (version 11.0), all relationships between the differentially expressed proteins among all conditions were depicted based on the Ariadne ResNet.<sup>78</sup> For proteins identified in the shotgun analysis after stimulation of cell lines with the PC inhibitor, the subnetwork enrichment analysis (SNEA) algorithm was used to detect the statistically significant altered biological pathways



in which the identified proteins are involved. This algorithm uses a Fisher's statistical test to detect any non-random associations between two categorical variables organized by a specific relationship. Also, this algorithm starts by creating a central "seed" from all of the relevant identities in the database and builds connections with associated entities based on their relationship with the seed. SNEA compares the sub-network distribution to the background distribution using a one-sided Mann-Whitney U test and calculates a p value, thereby representing statistical significance between different distributions. In all analyses that we performed, the GenBank ID was used to form experimental groups based on the different conditions present for analysis. The pathway networks were reconstructed based on biological processes and molecular functions for every single protein, along with its associated targets.

#### **Data and Software Availability**

Cancer cell and macrophage proteomics data, including MaxQuant files and annotated MS/MS, have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD014679 (user name, [reviewer94484@ebi.ac.uk](mailto:reviewer94484@ebi.ac.uk); password, gb85XYvq).

#### **Biological Assays**

##### **Generation of NR8383 Supernatants**

NR8383 macrophages were treated with or without 100  $\mu$ M PC inhibitor in complete Ham's F12K medium for 24 h. At 24 h, cell supernatants were centrifuged at  $200 \times g$  and passed through a 0.22- $\mu$ m filter to remove cells and debris. Supernatants were then used for C6 stimulation.

##### **Cell Density Measured by MTS Assay**

C6 or NR8383 cells were seeded into 96-well plates at 30% confluence with different concentrations of the PC inhibitor (0, 0.5, 1, 10, 50, 100, 150, 200, and 400  $\mu$ M) or with different concentrations of TMZ (0, 100, 200, 400, and 600  $\mu$ M) or with an equal volume of DMSO. Also, C6 glioma cells were seeded into 96-well plates at 30% confluence with NR8383 supernatants obtained after 24 h of PC inhibitor or DMSO stimulation. These supernatants were supplemented or not with 100  $\mu$ M PC inhibitor. The assay was observed at 24, 48, 72, or 96 h. CellTiter 96 AQueous One Solution cell proliferation reagent (Promega, Madison, WI, USA) was added to the wells and incubated at 37°C for 1 h protected from light. The absorbance was recorded at 490 nm using a 96-well plate reader. Absorbance values were normalized for each day to the absorbance values measured at day 0 and expressed in percentage of viability. Experiments were performed in biological triplicates ( $n = 3$ ).

##### **Spheroid Generation and Embedding in a Collagen Matrix**

C6 rat glioma cells associated with or without NR8383 cells were re-suspended in complete Ham's F12K medium supplemented with 5% of a collagen mixture at the final concentration of 8,000 cells of each cell line in 20  $\mu$ L. The collagen mixture was prepared by mixing 2 mL of PureCol bovine collagen type I solution (3 mg/mL; Advanced Bio-Matrix) with 250  $\mu$ L of  $10 \times$  minimal essential medium (MEM)

(Sigma- Aldrich) and 500  $\mu$ L of 0.1 M sodium hydroxide. Cells were cultivated using the hanging drop technique on the lid of a Petri dish with PBS during 72 h at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>). The newly formed C6 spheroids and mixed C6/NR8383 spheroids were then implanted in the center of each well of a 24-well plate coated with a collagen mixture described before (one spheroid per well in 400  $\mu$ L of collagen mixture per well). After cell spheroid embedding, the plate was incubated for 30 min at standard culture conditions to solidify the collagen. After that, 400  $\mu$ L of complete Ham's F12K medium with different concentrations of the PC inhibitor (50, 100, and 150  $\mu$ M) was overlaid on the collagen matrix in each well. The complete system was incubated for a total of 4 days. Experiments were performed in biological triplicates ( $n = 3$ ).

#### **Quantification of Spheroid Size and Invaded Area**

After the spheroids were embedded, cell invasion of the spheroid was monitored by digital photography using a Leica DM IL LED Fluo inverted light microscope (Leica DFC450C camera) at room temperature, with the Leica Application Suite (LAS, version 4.4). Images were acquired every day (day 0 represents time of embedding in collagen; images were taken immediately after embedding) using a  $4 \times / 0.10$  objective. Image processing and quantification of spheroids and invasion areas were performed using in-house software. This in-house software takes into account cell density and not the limits of cell migration in the collagen matrix, which is observed independently. The implemented algorithm uses local fluctuations of the image intensity for automated estimation of the invasion magnitude. It is robust enough to handle micrographs of different generation methods and various qualities without the concept of an invasive front of the spheroids.<sup>18,45</sup> Data on areas are normalized for each day to the relative size of day 0 and transformed into the percentage of invasion.

#### **MALDI Mass Spectrometry Imaging (MSI) and LC-MS/MS**

##### **Analysis of Spheroids**

Mixed C6/NR8383 spheroids were generated as described before. Spheroids were treated with 100  $\mu$ M PC inhibitor for 8, 16, 24, 48, and 72 h. After stimulation, they were rinsed with PBS before fixation with 4% paraformaldehyde during 1 h at 4°C and then washed three times in PBS. They were implanted in 175 mg/mL gelatin and frozen at  $-20^\circ\text{C}$  and  $-80^\circ\text{C}$ . The entire spheroids were cut into 8- $\mu$ m sections using a cryostat (Leica Microsystems, Nanterre, France). Sections, obtained after every 40  $\mu$ m (approximately), were subjected to MSI. These were mounted by finger-thawing on indium tin oxide (ITO)-coated slides. DHB was used as a matrix and was prepared at a concentration of 20 mg/mL in 70:30 methanol/0.1% TFA in H<sub>2</sub>O. Eight layers of the matrix were deposited using HTX TM-Sprayer (HTX Technologies, Chapel Hill, NC, USA) programmed to spray at a flow rate of 0.125 mL/min. Lipid imaging was performed on a rapifleX MALDI Tissue typer instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The instrument was equipped with a smartbeam 3D laser and was controlled using FlexControl version 4.0 software (Bruker Daltonics). The datasets were recorded in positive reflector mode, and 300 laser shots were accumulated for each raster point

at a laser frequency of 10 kHz. Spectra were acquired at a lateral resolution of 10  $\mu\text{m}$ . External calibration was performed using the Pep-Mix standard (Bruker Daltonics). Spectra were acquired between an  $m/z$  of 500 and 1,300. For reconstruction of images, the SCiLS Lab software version 2015b (SCiLS, Bremen, Germany) was used.<sup>79,80</sup> The data were normalized based on the total ion count (TIC) method.<sup>81</sup> For proteomic analysis, C6 and mixed C6/NR8383 spheroids were stimulated with 100  $\mu\text{M}$  PC inhibitor for 8, 16, and 72 h. After stimulation, they were washed three times in PBS. Then, total protein extraction and FASP digestion were performed as described above before the LC-MS/MS analysis.

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.03.005>

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, F.R. and M.S.; Methodology, M.D., F.R., M.R., and M.S.; Validation, M.D. and M.R.; Formal Analysis, M.S., F.R., and M.D.; Resources, M.S. and I.F.; Data Curation, M.D., M.S., S.A., F.R., and M.R.; Writing, M.D., M.S., F.R., and M.R.; Writing – Original Draft, M.S. and M.D. Writing – Review & Editing, M.S., M.D., F.R., and I.F.; Supervision, F.R. and M.S.; Project Administration, M.S.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the funding from the Ministère de l'enseignement Supérieur de la Recherche et de l'innovation (MESRI), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and the Université de Lille.

## REFERENCES

- Jaaks, P., and Bernasconi, M. (2017). The proprotein convertase furin in tumour progression. *Int. J. Cancer* *141*, 654–663.
- Seidah, N.G. (2012). The proprotein convertases in health and disease. *Qatar Found. Annu. Res. Forum Proc.* *2012*, AESNP11. 10.5339/qfarf.2012.AESNP11#abstract\_content.
- Day, R., and Salzet, M. (2002). The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity, and the search for genetic switches: redefining the diffuse neuroendocrine system. *Neuroendocrinol. Lett.* *23*, 447–451.
- Duckert, P., Brunak, S., and Blom, N. (2004). Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng. Des. Sel.* *17*, 107–112.
- Scamuffa, N., Calvo, F., Chrétien, M., Seidah, N.G., and Khatib, A.-M. (2006). Proprotein convertases: lessons from knockouts. *FASEB J.* *20*, 1954–1963.
- Martín, M.G., Lindberg, I., Solorzano-Vargas, R.S., Wang, J., Avitzur, Y., Bandsma, R., Sokollik, C., Lawrence, S., Pickett, L.A., Chen, Z., et al. (2013). Congenital proprotein convertase 1/3 deficiency causes malabsorptive diarrhea and other endocrinopathies in a pediatric cohort. *Gastroenterology* *145*, 138–148.
- Marcinkiewicz, M. (2002).  $\beta$ APP and furin mRNA concentrates in immature senile plaques in the brain of Alzheimer patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *61*, 815–829.
- Khatib, A.-M., Siegfried, G., Chrétien, M., Metrakos, P., and Seidah, N.G. (2002). Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am. J. Pathol.* *160*, 1921–1935.
- Fu, J., Bassi, D.E., Zhang, J., Li, T., Nicolas, E., and Klein-Szanto, A.J. (2012). Transgenic overexpression of the proprotein convertase furin enhances skin tumor growth. *Neoplasia* *14*, 271–282.
- Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2017). The microenvironmental landscape of brain tumors. *Cancer Cell* *31*, 326–341.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Jr., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* *339*, 1546–1558.
- Gottesman, M.M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* *53*, 615–627.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., and Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)* *6*, 1769–1792.
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., and Johnston, P.G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 714–726.
- Thorsson, V., Gibbs, D.L., Brown, S.D., Wolf, D., Bortone, D.S., Ou Yang, T.H., Porta-Pardo, E., Gao, G.F., Plaisier, C.L., Eddy, J.A., et al.; Cancer Genome Atlas Research Network (2018). The immune landscape of cancer. *Immunity* *48*, 812–830.e14.
- Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* *480*, 480–489.
- Duhamel, M., Rodet, F., Murgoci, A., Wisztorski, M., Day, R., Fournier, I., and Salzet, M. (2016). Proprotein convertase 1/3 inhibited macrophages: a novel therapeutic based on drone macrophages. *EuPA Open Proteom.* *11*, 20–22.
- Duhamel, M., Rose, M., Rodet, F., Murgoci, A.N., Zografidou, L., Régnier-Vigouroux, A., Abeele, F.V., Kobeissy, F., Nataf, S., Pays, L., et al. (2018). Paclitaxel treatment and proprotein convertase 1/3 (PC1/3) knockdown in macrophages is a promising anti-glioma strategy as revealed by proteomics and cytotoxicity studies. *Mol. Cell. Proteomics* *17*, 1126–1143.
- Duhamel, M., Rodet, F., Delhem, N., Vanden Abeele, F., Kobeissy, F., Nataf, S., Pays, L., Desjardins, R., Gagnon, H., Wisztorski, M., et al. (2015). Molecular consequences of proprotein convertase 1/3 (PC1/3) inhibition in macrophages for application to cancer immunotherapy: a proteomic study. *Mol. Cell. Proteomics* *14*, 2857–2877.
- Duhamel, M., Rodet, F., Murgoci, A.N., Desjardins, R., Gagnon, H., Wisztorski, M., Fournier, I., Day, R., and Salzet, M. (2016). The proprotein convertase PC1/3 regulates TLR9 trafficking and the associated signaling pathways. *Sci. Rep.* *6*, 19360.
- Refaie, S., Gagnon, S., Gagnon, H., Desjardins, R., D'Anjou, F., D'Orléans-Juste, P., Zhu, X., Steiner, D.F., Seidah, N.G., Lazure, C., et al. (2012). Disruption of proprotein convertase 1/3 (PC1/3) expression in mice causes innate immune defects and uncontrolled cytokine secretion. *J. Biol. Chem.* *287*, 14703–14717.
- Gagnon, H., Refaie, S., Gagnon, S., Desjardins, R., Salzet, M., and Day, R. (2013). Proprotein convertase 1/3 (PC1/3) in the rat alveolar macrophage cell line NR8383: localization, trafficking and effects on cytokine secretion. *PLoS ONE* *8*, e61557.
- Hipp, M.M., Shepherd, D., Booth, S., Waithe, D., Reis e Sousa, C., and Cerundolo, V. (2015). The processed amino-terminal fragment of human TLR7 acts as a chaperone to direct human TLR7 into endosomes. *J. Immunol.* *194*, 5417–5425.
- Ishii, N., Funami, K., Tatematsu, M., Seya, T., and Matsumoto, M. (2014). Endosomal localization of TLR8 confers distinctive proteolytic processing on human myeloid cells. *J. Immunol.* *193*, 5118–5128.
- Coppola, J.M., Bhojani, M.S., Ross, B.D., and Rehemtulla, A. (2008). A small-molecule furin inhibitor inhibits cancer cell motility and invasiveness. *Neoplasia* *10*, 363–370.
- Couture, F., D'Anjou, F., Desjardins, R., Boudreau, F., and Day, R. (2012). Role of proprotein convertases in prostate cancer progression. *Neoplasia* *14*, 1032–1042.
- Longuespée, R., Couture, F., Levesque, C., Kwiatkowska, A., Desjardins, R., Gagnon, S., Vergara, D., Maffia, M., Fournier, I., Salzet, M., and Day, R. (2014). Implications of proprotein convertases in ovarian cancer cell proliferation and tumor progression: insights for PACE4 as a therapeutic target. *Transl. Oncol.* *7*, 410–419.
- Couture, F., Sabbagh, R., Kwiatkowska, A., Desjardins, R., Guay, S.P., Bouchard, L., and Day, R. (2017). PACE4 undergoes an oncogenic alternative splicing switch in cancer. *Cancer Res.* *77*, 6863–6879.
- Levesque, C., Fugère, M., Kwiatkowska, A., Couture, F., Desjardins, R., Routhier, S., Moussette, P., Prah, A., Lammek, B., Appel, J.R., et al. (2012). The Multi-Leu peptide

- inhibitor discriminates between PACE4 and furin and exhibits antiproliferative effects on prostate cancer cells. *J. Med. Chem.* 55, 10501–10511.
30. Becker, G.L., Lu, Y., Harges, K., Strehlow, B., Levesque, C., Lindberg, I., Sandvig, K., Bakowsky, U., Day, R., Garten, W., and Steinmetzer, T. (2012). Highly potent inhibitors of proprotein convertase furin as potential drugs for treatment of infectious diseases. *J. Biol. Chem.* 287, 21992–22003.
  31. Levesque, C., Couture, F., Kwiatkowska, A., Desjardins, R., Guérin, B., Neugebauer, W.A., and Day, R. (2015). PACE4 inhibitors and their peptidomimetic analogs block prostate cancer tumor progression through quiescence induction, increased apoptosis and impaired neovascularisation. *Oncotarget* 6, 3680–3693.
  32. Kwiatkowska, A., Couture, F., Ait-Mohand, S., Desjardins, R., Dory, Y.L., Guérin, B., and Day, R. (2019). Enhanced anti-tumor activity of the Multi-Leu peptide PACE4 inhibitor transformed into an albumin-bound tumor-targeting prodrug. *Sci. Rep.* 9, 2118.
  33. Bassi, D.E., Zhang, J., Renner, C., and Klein-Szanto, A.J. (2017). Targeting proprotein convertases in furin-rich lung cancer cells results in decreased in vitro and in vivo growth. *Mol. Carcinog.* 56, 1182–1188.
  35. Fong, S., Mounkes, L., Liu, Y., Maibaum, M., Alonzo, E., Desprez, P.Y., Thor, A.D., Kashani-Sabet, M., and Debs, R.J. (2003). Functional identification of distinct sets of antitumor activities mediated by the FKBP gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 14253–14258.
  36. Le Rhun, E., Duhamel, M., Wisztorski, M., Gimeno, J.P., Zairi, F., Escande, F., Reynolds, N., Kobeissy, F., Maurage, C.A., Salzet, M., and Fournier, I. (2017). Evaluation of non-supervised MALDI mass spectrometry imaging combined with microproteomics for glioma grade III classification. *Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteomics* 1865, 875–890.
  37. Li, Y., Basang, Z., Ding, H., Lu, Z., Ning, T., Wei, H., Cai, H., and Ke, Y. (2011). Latexin expression is downregulated in human gastric carcinomas and exhibits tumor suppressor potential. *BMC Cancer* 11, 121.
  38. Catalano, A., Caprari, P., Moretti, S., Faronato, M., Tamagnone, L., and Procopio, A. (2006). Semaphorin-3A is expressed by tumor cells and alters T-cell signal transduction and function. *Blood* 107, 3321–3329.
  39. Chakraborty, G., Kumar, S., Mishra, R., Patil, T.V., and Kundu, G.C. (2012). Semaphorin 3A suppresses tumor growth and metastasis in mice melanoma model. *PLoS ONE* 7, e33633.
  40. Larrivière, B., Freitas, C., Trombe, M., Lv, X., Delafarge, B., Yuan, L., Bouvrée, K., Bréant, C., Del Toro, R., Bréchet, N., et al. (2007). Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis. *Genes Dev.* 21, 2433–2447.
  41. Chen, B. (2018). A novel long noncoding RNA lncWDR26 suppresses the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma cells through interaction with SIX3. *Am. J. Cancer Res.* 8, 688–698.
  42. Fussbroich, B., Wagener, N., Macher-Goeppinger, S., Benner, A., Fälth, M., Sültmann, H., Holzer, A., Hoppe-Seyler, K., and Hoppe-Seyler, F. (2011). EZH2 depletion blocks the proliferation of colon cancer cells. *PLoS ONE* 6, e21651.
  43. Liu, Z., Kuang, W., Zhou, Q., and Zhang, Y. (2018). TGF- $\beta$ 1 secreted by M2 phenotype macrophages enhances the stemness and migration of glioma cells via the SMAD2/3 signalling pathway. *Int. J. Mol. Med.* 42, 3395–3403.
  44. D'Anjou, F., Routhier, S., Perreault, J.P., Latil, A., Bonnel, D., Fournier, I., Salzet, M., and Day, R. (2011). Molecular validation of PACE4 as a target in prostate cancer. *Transl. Oncol.* 4, 157–172.
  45. Cisneros Castillo, L.R., Oancea, A.-D., Stüllein, C., and Régnier-Vigouroux, A. (2016). A novel computer-assisted approach to evaluate multicellular tumor spheroid invasion assay. *Sci. Rep.* 6, 35099.
  46. Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., and Sica, A. (2006). Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 315–322.
  47. Hwangbo, C., Tae, N., Lee, S., Kim, O., Park, O.K., Kim, J., Kwon, S.H., and Lee, J.H. (2016). Syntenin regulates TGF- $\beta$ 1-induced Smad activation and the epithelial-to-mesenchymal transition by inhibiting caveolin-mediated TGF- $\beta$  type I receptor internalization. *Oncogene* 35, 389–401.
  48. Link, T.M., Park, U., Vonakis, B.M., Raben, D.M., Soloski, M.J., and Caterina, M.J. (2010). TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nat. Immunol.* 11, 232–239.
  49. Zunke, F., and Rose-John, S. (2017). The shedding protease ADAM17: physiology and pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1864 (11 Pt B), 2059–2070.
  50. Ripoll, V.M., Irvine, K.M., Ravasi, T., Sweet, M.J., and Hume, D.A. (2007). *Gpnmb* is induced in macrophages by IFN- $\gamma$  and lipopolysaccharide and acts as a feedback regulator of proinflammatory responses. *J. Immunol.* 178, 6557–6566.
  51. He, X., Huang, Q., Qiu, X., Liu, X., Sun, G., Guo, J., Ding, Z., Yang, L., Ban, N., Tao, T., and Wang, D. (2015). LAP3 promotes glioma progression by regulating proliferation, migration and invasion of glioma cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 1081–1089.
  52. Audrito, V., Serra, S., Brusa, D., Mazzola, F., Arruga, F., Vaisitti, T., Coscia, M., Maffei, R., Rossi, D., Wang, T., et al. (2015). Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 125, 111–123.
  53. Hassan, M.K., Kumar, D., Naik, M., and Dixit, M. (2018). The expression profile and prognostic significance of eukaryotic translation elongation factors in different cancers. *PLoS ONE* 13, e0191377.
  54. Arai, H., Ikota, H., Sugawara, K., Nobusawa, S., Hirato, J., and Nakazato, Y. (2012). Nestin expression in brain tumors: its utility for pathological diagnosis and correlation with the prognosis of high-grade gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 29, 160–167.
  55. Beckner, M.E., Fellows-Mayle, W., Zhang, Z., Agostino, N.R., Kant, J.A., Day, B.W., and Pollack, I.F. (2010). Identification of ATP citrate lyase as a positive regulator of glycolytic function in glioblastomas. *Int. J. Cancer* 126, 2282–2295.
  56. Xu, Z., Joshi, N., Agarwal, A., Dahiya, S., Bittner, P., Smith, E., Taylor, S., Piwnicka-Worms, D., Weber, J., and Leonard, J.R. (2012). Knocking down nucleolin expression in gliomas inhibits tumor growth and induces cell cycle arrest. *J. Neurooncol.* 108, 59–67.
  57. Zandi, S., Nakao, S., Chun, K.H., Fiorina, P., Sun, D., Arita, R., Zhao, M., Kim, E., Schueller, O., Campbell, S., et al. (2015). ROCK-isoform-specific polarization of macrophages associated with age-related macular degeneration. *Cell Rep.* 10, 1173–1186.
  58. Ono, R., Kaisho, T., and Tanaka, T. (2015). PDLIM1 inhibits NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory signaling by sequestering the p65 subunit of NF- $\kappa$ B in the cytoplasm. *Sci. Rep.* 5, 18327.
  59. Qi, Y., and Xu, R. (2018). Roles of PLODs in collagen synthesis and cancer progression. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 66.
  60. Li, Y., Li, W., Yang, Y., Lu, Y., He, C., Hu, G., Liu, H., Chen, J., He, J., and Yu, H. (2009). MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme. *Brain Res.* 1286, 13–18.
  61. Brösicke, N., and Faissner, A. (2015). Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell Adhes. Migr.* 9, 131–140.
  62. Wu, H., and Siegel, R.M. (2011). Progranulin resolves inflammation. *Science* 332, 427–428.
  63. Giri, B., Dixit, V.D., Ghosh, M.C., Collins, G.D., Khan, I.U., Madara, K., Weeraratna, A.T., and Taub, D.D. (2007). CXCL12-induced partitioning of flotillin-1 with lipid rafts plays a role in CXCR4 function. *Eur. J. Immunol.* 37, 2104–2116.
  64. Yang, M., Liu, J., Piao, C., Shao, J., and Du, J. (2015). ICAM-1 suppresses tumor metastasis by inhibiting macrophage M2 polarization through blockade of efferocytosis. *Cell Death Dis.* 6, e1780.
  65. Starokadomskyy, P., Gluck, N., Li, H., Chen, B., Wallis, M., Maine, G.N., Mao, X., Zaidi, I.W., Hein, M.Y., McDonald, F.J., et al. (2013). CCDC22 deficiency in humans blunts activation of proinflammatory NF- $\kappa$ B signaling. *J. Clin. Invest.* 123, 2244–2256.
  66. Chen, Y.J., Hsieh, M.Y., Chang, M.Y., Chen, H.C., Jan, M.S., Maa, M.C., and Leu, T.H. (2012). Eps8 protein facilitates phagocytosis by increasing TLR4-MyD88 protein interaction in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Biol. Chem.* 287, 18806–18819.
  67. Mills, E.L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A.S.H., Varma, M., Bryant, C.E., Tourlomousis, P., Däbritz, J.H.M., Gottlieb, E., Latorre, I., et al. (2016). Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages. *Cell* 167, 457–470.e13.

68. Hsu, J.B.K., Chang, T.H., Lee, G.A., Lee, T.Y., and Chen, C.Y. (2019). Identification of potential biomarkers related to glioma survival by gene expression profile analysis. *BMC Med. Genomics* *11* (Suppl 7), 34.
69. Friedman, H.S., Kerby, T., and Calvert, H. (2000). Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin. Cancer Res.* *6*, 2585–2597.
70. Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* *6*, 359–362.
71. Wiśniewski, J.R. (2017). Filter-aided sample preparation: the versatile and efficient method for proteomic analysis. *Methods Enzymol.* *585*, 15–27.
72. Wiśniewski, J.R. (2016). Quantitative evaluation of filter aided sample preparation (FASP) and multienzyme digestion FASP protocols. *Anal. Chem.* *88*, 5438–5443.
73. Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1367–1372.
74. Tyanova, S., Temu, T., and Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat. Protoc.* *11*, 2301–2319.
75. Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J.V., and Mann, M. (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* *10*, 1794–1805.
76. Cox, J., Hein, M.Y., Lubner, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics* *13*, 2513–2526.
77. Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M., and Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* *13*, 731–740.
78. Yuryev, A., Kotelnikova, E., and Daraselia, N. (2009). Ariadne's ChemEffect and Pathway Studio knowledge base. *Expert Opin. Drug Discov.* *4*, 1307–1318.
79. Quanico, J., Hauberg-Lotte, L., Devaux, S., Laouby, Z., Meriaux, C., Raffo-Romero, A., Rose, M., Westerheide, L., Vehmeyer, J., Rodet, F., et al. (2018). 3D MALDI mass spectrometry imaging reveals specific localization of long-chain acylcarnitines within a 10-day time window of spinal cord injury. *Sci. Rep.* *8*, 16083.
80. Mallah, K., Quanico, J., Trede, D., Kobeissy, F., Zibara, K., Salzet, M., and Fournier, I. (2018). Lipid changes associated with traumatic brain injury revealed by 3D MALDI-MSI. *Anal. Chem.* *90*, 10568–10576.
81. Jardin-Mathé, O., Bonnel, D., Franck, J., Wisztorski, M., Macagno, E., Fournier, I., and Salzet, M. (2008). MITICS (MALDI Imaging Team Imaging Computing System): a new open source mass spectrometry imaging software. *J. Proteomics* *71*, 332–345.

## Conclusions et perspectives

Le profil d'expression des PCs au sein des deux lignées cellulaires confirme ce qui est décrit dans la littérature. Les macrophages expriment PC1/3 (Gagnon et al., 2013) et la furine (Cordova et al., 2016), pour lesquelles un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire est décrit. Les cellules de gliomes, quant à elles, expriment PACE4 et la furine. L'implication de ces deux enzymes dans le développement tumoral a déjà été décrite dans le cancer de l'ovaire (Longuespée et al., 2014) et de la prostate (D'Anjou et al., 2011) pour PACE4 et dans les tumeurs du cou pour la furine (Bassi et al., 2001).

Ainsi, comme cela était attendu, l'inhibition de PC1/3 et de la furine induit une orientation des macrophages vers un profil pro-inflammatoire. Par ailleurs quelques similarités sont retrouvées entre les sécrétomes des macrophages WT traités avec l'inhibiteur de PCs et celui des macrophages PC1/3 KD. Par exemple, une sécrétion plus importante de CCL6 et de la ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène D (HNRNPD), impliquée dans la signalisation des cytokines, est observée dans les deux conditions. Des différences sont également rencontrées entre les deux types de macrophages. Par exemple, la sécrétion de MIF, protéine clé dans le recrutement et l'orientation pro-tumorale des macrophages au sein de la tumeur, est réduite pour les macrophages WT traités à l'inhibiteur de PCs mais augmentée pour les macrophages PC1/3 KD. En plus de l'orientation pro-inflammatoire des macrophages, l'inhibiteur de PCs réduit la sécrétion et l'expression de facteurs pro-tumoraux impliqués dans le développement tumoral et ce, même au sein de sphéroïdes mixtes, modèle qui se rapproche de l'environnement tumoral.

Ce constat confirme la possibilité d'utiliser l'inhibiteur de PCs dans une stratégie de reprogrammation des macrophages au sein des gliomes. Cependant, les analyses réalisées par spectrométrie de masse sont des analyses globales et ne donnent pas accès au profil protéique complet des macrophages. Afin de préciser et de confirmer le phénotype des macrophages stimulés à l'inhibiteur de PCs, il serait intéressant de réaliser des analyses plus ciblées. Des puces à cytokines nous permettraient d'identifier plus précisément les cytokines sécrétées par les macrophages ainsi que leur quantité selon les conditions. Le profil des macrophages pourra être analysé par FACS en ciblant plusieurs marqueurs associés au phénotype anti-tumoral et pro-inflammatoire tels que iNOS, TNF- $\alpha$  ou encore le CMH II, ainsi que des marqueurs du phénotype pro-tumoral et anti-inflammatoire tels que l'IL-10, TGF- $\beta$  et

l'Arginase 1. De plus, les activités immunologiques des macrophages telles que la phagocytose et le recrutement d'autres cellules immunitaires devront être étudiées. Plusieurs méthodes permettent d'évaluer l'activité phagocytaire des macrophages. La plus utilisée repose sur la mesure de l'assimilation de particules fluorescentes par microscopie. Quant au chimiotactisme, des chambres de Boyden permettent d'étudier le passage des cellules cibles à travers une membrane selon les facteurs présents de chaque côté. L'ensemble de ces expériences supplémentaires pourrait confirmer l'orientation des macrophages vers un phénotype M1, capable d'activer une réponse immunitaire. Il serait également judicieux de réaliser ces tests en co-culture avec les cellules de gliome et ainsi vérifier l'efficacité de la stratégie thérapeutique au sein d'un environnement immunosuppresseur.

Nous avons également pu mettre en évidence l'activité anti-tumorale de l'inhibiteur de PCs sur les cellules cancéreuses et ce, même en présence de macrophages, au sein des sphéroïdes. L'utilisation de l'inhibiteur de PCs dans une stratégie thérapeutique contre les GBMs semble donc très engageante. De plus, l'effet de l'inhibiteur de PCs est retrouvé sur la lignée cellulaire de macrophages humains THP1 qui semble être orientée vers un profil pro-inflammatoire suite à une stimulation avec l'inhibiteur. De plus, l'effet anti-tumoral de l'inhibiteur de PCs a également été observé contre d'autres lignées cellulaires notamment les NCH82, lignée de gliome humain et les MCF-7 lignée humaine de cancer du sein (Figure 22). Bien que des concentrations plus importantes soient nécessaires pour diminuer la densité cellulaire de ces lignées, l'inhibiteur de PCs semble être efficace sur des lignées cellulaires humaines de différents types de cancers. Ce résultat n'est pas surprenant puisque la furine qui est une des cibles de l'inhibiteur utilisé, est connue pour promouvoir la progression tumorale dans de nombreux types de cancers tels que les cancers du sein, de l'ovaire, du colon ainsi que les gliomes (Jaaks and Bernasconi, 2017). Nous pouvons donc prédire que son inhibition diminuerait la viabilité de cellules cancéreuses. En revanche, l'effet de l'inhibiteur de PCs sur la reprogrammation des macrophages est très encourageant et pourrait être associé aux macrophages CAR, stratégie thérapeutique développée au laboratoire.



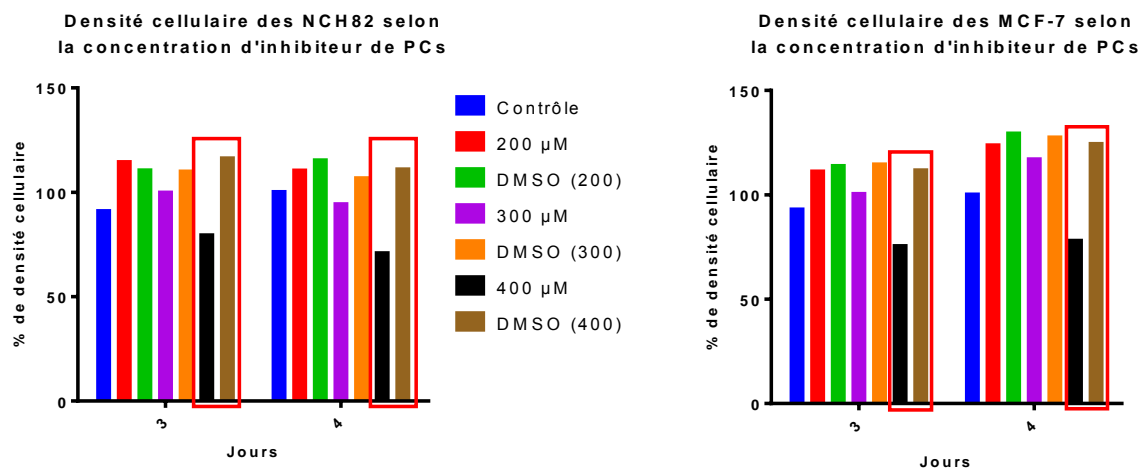
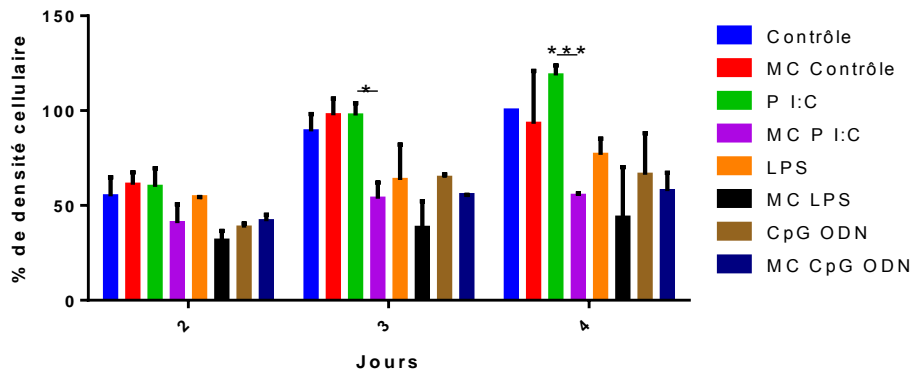


Figure 22 : Toxicité de l'inhibiteur de PCs contre les lignées humaines de gliome NCH82 et de cancer du sein MCF-7.

La densité cellulaire a été déterminée grâce au kit MTS CellTiter. Les cellules ont été traitées avec plusieurs concentrations d'inhibiteur de PCs (200, 300 ou 400  $\mu\text{M}$ ) ou avec le volume équivalent de DMSO, l'inhibiteur de PCs étant repris dans du DMSO. Les mesures ont été réalisées à 0, 72 et 96h. Les résultats ont été transformés en pourcentage par rapport à la valeur de DO obtenue à 0h. L'expérience a été réalisée une fois.

L'efficacité de l'inhibiteur ayant été démontrée, nous avons envisagé de l'utiliser en combinaison avec un ligand de TLR, comme nous l'avions précédemment réalisé avec l'inhibition de PC1/3 associée au LPS (Duhamel et al., 2015) ou au Paclitaxel (Duhamel et al., 2018), tous deux ligands du TLR4. L'inhibition de PC1/3 induit l'activation de la voie NF- $\kappa\text{B}$ , voie de signalisation également activée par l'ensemble des TLRs, à l'exception du TLR3 qui induit l'activation de la voie anti-virale IRF3. Pour nous orienter dans le choix du TLR à stimuler, nous avons évalué la sécrétion de facteurs anti-tumoraux par les macrophages selon le ligand utilisé. Des tests de viabilité ont donc été réalisés dans cette optique (Figure 23). Une sécrétion de facteurs anti-tumoraux efficaces contre les C6 est constatée quel que soit le TLR stimulé, le TLR3 avec le Poly (I:C), le TLR4 avec le LPS ou le TLR9 avec le CpG ODN. En revanche, le Poly (I:C) est le seul ligand à ne démontrer aucune activité anti-tumorale directe contre les C6. Ainsi, l'activité anti-tumorale exercée par le sécrétome des macrophages traités au Poly (I:C) est uniquement due aux facteurs anti-tumoraux présents dans ce milieu conditionné et non pas à la présence résiduelle du ligand dans le sécrétome, comme nous pourrions le suspecter pour le LPS ou le CpG ODN. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers le Poly (I:C) qui semble être prometteur dans l'orientation des macrophages vers un phénotype anti-tumoral dans le cadre d'une stratégie thérapeutique contre les GBMs.

**Influence du sécrétome de macrophages sur la densité cellulaire des C6 selon le ligand de TLR utilisé**



*Figure 23 : Influence du TLR activé sur la sécrétion de facteurs anti-tumoraux par les macrophages. La densité cellulaire des cellules de gliomes C6 a été déterminée grâce au kit MTS CellTiter.*

*Les cellules ont été traitées avec plusieurs ligands de TLRs : le Poly (I:C) pour le TLR3, le LPS pour le TLR4 et le CpG ODN pour le TLR9. Cela a permis d'évaluer la toxicité des différents ligands vis-à-vis des C6. Les cellules ont également été incubées avec le sécrétome (MC pour milieu conditionné) de macrophages stimulés avec ces différents ligands. L'activité anti-tumorale des facteurs sécrétés par les macrophages stimulés avec les différents ligands a ainsi été évaluée. Les mesures ont été réalisées à 0, 48, 72 et 96h. Les résultats ont été transformés en pourcentage par rapport à la valeur de DO obtenue à 0h. Le test a été réalisé en duplicat biologique. Les différences significatives ont été révélées par une anova à deux voies : \* $p < 0.05$  et \*\*\* $p < 0.001$ .*



## CHAPITRE III

---

### L'ASSOCIATION DE L'INHIBITION DE PCs ET DE LA STIMULATION DU TLR3 EST UNE NOUVELLE STRATEGIE THERAPEUTIQUE POUR LA REACTIVATION DES MACROPHAGES

#### Introduction

Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF sont des acteurs majeurs de l'inflammation et de la réponse antivirale. Ce sont deux effecteurs clés de la réponse immunitaire innée. L'activation de ces voies se fait généralement à travers la stimulation des TLRs par des PAMPs tels que le LPS pour le TLR4 ou encore l'ARN double brin pour le TLR3. Il en résulte la translocation nucléaire des facteurs NF- $\kappa$ B ou IRF3, selon le TLR stimulé. Ainsi, la stimulation du TLR4 peut induire l'activation de ces deux facteurs tandis que la stimulation du TLR3 induit l'activation de la voie antivirale régie par IRF3. L'activation de ces facteurs conduit à la sécrétion de cytokines et d'interférons pour contrecarrer l'infection (O'Neill et al., 2013).

Comme mentionné dans les deux premiers chapitres, l'activation du facteur NF- $\kappa$ B est un élément clé dans l'orientation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire. Les macrophages PC1/3 KD stimulés au LPS montrent une activation exacerbée et durable de cette voie ainsi qu'une sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (Duhamel et al., 2015). Un phénotype similaire est obtenu pour les macrophages PC1/3 KD stimulés au Paclitaxel (Duhamel et al., 2018). En revanche, la voie antivirale régie par IRF3 qui est activée suite à l'internalisation du TLR4 lorsque ces macrophages sont stimulés par du LPS n'est pas impactée par l'absence de PC1/3 (Duhamel et al., 2015). Or, l'activation de cette voie et la production d'IFN de type I à travers la stimulation du TLR3, peuvent être impliquées dans l'orientation des macrophages vers un phénotype M1 pro-inflammatoire et anti-tumoral (Liu et al., 2016). L'activation simultanée des deux voies pourrait donc orienter les macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire et anti-tumoral amplifié. L'inhibition de PC1/3 au sein des macrophages induit la sécrétion spontanée d'alarmines (Duhamel et al., 2015). Ces dernières auraient la capacité d'activer de manière autocrine et paracrine le TLR4 et ainsi la voie NF- $\kappa$ B. Un ligand du TLR4 n'est donc pas essentiel à l'activation de cette voie. Nous pouvons donc associer l'inhibiteur de PCs à un autre ligand de TLR pour activer la voie IRF3. Notre attention s'est portée sur le Poly (I:C), ligand du TLR3.

Ce dernier, ainsi que les principaux facteurs issus de l'activation de la voie IRF3 tels que les IFN  $\alpha$  et  $\beta$  interviennent dans la modulation du microenvironnement immunosuppresseur du gliome (Kees et al., 2012). En effet, la stimulation au Poly (I:C) oriente les cellules microgliales vers un profil de type M1 anti-tumoral et augmente la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et IL-12. De plus, les facteurs sécrétés par les cellules microgliales stimulées au Poly (I:C) inhibent la migration des cellules de gliome. Cependant, le microenvironnement tumoral influence l'activité anti-tumorale du Poly (I:C). En effet, la croissance des cellules cancéreuses reste inchangée en présence de Poly (I:C) lorsque ces dernières sont en co-culture avec les cellules microgliales. De plus, la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-12 par les cellules microgliales traitées avec du Poly (I:C) est très réduite en présence du sécrétome de cellules cancéreuses au sein duquel une grande concentration d'IL-10 est retrouvée. Il semblerait donc que les cellules cancéreuses conservent leur capacité immunosuppressive même en présence de Poly (I:C) (Kees et al., 2012). Récemment, nous avons démontré que les macrophages PC1/3 KD conservaient une sécrétion de facteurs pro-inflammatoires en présence d'IL-10 lorsqu'ils étaient stimulés au LPS ou au Paclitaxel, ligands du TLR4 (Duhamel et al., 2015, 2018). Nous nous sommes donc demandés si l'inhibition de PCs, telles que PC1/3 et la furine, associée à la stimulation avec le Poly (I:C) pourrait être une stratégie thérapeutique efficace dans la reprogrammation des macrophages au sein de gliomes.

## Objectifs

Ainsi nous avons combiné l'inhibiteur de PCs, précédemment décrit pour influencer le phénotype des macrophages en faveur d'un phénotype pro-inflammatoire, avec le Poly (I:C). L'objectif est d'activer à la fois la voie pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B à travers l'inhibition de PC1/3 et la voie anti-virale régie par IRF3 par la stimulation du TLR3 et ainsi orienter les macrophages vers un phénotype anti-tumoral stable dans un environnement immunosuppresseur.

Ainsi, dans un premier temps, l'influence du Poly (I:C) sur le phénotype des macrophages NR8383 sera étudiée à travers des analyses protéomiques de leur sécrétome et des extraits cellulaires. De la même manière, l'impact de l'association de l'inhibiteur et du Poly (I:C) sur les macrophages sera étudié. Puis, l'activité anti-tumorale des facteurs sécrétés par les macrophages traités avec l'association des deux molécules sera étudiée à travers des tests d'invasion réalisés sur des sphéroïdes associant ou non, cellules cancéreuses et macrophages.

Ce modèle permet d'étudier le potentiel anti-tumoral de notre stratégie thérapeutique au sein d'un environnement immunosuppresseur. Enfin, l'expression de marqueurs du phénotype pro-tumoral et anti-inflammatoire sera analysée par immunofluorescence sur des coupes de sphéroïdes.

## Résultats

Dans un premier temps, nous avons évalué l'action que le Poly (I:C) exerce sur le phénotype des macrophages NR8383 WT. Pour cela, des analyses protéomiques de leur contenu cellulaire et de leur sécrétome ont été réalisées. Une sous-expression de protéines impliquées dans l'atténuation de la réponse immunitaire est observée au sein des macrophages traités par le Poly (I:C). Ainsi, DOCK3, régulateur négatif de la voie de signalisation des TLRs et la glycoprotéine transmembranaire NMB impliquée dans l'atténuation de la réponse des lymphocytes, sont sous exprimées. De plus, plusieurs protéines impliquées dans la réponse immunitaire sont sur-exprimées par les macrophages stimulés avec le Poly (I:C) telles que les peptides transporteurs d'antigènes tap1 et tap2, NDRG1 et Interferon-induced GTP-binding protein Mx1 impliquées dans la réponse immunitaire innée. Les marqueurs d'autophagie Rab8b et du phénotype pro-inflammatoire M1 NOS2 sont également sur-exprimés par les macrophages stimulés par le Poly (I:C). Ainsi, comme nous l'attendions, le Poly (I:C) induit une sur-expression de protéines impliquées dans les fonctions immunitaires des macrophages et semble donc activer ces derniers. L'analyse des facteurs sécrétés par les macrophages stimulés avec le Poly (I:C) précise l'impact de ce dernier sur le phénotype inflammatoire des macrophages. En effet, la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10 ou encore le TNF- $\alpha$  augmente suite à une stimulation au Poly (I:C).

La stimulation des macrophages au Poly (I:C) semble donc activer les fonctions immunologiques des macrophages et les orienter vers un phénotype pro-inflammatoire. Nous avons ensuite vérifié le potentiel anti-tumoral de ces macrophages en évaluant l'activité des facteurs qu'ils sécrètent contre l'invasion de sphéroïdes de cellules de gliome. Ainsi, une diminution de l'invasion des sphéroïdes de cellules de gliome C6 peut être observée lorsqu'ils sont cultivés avec le sécrétome de macrophages stimulés au Poly (I:C). Cet effet anti-tumoral est également observé sur les sphéroïdes mixtes rassemblant les cellules cancéreuses et les

macrophages. Ainsi, même au contact de macrophages, les cellules cancéreuses restent sensibles aux facteurs sécrétés par ces derniers suite à une stimulation avec le Poly (I:C). Face à ces résultats encourageants, la complémentarité de ces facteurs anti-tumoraux et de l'inhibiteur de PCs a été étudiée. L'inhibiteur a été ajouté au sécrétome des macrophages stimulés au Poly (I:C) dans le traitement des sphéroïdes. Aucun effet additif sur la diminution de l'invasion n'a été observé par rapport à l'utilisation du sécrétome de macrophages traités au Poly (I:C) seul. Néanmoins, une légère tendance peut être observée à 96h, temps à partir duquel il semblerait que la combinaison des deux facteurs soit plus efficace.

L'invasion des sphéroïdes étant déjà très basse lors d'un traitement avec le sécrétome des macrophages traités au Poly (I:C), la possibilité d'observer un effet additif semble donc difficile. Ainsi, pour avoir une idée de la complémentarité d'un traitement des macrophages avec l'inhibiteur et le Poly (I:C) des analyses protéomiques ont été réalisées. Un groupe de protéines sous-exprimées se dégage uniquement suite à l'incubation des macrophages avec le Poly (I:C) et l'inhibiteur de PCs. Parmi ces protéines sont retrouvées notamment l'Eif3e impliquée dans la prolifération des cellules de gliomes ou encore Pde12, un régulateur négatif de la voie antivirale et des fonctions anti-tumorales des macrophages. Mis à part ce groupe de protéines, le profil protéique des macrophages stimulés avec les deux facteurs est très proche du profil observé suite à une stimulation avec le Poly (I:C) seul. La sur-expression des protéines telles que tap1, Mx1 ou encore NOS2 précédemment décrites est retrouvée suite à une stimulation avec le Poly (I:C) associée ou non à l'inhibiteur de PCs. De la même manière, les protéines sous-exprimées suite à une stimulation au Poly (I:C) telles que la glycoprotéine transmembranaire NMB précédemment citée sont également sous-exprimées lorsque le Poly (I:C) est associé à l'inhibiteur de PCs. Par ailleurs, le sécrétome des macrophages incubés à la fois avec le Poly (I:C) et l'inhibiteur de PCs est très proche du sécrétome de macrophages traités avec l'inhibiteur de PCs seul. La sécrétion de protéines impliquées dans le développement tumoral telles que MIF, Adam17 ou encore Bcat1 est réduite tandis que la sécrétion des protéines telles qu'Usp15, régulateur positif de la réponse aux interférons de type I, est augmentée. Cependant, l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que CCL3, CCL4, CXCL10 ou encore TNF- $\alpha$  observée suite à une stimulation au Poly (I:C) est également retrouvée lorsque le Poly (I:C) est associé à l'inhibiteur de PCs. Ainsi, l'association des deux facteurs induit un phénotype spécifique des macrophages

qui mélange le phénotype obtenu après chaque stimulation indépendante. De plus, la stimulation des sphéroïdes avec les facteurs sécrétés par les macrophages stimulés au Poly (I:C) et l'inhibiteur de PCs réduit l'expression d'Arginase 1 et de CD206, deux marqueurs associés au phénotype pro-tumoral et anti-inflammatoire. L'ensemble de ces résultats laisse envisager une reprogrammation des macrophages au sein des sphéroïdes.

Enfin, la prolifération et le type de mort cellulaire des C6 ont été étudié pour déterminer plus précisément l'impact de notre stratégie thérapeutique. Il semblerait que les facteurs sécrétés par les macrophages stimulés au Poly (I:C), associés ou non avec l'inhibiteur de PCs, induisent la mort cellulaire. L'augmentation de la détection de l'ADN, traduisant une perte de l'intégrité membranaire et la diminution de la prolifération cellulaire le prouve.

1 **Therapeutic anti-glioma effect of the combined action of PCSK inhibitor with the anti-tumoral**  
2 **factors secreted by Poly (I:C)-stimulated macrophages.**

3  
4  
5 Mélanie Rose<sup>1,2\*</sup>, Marie Duhamel<sup>1\*</sup>, Soulaymane Aboulouard<sup>1</sup>, Firas Kobeissy<sup>3</sup>, Dominique  
6 Tierny<sup>2</sup>, Isabelle Fournier<sup>1,4</sup>, Franck Rodet<sup>1</sup>, Michel Salzet<sup>1,4\*\*</sup>

7  
8 *1: Université Lille, INSERM, U1192 - Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire et*  
9 *Spectrométrie de Masse-PRISM, F-59000 Lille, France*

10 *2: Oncovet Clinical Research (OCR), SIRIC ONCOLille, Villeneuve d'Ascq, France*

11 *3: Department of Psychiatry, McKnight Brain Institute, University of Florida, Gainesville, FL,*  
12 *32611, USA*

13 *4: Institut Universitaire de France, 75000 Paris*

14 \* : These authors contributed equally to this work

15  
16  
17  
18 **RUNNING TITLE**

19 *Anti-tumoral evaluation of Poly(I:C) macrophages conditioned media and PCSK inhibitor on glioma*  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

29 **\*\*Correspondence: Prof. Michel Salzet** ([michel.salzet@univ-lille.fr](mailto:michel.salzet@univ-lille.fr)), Laboratoire Réponse  
30 Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM), Inserm U1192 - Université de Lille, Faculté des  
31 Sciences, Campus Cité Scientifique, Bât SN3, 1er étage, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex. Phone:  
32 +33 (0)3 20 43 41 94; Fax: +33 (0)3 20 43 40 54, ORCID : 0000-0003-4318-0817  
33

34 **ABBREVIATIONS**

35 ACN: acetonitrile

36 AGC: automatic gain control

37 CIK: cytokine induced killer

38 DCs: dendritic cells

39 DHB: 2,5-dihydroxybenzoic acid

40 DMEM: dulbecco's modified eagle's medium

41 FASP: filter-aided sample preparation

42 FBS: fetal bovine serum

43 FWHM: full width at half maximum

44 ITO: indium tin oxide

45 LFQ: label-free quantification

46 MSI: mass spectrometry imaging

47 NK: natural killer cells

48 PCs: proprotein convertases

49 PCSK: proprotein convertase subtilisin/kexin type

50 PK/PD: pharmacokinetic/pharmacodynamics

51 SNEA: subnetwork enrichment analysis

52 TAM: tumor associated macrophages

53 TLR: Toll like receptor

54

55 **ABSTRACT**

56 Macrophages plasticity is a key feature in cancer progression. Neoplastic cells can alter their immune  
57 functions and orient them into a pro-tumoral phenotype. In this context and based on our previous work,  
58 we developed a new therapeutic strategy to switch macrophages phenotype and reactivate their anti-  
59 tumoral functions. In this context, we previously showed a dual activity of a proprotein convertases  
60 inhibitor as anti-glioma drug and anti-tumoral macrophages' reactivation drug. Proprotein convertases  
61 are proteases that cleave proteins into functional proteins. Several of their substrates are involved in  
62 tumorigenesis and immunosuppression. In this study, we decided to combine proprotein convertases  
63 inhibitor with Poly (I:C), a TLR3 ligand, to increase the anti-tumoral activity of macrophages. With  
64 mass spectrometry-based proteomics we could establish that a stimulation of macrophages with Poly  
65 (I:C) increased their secretion of pro-inflammatory cytokines and anti-tumoral factors. 3D invasion  
66 assay showed the efficacy of these anti-tumoral factors against mixed glioma cells and macrophages  
67 spheroids. Besides, immunofluorescence and proliferation assays showed an additive effect of the  
68 proprotein convertases inhibitor and the anti-tumoral factors secreted by Poly (I:C)-treated macrophages  
69 on both anti-glioma activity and macrophages anti-tumoral orientation leading to an innovative glioma  
70 therapy.

71 **KEYWORDS: TAM, immunotherapy, Proprotein convertases, immunoproteomic, Macrophages**  
72



## 73 INTRODUCTION

74 Oncoimmunology is a growing field. Tumors present a complex microenvironment in which  
75 several cell types can be found. Among them, immune cells such as macrophages, microglia, T, B, and  
76 NK lymphocytes are present (1). Most of the current strategies target T lymphocytes to reactivate their  
77 cytotoxic response. In cancer, T lymphocytes response is inhibited via the recognition of the PD1  
78 receptor located on T lymphocytes and its ligand PDL1 expressed by cancer cells and pro-tumor  
79 macrophages (2). Yet the full activation of these lymphocytes requires the reactivation of pro-tumor  
80 macrophages to express a pro-inflammatory and anti-tumor phenotype. Thus, it is necessary to act before  
81 this PD1/PDL1 pathway. Cancer cells secrete different anti-inflammatory factors that create an  
82 immunosuppressive environment and participate in the recruitment of macrophages. These macrophages  
83 are diverted from their anti-tumor function. They participate in tumorigenesis by improving metastatic  
84 and angiogenic processes and by inhibiting cytotoxic response (3). Macrophages must keep their pro-  
85 inflammatory phenotype to re-exert their phagocytic activity and to activate the anti-tumor immune  
86 response. In this context, proprotein convertases seem to be a clear target. Proprotein convertases (PCs)  
87 are proteases of the subtilisin-kexin family that cleave proproteins through limited proteolysis and  
88 convert them into bioactive proteins and peptides (4–6). Mammalian PCs include PCSK1, PCSK2, furin,  
89 PCSK4, PCSK5, PCSK6, and PCSK7 which are known to cleave proproteins at paired basic residues  
90 (7). PCs cleave a variety of precursor proteins within the secretory pathway, including neuropeptides,  
91 hormones, growth factors, and their respective receptors, adhesion molecule, bacterial toxins, and viral  
92 glycoproteins (8). However, deregulation of these enzymes has been associated with pathological  
93 conditions including endocrinopathies (9), Alzheimer’s disease (10), and tumors (11). Proprotein  
94 convertases are implicated in malignancies. PCSKs promote cancer growth and EMT transition (12,13)  
95 by activating tissue-modifying enzymes through at least matrix metalloproteinases or by inhibiting  
96 growth factors regulators (4). The PCSK upregulation is correlated with accelerated tumor progression  
97 and poor prognosis. Furin and PACE4 are the most implicated in ovarian (14), prostate cancers (15) and  
98 glioma (16). In this context, inhibiting PCSK/Furin activity has emerged as a therapeutic approach for  
99 suppressing cancerous cell-growth and metastatic activity (17). The specific Furin inhibition using a

100 bifunctional GM-CSF-Furin shRNA construct and an *in vitro* transduction protocol on the patient's  
101 cancer cells have been efficacious and well-tolerated in phase I-II trials with advanced Ewing's sarcoma  
102 (18) and ovarian cancer patients (19). However, another way to get anti-tumoral activity has recently  
103 emerged, which corresponds to the immune response reactivation.

104 In this context, it has been demonstrated that Furin and the proprotein convertase 1/3 (PC1/3)  
105 are two complementary targets for reinforcing the immune response (20–28). Furin is critical for the  
106 maintenance of peripheral CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cell-dependent immune tolerance and normal  
107 CD4<sup>+</sup> T helper (Th) cell polarization *in vivo* (28,29). We demonstrated that PC1/3 knock-out mice have  
108 high plasma levels of pro-inflammatory cytokines (23). We also showed that a rat macrophage cell line  
109 (NR8383) PC1/3 knockdown (KD) secretes high concentration of pro-inflammatory chemokines and  
110 cytokines (25). These secreted factors have chemotactic and anti-tumor properties. When stimulated  
111 with TLRs ligands, PC1/3 KD macrophages are over-activated and their immune response is  
112 exacerbated (24,25). Secreted factors by these PC1/3 KD macrophages after TLR4 stimulation with LPS  
113 and the anti-tumoral agent Paclitaxel have anti-tumor activities against breast, ovarian, and glioma  
114 cancer cells lines. PC1/3 KD macrophages can inhibit invasion of glioma cancer cells (C6 and F98) in  
115 3D spheroid mixed macrophages-glioma culture (24). We established that PC1/3 KD macrophages  
116 secrete high quantities of extracellular vesicles (EVs) (23,25,27) which is even more important when  
117 TLR4 or TLR9 pathways are triggered in PC1/3 KD macrophages (25,26). PC1/3 modulates GRAMD4  
118 levels and thus regulate TLR9 trafficking, to modulate the inflammatory response (27). Its inhibition  
119 reactivates the pro-inflammatory TLR MYD88 NFKB dependent pathway while the anti-inflammatory  
120 STAT3 pathway is down-regulated (27).

121 Taken together, these results point out that PC1/3 KD macrophages can secrete factors that can  
122 exert anti-tumoral activity. Thus, we developed a strategy based on PCSK inhibitor to both inactivate  
123 the tumor cells and reactivate the tumor associated macrophages (TAM). We established this double  
124 effect and the clear ability to reactivate TAM (30). However, in glioma, the antiviral pathway seems to  
125 be more implicated than the TLR4 pathway (31). We thus investigated in the present paper, the ability  
126 to reactivate the anti-tumoral response of macrophages by combining PCSK inhibitor with Poly (I:C)  
127 stimulation as a potential anti-glioma therapy. We have demonstrated the secretion by macrophages of

128 antitumoral factors. We have confirmed the combined effect of the treatment by inhibiting tumor growth  
129 and reactivating macrophages in mixed spheroids.

130

## 131 **RESULTS**

### 132 *Poly (I:C) triggers changes in the phenotype and function of macrophages.*

133 A proteomic study was conducted to decipher the molecular impact of different concentrations (5, 10  
134 and 15 µg/mL) of Poly(I:C) on macrophages. Shotgun proteomic analysis of NR8383 macrophages  
135 yielded 1 632 protein identifications across all the samples. As a criterion of significance, we applied an  
136 ANOVA test with a significance threshold of  $p < 0.05$ . A heatmap was created from which 61 proteins  
137 showed a significant difference in LFQ expression between Poly (I:C)-treated NR8383 macrophages  
138 and non-treated macrophages (**Figure 1A, Supp. Data 1**). Two branches separate the treated to non-  
139 treated Poly (I:C) NR8383 macrophages. Macrophages treated with a concentration of 5 µg/ml Poly  
140 (I:C) presents an intermediate profile between non-treated and 10-15 µg/ml Poly (I:C) treated  
141 macrophages. Above 10 µg/ml Poly(I:C), the proteome of macrophages is completely different (**Figure**  
142 **1A**). In fact, among the differentially regulated proteins, 18 were downregulated in macrophages treated  
143 with 10 and 15 µg/mL of Poly (I:C), including 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase (11β-HSD1), and  
144 Transmembrane glycoprotein NMB (Gpnmb) involved in the attenuation of the T cell response (**Supp.**  
145 **Data 1**). We also identified, in this cluster of downregulated proteins, Legumain (Lgmn), Lysosomal  
146 acid lipase (Lipa) and Platelet glycoprotein 4 (CD36) which are associated with M2 anti-inflammatory  
147 polarization of macrophages. Docking protein 3 (DOK3), a proximal negative regulator of TLR  
148 signaling, was also found to be downregulated in macrophages after stimulation with 10 and 15 µg/mL  
149 of Poly (I:C) (**Supp. Data 1**). Systemic biology analyses of these downregulated proteins (**Figure 1B,**  
150 **Cluster 1**) confirm that proteins involved in T Cell response inhibition as well as in breast cancer and  
151 neoplasia inhibition are downregulated. In contrast, 43 proteins were upregulated in macrophages after  
152 a treatment with 10 and 15 µg/ml of Poly (I:C), including Antigen peptide transporter 1 and 2 (Tap1,  
153 Tap2) involved in MHC1 self-antigen presentation, NDRG1 and Interferon-induced GTP-binding  
154 protein Mx1 (Mx1), involved in the innate immune response, as well as Interferon-induced guanylate-

155 binding protein 2 (Gbp2) and 2-5-oligoadenylate synthase-like protein 1 (Oasl) (**Supp. Data 1**). We also  
156 identified, in the upregulated protein cluster, Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) required  
157 for T cell-mediated immune responses, Nitric oxide synthase (NOS2) and long-chain acyl-CoA  
158 synthetase 1 (ACSL1), markers for the M1 pro-inflammatory phenotype. Ras-related protein Rab-8B  
159 (Rab8b) which plays a key role in autophagy processes and Embigin (Emb) involved in cellular adhesion  
160 and migration were also found to be upregulated in Poly (I:C)-treated macrophages (**Supp. Data 1**), as  
161 well as branched-chain-amino-acid aminotransferase (Bcat1) which controls metabolic reprogramming  
162 in activated macrophages. Systemic biology analyses established that proteins involved in microglia,  
163 innate immunity and thus in immune response activation are more expressed upon Poly(I:C) (**Figure**  
164 **1B, Cluster 2**).

165 *Poly (I:C) triggers the secretion of pro-inflammatory and anti-tumoral factors by macrophages.*

166 The same approach was then applied to the conditioned medium of NR8383 treated with Poly (I:C) to  
167 analyse the secreted factors (**Figure 2**). The proteomic analysis yielded a total of 845 proteins identified  
168 across all samples. 56 proteins showed a significant difference in LFQ expression between Poly (I:C)-  
169 treated NR8383 macrophages and non-treated macrophages (**Supp. Data 2**). 16 proteins were  
170 downregulated after stimulation with all the concentration of Poly (I:C) compared to the untreated  
171 control (**cluster 1, Figure 2A**). Among these, Sulfhydryl oxidase 1 (Qsox1), involved in tumor cell  
172 invasion and subsequent metastasis was found downregulated in cluster 1 such as CD166, TIMP2 and  
173 AGT known to be involved in astrocytoma (**Figure 2B, Cluster 1**). The second cluster regroups 40  
174 proteins which are more secreted by NR8383 macrophages after a stimulation with Poly (I:C), whatever  
175 the concentration used (**cluster 2, Figure 2A**). Cytokines like CCL2, 3, 4 and 5 or CXCL10, are found  
176 in this cluster. These cytokines are important for immune cell recruitment, immune and inflammatory  
177 response. Several proteins involved in cell death-like Tumor necrosis factor (TNF), an anti-tumoral  
178 factor; Calpain-2 (CAPN2) and Cell division control protein 42 (CDC42) are also more secreted by  
179 NR8383 macrophages after a stimulation with Poly (I:C) (**cluster 2, Figure 2B**). We also identified as  
180 upregulated, Fatty acid-binding protein (Fabp4), involved in the cellular response to the TNF and the  
181 inflammatory response, and also High mobility group protein B1 and B2 (Hmgb1 and Hmgb2) which

182 play an important role during V(D)J recombination. Systemic biology analyses (**Figure 2B, Cluster 2**)  
183 confirm that all up-regulated proteins found in this cluster can inhibit neoplasia and metastasis.  
184 Moreover, Kegg analyses point out that Poly (I:C) triggers proteomic changes both in the cellular  
185 component and in the secreted proteins of macrophages. We can observe a secretion of pro-  
186 inflammatory and anti-tumoral factors increased in Poly (I:C) treated-macrophages. We thus  
187 investigated the anti-tumoral ability of Poly (I:C) combine with PCs inhibitor which has previously  
188 demonstrated abilities to inactivate the tumor and activate macrophages(30).

189 Thereby, we performed an invasion assay on spheroids made of rat C6 glioma cell line and on mixed  
190 spheroids made of both C6 glioma and NR8383 rat macrophages (**Figure 3**). The spheroids were  
191 cultured for 4 days with Poly (I:C) or with conditioned medium (CM) from Poly (I:C)-treated  
192 macrophages combine or not with PCs inhibitor. Their growth and invasion of the matrix by cells  
193 migrating out the initial core were monitored over these 4 days. Spheroids containing only C6 cells  
194 (**Figure 3A.i**) were compared to spheroids containing a mix of C6 and NR8383 cells (**Figure 3A.ii**). As  
195 we described before, we observed a decrease of spheroid growth and invasion after 2 days of treatment  
196 with PCs inhibitor for C6 spheroids and after 3 days of treatment for mixed C6/NR8383 spheroids. No  
197 changes in spheroid growth and invasion were observed after a treatment with Poly (I:C) alone compared  
198 to the control DMSO. The combination of Poly (I:C) and the PCs inhibitor decreases the invasion of  
199 spheroids, but the observed effect is not different from the effect of the inhibitor alone. However, we  
200 identified by mass spectrometry some anti-tumoral factors in the conditioned medium of Poly (I:C)-  
201 treated macrophages (**Figure 2**). Thus, to investigate the anti-tumoral activity of these factors we treated  
202 both types of spheroids with conditioned medium from macrophages previously treated or not with Poly  
203 (I:C). These conditioned media were associated or not with PCs inhibitor to assess the complementarity  
204 of both agents. C6 spheroids and mixed C6/NR8383 spheroids growth and invasion were decreased after  
205 2 days of treatment with conditioned medium from Poly (I:C)-treated macrophages (**Figures 3B.i,**  
206 **3B.ii**). This effect increased progressively across time. Compared to the conditioned medium from  
207 untreated-macrophages, a statistical difference of more than 30% was observed after 4 days of treatment.  
208 No additive effect was observed when PCs inhibitor was combined with conditioned medium from Poly

209 (I:C)-treated macrophages because of the low invasion rate of spheroids. Taken together, invasion assays  
210 and proteomic demonstrated secretion of anti-tumoral factors by macrophages after Poly (I:C) treatment.  
211 We then investigated the impact of anti-tumoral factors secreted by macrophages on the C6 death and  
212 proliferation (**Figure 4**). We measured the exposure of phosphatidylserine (PS) on the outer leaflet of  
213 cell membranes during the apoptotic process and used a DNA-binding dye to differentiate apoptosis  
214 from necrosis after 72h of treatment (**Figure 4A**). C6 glioma cells were treated with temozolomide  
215 (TMZ) as a positive control for apoptosis. Compared to the non-treated cells and positive control, no  
216 signal for exposure of PS in C6 cells was recorded after the different treatments. However, a very high  
217 fluorescence signal due to the DNA dye was observed after a treatment with the conditioned medium  
218 from Poly (I:C) treated-macrophages, associated or not with the PCs inhibitor. This signal reflects a loss  
219 of membrane integrity and therefore cell death by necrosis. Moreover, a BrdU test correlates these  
220 results (**Figure 4B**). Indeed, the proliferation of cells is decreased when the cells are treated with the  
221 conditioned medium from macrophages treated with Poly (I:C). This effect was more significant when  
222 the PCs inhibitor was associated with the conditioned medium from macrophages treated with Poly  
223 (I:C). Finally, to know the approximative molecular weight of the anti-tumoral factors, we performed a  
224 viability assay of C6 cancer cells in presence of the different molecular weight fractions of the  
225 conditioned medium coming from Poly (I:C) stimulated or unstimulated macrophages. We identified  
226 that the fractions containing the anti-tumoral activity are the ones with a molecular weight ranging  
227 between 50-100 kDa (**Supp. Figure 1**).

#### 228 ***Poly (I:C) and PCs inhibitor are complementary for the macrophages reactivation.***

229 A proteomic study was conducted to decipher the molecular impact of the association between Poly  
230 (I:C) and PCs inhibitor on macrophages and their secretion (**Figure 5 & 6**). First, shotgun proteomic  
231 analysis of NR8383 cells yielded 1 717 protein identification across all samples. As a criterion of  
232 significance, we applied an ANOVA test with a significance threshold of  $p < 0.05$ . A heatmap was  
233 created from which 38 proteins showed a significant difference in LFQ expression between treated and  
234 non-treated NR8383 macrophages (**Figure 5A, Supp Data 3**). Two branches separate the Poly (I:C) +/-  
235 PCs inhibitor-treated macrophages to untreated and PCs inhibitor-treated macrophages. Among these

236 proteins, 7 were downregulated in macrophages treated with Poly (I:C), associated or not with PCs  
237 inhibitor (**Figure 5A, cluster 1**). In this protein cluster, we found the transmembrane glycoprotein NMB  
238 (Gpnmb), and the Microphthalmia-associated transcription factor (Mitf), a transcription factor that  
239 regulates the expression of genes with essential roles in cell differentiation, proliferation and survival.  
240 10 proteins are downregulated only after a treatment with Poly (I:C) associated with PCs inhibitor  
241 (**Figure 5A, cluster 2**). Among these proteins, we found 2,5-phosphodiesterase 12 (Pde12) a negative  
242 regulator for antiviral and antitumor functions induced by interferons and Eukaryotic translation  
243 initiation factor 3 subunit E (Eif3e) which is essential for proliferation and survival of glioblastoma cells.  
244 In a third cluster, we found upregulated proteins after a treatment with Poly (I:C), associated or not with  
245 PCs inhibitor. In this cluster, we find several proteins previously described as upregulated after a Poly  
246 (I:C) treatment (**Figure 1**), as Gbp2, Tap1, Mx1 and Oasl involved in innate immune response and Nos2  
247 marker for the M1 pro-inflammatory phenotype. We also found UDP-glucose 6-dehydrogenase (Ugdh),  
248 a component of the extracellular matrix and F-actin-capping protein subunit alpha-1 (Capza1) which  
249 regulate actin cytoskeleton remodeling.

250 The same approach was then applied to the conditioned medium of NR8383 treated with Poly (I:C)  
251 associated or not with PCs inhibitor to analyse the secreted factors (**Figure 6, Supp Data 4**). The  
252 proteomic analysis yielded a total of 1 152 proteins identified across all samples. 66 proteins showed a  
253 significant difference in LFQ expression between treated NR8383 macrophages and non-treated  
254 macrophages. Two branches separate the PCs inhibitor +/- Poly (I:C) treated macrophages to untreated  
255 and Poly (I:C) treated macrophages. Compared to the untreated control, 39 proteins were downregulated  
256 after stimulation with PCs inhibitor, associated or not with Poly (I:C). Conditioned medium from cells  
257 treated with only Poly (I:C) show the same expression profile than the untreated cells (**Figure 6A**). The  
258 down-secretion by macrophages of migration-related protein macrophage migration inhibitory factor  
259 (MIF), also known to be involved in glioblastoma progression, was previously described after treatment  
260 with PCs inhibitor(30). In this cluster, we also found Qsox1, as described in **Figure 2A**. Several proteins  
261 involved in different tumorigenesis processes are down-secreted by macrophages after treatment with  
262 PCs inhibitor. Among these proteins, we identified Disintegrin and metalloproteinase domain-



263 containing protein 17 (Adam17), known to promotes glioma cell malignant phenotype and Branched-  
264 chain-amino-acid aminotransferase (Bcat1) which promotes cell proliferation in glioma.  
265 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta (Camk2d) plays a critical role in the  
266 invasion and metastasis properties of glioma cells and is down-secreted by macrophages after treatment  
267 with PCs inhibitor. Insulin-like growth factor II (Igf2) which plays a role in reprogramming macrophage  
268 into the anti-inflammatory phenotype was also down-secreted by macrophages after PCs inhibitor  
269 treatment. A second protein cluster can be highlighted in which we found 25 proteins over-expressed  
270 after a treatment with PCs inhibitor associated with Poly (I:C) (**cluster 2, Figure 6A**). 12 of these are  
271 also over-expressed after treatment with PCs inhibitor but not after a treatment with Poly (I:C) (**cluster**  
272 **2.1, figure 6A**). Among these proteins, we found Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15 (Usp15)  
273 which positively regulates type I interferon responses and thereby antiviral immune response. The other  
274 13 proteins of the second cluster are over-expressed after a treatment with Poly (I:C) and after treatment  
275 with both Poly (I:C) and PCs inhibitor (**cluster 2.2, Figure 6A**). Among these proteins, we found  
276 Cxcl10, Ccl3, Ccl4 and Tnf several cytokines described above (**Figure 2A**). We also found, as described  
277 above (**Figure 2A**) Gbp2 and Hnrnpa2b1, which initiate and amplify the innate immune response, and  
278 Inhba M1 pro-inflammatory phenotype marker.

279 Taken together, these results show a complementarity between Poly (I:C) and PCs inhibitor in the  
280 macrophages reactivation. The Poly (I:C) triggers more proteins changes in the cell component than the  
281 PCs inhibitor and, on the contrary, PCs inhibitor triggers more changes in the secretion profile of  
282 macrophages. Besides, several proteins show expression changes only when macrophages are stimulated  
283 with both Poly (I:C) and PCs inhibitor (**cluster 2, Figure 5A and cluster 2, Figure 6A**). Moreover, we  
284 showed with immunofluorescence on mixed macrophages-cancer cells spheroids a decrease in the  
285 expression of Arginase 1 and CD206, both markers of the pro-tumoral phenotype, when they were  
286 cultivated in presence of the conditioned medium from Poly (I:C)-treated macrophages. The numbers  
287 of CD206+ and arginase+ macrophages seem to be lower when PCs inhibitor was combined with  
288 conditioned medium from Poly (I:C) treated macrophages (**Figure 7**). We finally confirmed on

289 spheroids made of NCH82 human glioma cells that the Poly (I:C) and PCs inhibitor are highly efficient  
290 on tumor invasion decrease 4 days after treatment (**Supp. Figure 2**).

291

## 292 **DISCUSSION**

293 In the present study, we have demonstrated, based on shot-gun proteomic studies, that Poly(I:C) at a  
294 concentration ranging between 10 and 15  $\mu\text{g/ml}$  of Poly (I:C) change the phenotype of macrophages.  
295 Their immune functions seem to be activated and their phenotype is close to a pro-inflammatory  
296 phenotype. A lower concentration (5  $\mu\text{g/ml}$ ) is not enough to observe this activation state. This pro-  
297 inflammatory phenotype is based on an increase of expression of proteins involved in self-antigen  
298 presentation (Tap1, Tap2), the implication in anti-viral response through interferon intracellular  
299 signaling activation, Nitric oxide synthase (NOS2) and long-chain acyl-CoA synthetase 1 (ACSL1) level  
300 increase, as well as the involvement of factors such like Embigin known being implicated in cellular  
301 adhesion and migration or the branched-chain-amino-acid aminotransferase involved in metabolic  
302 reprogramming in activated macrophages. Similarly, analyses of the secreted factors revealed the  
303 presence of pro-inflammatory cytokines (CCL2, CCL3, CCL4 and CCL5 or CXCL10) and TNF. These  
304 results are in line with the ones obtained on rodent or human poly(I:C)-stimulated macrophage showing  
305 the production of TNF and or CXCL-10 (IP-10) (32,33). CXCL10 is known to play a significant role in  
306 leukocyte homing to inflamed tissues, increased production of CXCL10 may exacerbate inflammation  
307 (32). Thus, augmented CXCL10 production by macrophages, may further exacerbate the inflammatory  
308 response and increase T cell recruitment which is expected in oncoimmune therapy. Based on these  
309 results, we tested the effects of such activated medium issued from Poly(I:C) treated macrophages on  
310 glioma cells in 3D culture. Compared to the conditioned medium from untreated-macrophages, a  
311 statistical difference of invasion of glioma cells of more than 30% was observed after 4 days of  
312 treatment. Thus, invasion assays and proteomic demonstrated secretion of anti-tumoral factors by  
313 macrophages after Poly (I:C) treatment. We confirmed the relevance of the conditioned medium from  
314 Poly (I:C) treated-macrophages with several biological essays. We established that glioma proliferation  
315 is decreased when the glioma cells are treated with the conditioned medium from macrophages treated

316 with Poly (I:C). These results are in the same line as the ones of Maeda and collaborators (34). This  
317 team has demonstrated that macrophages differentiated in the presence of pancreatic tumor cells  
318 (PANC1 and PT45) and treated with Poly (I:C) secrete more CXCL10 and CCL5 which trigger the  
319 cytotoxic activity of TC-M $\phi$  against cancer cells (34). We have also demonstrated the efficacy of Poly  
320 (I:C) and PCs inhibitor on the invasion decrease of spheroids made with human glioma cell line NCH82.  
321 In our work, we identified that the fractions containing the anti-tumoral activity in the conditioned  
322 medium correspond to fractions with a molecular weight ranging between 50-100 kDa. We finally  
323 established using immunofluorescence studies with anti-CD68, anti-arginase and anti-CD206 that the  
324 combined treatment leads to the activation of TAMs with an M1 phenotype directly into the tumor  
325 spheroids whereas TAMs express an M2-like phenotype without treatment.

326 Altogether, we established that the combination of Poly(I:C) macrophages conditioned medium and the  
327 PCs inhibitor allowed the reactivation of tumor associated macrophages which consequently inhibits  
328 tumor proliferation and invasion. We finally tried to hunt in Poly(I:C) macrophages conditioned medium  
329 whether extracellular vesicles (EVs) can possess this anti-tumoral activity (**Supp. Figure 3**) as we  
330 previously showed with microglia cells (16,35). EVs may present anti-tumoral activity which may be  
331 higher compared to the conditioned medium depleted of EVs but slower than the complete conditioned  
332 medium (hypothesis illustrated on **Supp. Figure 3**). These preliminary results open the door for an  
333 innovative therapeutic strategy based on EVs from Poly (I:C)-stimulated macrophages incorporating  
334 PCs inhibitor.

335

## 336 **MATERIALS AND METHODS**

### 337 **Experimental design and statistical rationale.**

338 Shotgun proteomics experiments were conducted in biological triplicates (n=3). Spheroid studies were  
339 conducted in biological triplicates (n=3) as well as all biological assays. For the proteomics statistical  
340 analysis, extracted proteins or secreted medium proteins presenting as significant by the ANOVA test  
341 analysis were used (p-value < 0.05). Normalization was achieved using a Z-score with matrix access by

342 rows. For invasion tests, results obtained were depicted through a box plot figure. Significant differences  
343 were identified using Tukey's multiple comparisons test where: \* =  $P \leq 0.05$ ; \*\* =  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* =  $P \leq$   
344  $0.001$ ; \*\*\*\* =  $P \leq 0.0001$ .

### 345 **Chemicals and Reagents**

346 Water ( $H^2O$ ), formic acid (FA), acetonitrile (ACN), and trifluoroacetic acid (TFA) were obtained from  
347 Biosolve B. V. (Dieuze, France). 2,5 dihydroxybenzoic acid (DHB), ProteoMass MALDI Calibration  
348 kit, DL-dithiothreitol (DTT), thiourea, Temozolomide (TMZ), PCs inhibitor (ref. 537076) and  
349 iodoacetamide (IAA) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).  
350 LysC/Trypsin was purchased from Promega (Charbonnières, France). Polylysine-coated slides,  
351 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Ham's F12K, heat-inactivated fetal bovine serum  
352 (FBS), trypsin, and phosphate buffer saline (PBS), penicillin and streptomycin were purchased from  
353 Thermo-Scientific (Braunschweig, Germany). Poly (I:C) was purchased from Invivogen (San Diego,  
354 California, USA). NR8383 is a rat alveolar macrophage cell line (CRL-2192) obtained from ATCC  
355 (Manassas, Virginia, USA). The rat C6 glioma cell line was kindly provided by Prof. Dr. Bernd Kaina  
356 (Institute of Toxicology, University Medical Center, Mainz, Germany).

### 357 **Cell culture.**

358 Rat alveolar NR8383 macrophages were cultured in Ham's F12K medium supplemented with 15% fetal  
359 bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (100 units per ml). Rat glioma C6 cells were cultured in  
360 DMEM and supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine (2 mM), and 1% penicillin/streptomycin  
361 (100 units per ml). All cell lines were cultured at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>).

### 362 **Cell supernatant collection and total protein extraction.**

363 NR8383 cells were plated on sterile 24 well plates and cultured until they reached confluence. For  
364 stimulation, cells were starved overnight in Ham's F12K medium supplemented with 2% FBS. Cells  
365 were then stimulated in serum-free medium with different concentrations of Poly (I:C) (5, 10, or 15  
366 µg/ml). Also, cells were stimulated with 100 µM of PCs inhibitor-associated or not with 10 µg/ml of  
367 Poly (I:C) in serum-free medium. At 24h, cell supernatants were centrifuged at 500 x g and passed

368 through a 0.22- $\mu$ m filter to remove cells and debris. Four hundred microliters of the cell supernatant  
369 were collected for each condition. Cells were washed three times with ice-cold PBS and then lysed with  
370 RIPA buffer for total protein extraction (150mM NaCl, 50mM Tris, 5mM EGTA, 2mM EDTA, 100mM  
371 NaF, 10mM sodium pyrophosphate, 1% NP40, 1mM PMSF, and 1X protease inhibitors). After 3x30sec  
372 sonication, cell debris was removed by centrifugation (16 000 x g, 10min, 4 °C), supernatants were  
373 collected and protein concentrations were measured using a Bio-Rad Protein Assay Kit, according to  
374 the manufacturer's instructions.

### 375 **Filter-aided Sample Preparation (FASP).**

376 The samples were processed using a shotgun bottom-up proteomic approach. Total protein extract (0.04  
377 mg) was used for FASP analysis as described previously (36–38). We performed FASP using Microcon  
378 devices YM-10 from Millipore (Burlington, Massachusetts, USA) before adding Lys-C trypsin for  
379 protein digestion (40  $\mu$ g/ml in 0.05 M Tris-HCl). An equivalent volume of reduction solution (DTT 0.1  
380 M) was added to each sample followed by an incubation step at 95°C for 15min. Then the samples were  
381 processed following the filter-aided sample preparation (FASP) protocol using a filter with a nominal  
382 molecular weight limit of 10 000 Da (Amicon Ultra-0.5 10K, Millipore). Briefly, each sample was  
383 mixed with 200  $\mu$ L of denaturant buffer (8 M urea, Tris/HCl 0.1 M, pH 8.5) and transferred to FASP  
384 filters. The samples were centrifuged at 14 000 x g, 20°C, for 15min. For the alkylation step, 100  $\mu$ L of  
385 0.05 M of iodoacetamide in denaturant buffer was added to each sample, followed by incubation in the  
386 dark for 20min at room temperature. Samples were washed twice with 100  $\mu$ L of denaturant buffer  
387 followed by two washes with 100  $\mu$ L of buffer AB (Ammonium bicarbonate 0.05 M). After each  
388 washing step, centrifugation was performed at 14 000 x g, 20°C, for 15min. The proteins were digested  
389 by adding 40  $\mu$ L of trypsin at 40  $\mu$ g/ml in buffer AB, and then incubated at 37°C overnight. The peptides  
390 were eluted by adding 50  $\mu$ L of saline solution (NaCl 0.5 M) and centrifuged at 14 000 x g, 20°C, for  
391 15min. The digestion was stopped by adding 10  $\mu$ L of TFA 5%. The samples were desalted using ZipTip  
392 C-18 (Millipore) and eluted with a solution of ACN/0.1% TFA (7:3, v/v). The samples were dried with  
393 SpeedVac and resuspended in 20  $\mu$ L of ACN/0.1% formic acid (0.2:9.8, v/v) just before processing  
394 using LC-MS/MS. Experiments were done in biological triplicate (n=3).

395 **Proteomics analysis of the cell supernatants.**

396 Supernatants volume obtained from NR8383 macrophages treated or not with PCs inhibitor or/and Poly  
397 (I:C) during 24h were reduced to 100 µl in a SpeedVac. Cell supernatants were denatured with 2 M urea  
398 in 10 mM HEPES, pH 8.0 by sonication on ice. The proteins were reduced with 10 mM DTT for 40min  
399 at 56°C followed by alkylation with 55 mM iodoacetamide for 40min in the dark. The iodoacetamide  
400 was quenched with 100 mM thiourea. The proteins were digested with 1 µg LysC/Trypsin mixture  
401 (Promega) overnight at 37°C. The digestion was stopped with 0.5% TFA. The samples were desalted  
402 using ZipTip C-18 (Millipore) and eluted with a solution of ACN/0.1% TFA (7:3, v/v). The samples  
403 were dried with SpeedVac and resuspended in 20 µL of ACN/0.1% formic acid (0.2:9.8, v/v) just before  
404 processing using LC-MS/MS. Experiments were done in biological triplicate (n=3).

405 **LC-MS/MS analysis.**

406 Mass spectrometry proteomics analysis of digested proteins was performed using a nano Acquity UPLC  
407 system (Waters) coupled with the Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific) via a  
408 nanoelectrospray source. The samples were separated using online reversed-phase, using a  
409 preconcentration column (nanoAcquity Symmetry C18, 5 µm, 180 µm x 20 mm) and an analytical  
410 column (nanoAcquity BEH C18, 1.7 µm, 75 µm x 250 mm). The peptides were separated by applying  
411 a linear gradient of acetonitrile in 0.1% formic acid (5%-35%) for 2h, at a flow rate of 300 nl/min. The  
412 Q- Exactive was operated in data-dependent mode defined to analyze the ten most intense ions of MS  
413 analysis (Top 10). The MS analysis was performed with an m/z mass range between 300 to 1 600,  
414 resolution of 70 000 FWHM, AGC of 3e6 ions and maximum injection time of 120ms. The MS/MS  
415 analysis was performed with an m/z mass range between 200 to 2 000, AGC of 5e4 ions, maximum  
416 injection time of 60 ms and resolution set at 17 500 FWHM.

417 **Protein ID and Data analysis.**

418 Proteins were identified by comparing all MS/MS data with the proteome database of the complete  
419 reviewed proteome of *Rattus norvegicus* (Uniprot, release July 2018, 8 054 entries), using the MaxQuant  
420 software version 1.6.1.0 (39,40). Lys-C trypsin specificity was used for the digestion mode with two

421 missed cleavages. Carbamidomethylation of cysteines was set as a fixed modification. N-terminal  
422 acetylation and methionine oxidation were selected as the variable modifications. For MS spectra, an  
423 initial mass tolerance of 6 ppm was selected, and the MS/MS tolerance was set to 20 ppm for HCD data  
424 (41). For identification, the FDR at the peptide spectrum matches (PSMs) and protein level was set to  
425 0.01. Relative, label-free quantification of proteins was performed using the MaxLFQ algorithm  
426 integrated into MaxQuant with the default parameters (42). Analysis of the proteins identified was  
427 performed using Perseus software (<http://www.perseus-framework.org/>) (version 1.6.2.1) (43). The file  
428 containing the information from identification was used with hits to the reverse database, and proteins  
429 identified with modified peptides and potential contaminants were removed. Then, the LFQ intensity  
430 was logarithmized ( $\log_2[x]$ ). Categorical annotation of rows was used to define different groups  
431 depending on the concentration of PCs inhibitor used (0, 50, 100, 150  $\mu\text{M}$ ). Multiple-samples tests were  
432 performed using an ANOVA test with a p-value of 0.05 and preserved grouping in randomization. The  
433 results were normalized by Z-score and represented as hierarchical clustering. Functional annotation  
434 and characterization of identified proteins were obtained using PANTHER software (version 14.0,  
435 <http://www.pantherdb.org>) and STRING (version 10.5, <http://string-db.org>).

#### 436 **Sub-network Enrichment Pathway Analysis**

437 Using Elsevier's Pathway Studio (version 11.0/ /Elsevier), all relationships between the differentially  
438 expressed proteins among all conditions were depicted based on the Ariadne ResNet (44). For proteins  
439 identified in the shotgun analysis post-stimulation of cell lines with PCs inhibitor, the Subnetwork  
440 Enrichment Analysis (SNEA) algorithm was used to detect the statistically significant altered biological  
441 pathways in which the identified proteins are involved. This algorithm uses Fisher's statistical test to  
442 detect any non-random associations between two categorical variables organized by a specific  
443 relationship. Also, this algorithm starts by creating a central "seed" from all the relevant identities in the  
444 database and builds connections with associated entities based on their relationship with the seed. SNEA  
445 compares the sub-network distribution to the background distribution using one-sided Mann-Whitney  
446 U- Test and calculates a p-value; thus, representing a statistical significance between different  
447 distributions. In all analyses that we performed, the GenBank ID was used to form experimental groups

448 based on the different conditions present for analysis. The pathway networks were reconstructed based  
449 on biological processes and molecular functions for every single protein, along with its associated  
450 targets.

#### 451 **Data and Software Availability**

452 Macrophages proteomics data including MaxQuant files and annotated MS/MS have been deposited to  
453 the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier  
454 PXD020258 with a Username: reviewer68417@ebi.ac.uk and Password: mRlwauBi.

455

#### 456 **Biological assays**

##### 457 **Generation of complete and fractions NR8383 supernatants.**

458 NR8383 macrophages were treated with or without 10 µg/ml of Poly (I:C) in complete Ham's F12K for  
459 24h. At 24h, cell supernatants were centrifuged at 200 x g and passed through a 0.22 µm filter to remove  
460 cells and debris. Supernatants were then used for spheroids stimulation.

461 Supernatants were also fractionated with Amicon® Ultra Centrifugal Filters. The different molecular  
462 weight cut off were used (100, 50, 30, 10 and 3 kDa) according to the manufacturer's instruction. The  
463 different fractions were used to stimulate C6 cells.

##### 464 **Isolation of EVs from NR8383 supernatant**

465 After 24h of stimulation with 10 µg/ml Poly (I:C), EVs isolation was performed with multiple  
466 centrifugation steps to eliminate debris and other macro vesicles, with final ultracentrifugation steps  
467 using Optima XPN80, Ultracentrifuge—Beckman Coulter with 70.1 Ti rotor, to obtain EVs pellet. Once  
468 EVs were isolated, we have characterized and quantified them with NanoSight.

##### 469 **Spheroid generation and embedding in a collagen matrix.**

470 C6 rat glioma cells associate or not with NR8383 were resuspended in complete Ham's F12K medium  
471 supplemented with 5% of collagen mixture at the final concentration of 8,000 cells of each cell line in  
472 20 µl. For human glioma spheroids generation, we used 8 000 NCH82 glioma cells. The collagen



473 mixture was prepared by mixing 2 ml of PureCol® bovine collagen type I solution (3 mg/ml; Advanced  
474 BioMatrix) with 250 µl of 10X minimal essential medium (MEM) (Sigma-Aldrich) and 500 µl of  
475 sodium hydroxide 0.1 M. Cells were cultivated in hanging-drop on the lid of a petri dish with PBS during  
476 72h at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>). The newly formed C6 spheroids and mixed  
477 C6/NR8383 spheroids were then implanted in the center of each well of a 24-well plate coated with a  
478 collagen mixture described before (one spheroid per well in 400 µl of collagen mixture per well). After  
479 cell spheroid embedding, the plate was incubated for 30 min at standard culture conditions to solidify  
480 the collagen. Thereafter 400 µl of complete Ham's F12K medium or conditioned medium from NR8383  
481 was overlaid on the collagen matrix in each well and supplemented with 100 µM of PCs inhibitor. The  
482 complete system was incubated for a total of 4 to 6 days. Experiments were done in biological triplicate  
483 (n=3). Human spheroids were treated with either 10 µg/ml Poly (I:C) (n=2) alone or with 200 or 300  
484 µM of PCs inhibitor (n=3). The complete system was incubated for a total of 4. For the stimulation with  
485 EVs, 10e8 EVs isolated from conditioned media from untreated macrophages and Poly (I:C) pre-treated  
486 macrophages were added to the culture media. Conditioned media depleted of EVs was also used for  
487 mixed spheroids stimulation.

#### 488 **Quantification of spheroid size and invaded area.**

489 After the spheroids were embedded, cell invasion of the spheroid was monitored by digital photography  
490 using a Leica DM IL LED Fluo inverted light microscope (Leica DFC450C camera) at room  
491 temperature, with the Leica Application Suite (LAS V4.4). Images were acquired every day (day 0 =  
492 time of embedding in collagen; pictures were taken immediately after embedding) using a 4x/0.10  
493 objective. Image processing and quantification of spheroids and invasion areas were performed using  
494 in-house software. This in-house software takes into account cell density and not the limits of cell  
495 migration in the collagen matrix, which is observed independently. The implemented algorithm uses  
496 local fluctuations of the image intensity for automated estimation of the invasion magnitude. It is robust  
497 enough to handle micrographs of different generation methods and various qualities without the concept  
498 of an invasive front of the spheroids (24,45). Data of areas are normalized for each day to the relative  
499 size of day zero and transformed into the percentage of invasion.

## 500 **Macrophages reactivation quantification by Immunofluorescence on C6/NR8383 spheroids.**

501 Mixed C6/NR8383 spheroids were generated as described before. They were treated with 10 µg/ml of  
502 Poly (I:C) or with 100 µM of PCs inhibitor. Spheroids were also treated with CM from non-treated or  
503 from Poly (I:C)-treated macrophages supplemented or not with PCs inhibitor. After 72h of stimulation  
504 mixed spheroids were rinsed with PBS before fixation with 4% paraformaldehyde for 1 hour and then  
505 washed 3 times in PBS. They were implanted in gelatin 175 mg/mL and frozen at -20°C and -80°C.  
506 Cryostat (Leica Microsystems, Nanterre, France) was used to cut the spheroids with a thickness of 8 µm  
507 per tissue section. The sections were then thaw-mounted on Polylysine-coated slides. Tissue sections  
508 were incubated in blocking buffer (0.01% Triton, 1% Normal Donkey Serum (NDS) and 1% BSA in  
509 PBS) for 1 hour to avoid nonspecific background staining. Mixed spheroids were then incubated  
510 overnight at 4°C with primary antibodies directed against rabbit anti-CD206 (1:1 000, from Abcam),  
511 goat anti-arginase 1 (1:500, from Novus) and mouse anti-CD68 (1:50, from bio-rad). After 2 washes  
512 for 1 min in PBS/Tween 20 0.1% and 3 washes for 5 min in PBS, the mixed spheroids were incubated  
513 for 1 hour at room temperature with secondary donkey anti-mouse antibody conjugated to Alexa Fluor  
514 555 or with secondary donkey anti-rabbit or donkey anti-goat IgG antibody conjugated to Alexa Fluor  
515 488 diluted in blocking buffer (dilution 1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Mixed spheroids were  
516 rinsed with PBS/Tween 20 0.1% and PBS and counterstained with Hoechst (1:10 000 from euromedex)  
517 for 20 min at 4 °C. Finally, after the last PBS washing, spheroids were mounted on a slide with Dako  
518 Fluorescent Mounting Medium (Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA). Control experiments were  
519 performed following the same immunostaining protocol without the primary antibody incubation.

## 520 **ACKNOWLEDGMENTS**

521 This research was supported by the funding from Ministère de l'enseignement Supérieur, de la  
522 Recherche et de l'innovation (MESRI), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale  
523 (Inserm), région Hauts-de-France and Université de Lille.

## 524 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

525 Conceptualization, F.R. & M.S. Methodology .M.D, M.R, L.Z, ARV, M.S; Validation, M.D., M.R.  
526 Formal Analysis, M.S., M.R., M.D. Resources, M.S. I.F.; Data curation, M.D., M.S., S.A., F.R., M.R.

527 Writing M.S., M.D., M.R. – Original Draft. M.S., M.R., M.D. Writing - Review & Editing, M.S. M.D.,  
528 F.R., I.F.; Supervision. M.S. Project Administration, M.S.

529 **COMPETING INTERESTS**

530 The authors declare no competing interests.

531

532 **REFERENCES**

- 533 1. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang T-H, et al. The Immune  
534 Landscape of Cancer. *Immunity*. 2018 Apr;48(4):812-830.e14.
- 535 2. Heiland DH, Haaker G, Delev D, Mercas B, Masalha W, Heynckes S, et al. Comprehensive  
536 analysis of PD-L1 expression in glioblastoma multiforme. *Oncotarget*. 2017;8(26):42214–25.
- 537 3. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages  
538 as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(7):399–416.
- 539 4. Jaaks P, Bernasconi M. The proprotein convertase furin in tumour progression. *Int J Cancer*.  
540 2017 Aug;141(4):654–63.
- 541 5. Seidah NG. The proprotein convertases in health and disease. *Qatar Found Annu Res Forum*  
542 *Proc*. 2012 Oct;(2012):AESNP11.
- 543 6. Day R, Salzet M. The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity, and the search for genetic  
544 switches: Redefining the diffuse neuroendocrine system. Vol. 23, *Neuroendocrinology Letters*.  
545 2002. p. 447–51.
- 546 7. Duckert P, Brunak S, Blom N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng*  
547 *Des Sel*. 2004 Jan;17(1):107–12.
- 548 8. Scamuffa N, Calvo F, Chrétien M, Seidah NG, Khatib A-M. Proprotein convertases: lessons  
549 from knockouts. *FASEB J*. 2006 Oct;20(12):1954–63.
- 550 9. Martín MG, Lindberg I, Solorzano–Vargas RS, Wang J, Avitzur Y, Bandsma R, et al.  
551 Congenital Proprotein Convertase 1/3 Deficiency Causes Malabsorptive Diarrhea and Other  
552 Endocrinopathies in a Pediatric Cohort. *Gastroenterology*. 2013 Jul;145(1):138–48.
- 553 10. Marcinkiewicz M.  $\beta$ APP and Furin mRNA Concentrates in Immature Senile Plaques in the  
554 Brain of Alzheimer Patients. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002 Sep;61(9):815–29.
- 555 11. Khatib A-M, Siegfried G, Chrétien M, Metrakos P, Seidah NG. Proprotein Convertases in  
556 Tumor Progression and Malignancy. *Am J Pathol*. 2002 Jun;160(6):1921–35.

- 557 12. Vergara D, Merlot B, Lucot JP, Collinet P, Vinatier D, Fournier I, et al. Epithelial-  
558 mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2010 May 1;291(1):59–66.
- 559 13. Simeone P, Trerotola M, Franck J, Cardon T, Marchisio M, Fournier I, et al. The multiverse  
560 nature of epithelial to mesenchymal transition [Internet]. Vol. 58, *Seminars in Cancer Biology*.  
561 Academic Press; 2019 [cited 2020 Jul 2]. p. 1–10. Available from:  
562 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30453041/>
- 563 14. Longuespée R, Couture F, Levesque C, Kwiatkowska A, Desjardins R, Gagnon S, et al.  
564 Implications of proprotein convertases in ovarian cancer cell proliferation and tumor  
565 progression: Insights for pace4 as a therapeutic target. *Transl Oncol* [Internet]. 2014;7(3):410–  
566 9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2014.04.008>
- 567 15. D’Anjou F, Routhier S, Perreault JP, Latil A, Bonnel D, Fournier I, et al. Molecular validation  
568 of pace4 as a target in prostate cancer. *Transl Oncol.* 2011;4(3):157–72.
- 569 16. Murgoci AN, Cizkova D, Majerova P, Petrovova E, Medvecky L, Fournier I, et al. Brain-  
570 Cortex Microglia-Derived Exosomes: Nanoparticles for Glioma Therapy. *ChemPhysChem.*  
571 2018;
- 572 17. Coppola JM, Bhojani MS, Ross BD, Rehemtulla A. A Small-Molecule Furin Inhibitor Inhibits  
573 Cancer Cell Motility and Invasiveness. *Neoplasia.* 2008 Apr;10(4):363–70.
- 574 18. Ghisoli M, Barve M, Mennel R, Lenarsky C, Horvath S, Wallraven G, et al. Three-year Follow  
575 up of GMCSF/bi-shRNA furin DNA-transfected Autologous Tumor Immunotherapy (Vigil) in  
576 Metastatic Advanced Ewing’s Sarcoma. *Mol Ther.* 2016 Aug 1;24(8):1478–83.
- 577 19. Oh J, Barve M, Matthews CM, Koon EC, Heffernan TP, Fine B, et al. Phase II study of Vigil®  
578 DNA engineered immunotherapy as maintenance in advanced stage ovarian cancer. *Gynecol*  
579 *Oncol.* 2016;143(3):504–10.
- 580 20. Uhm JH, Ballman K V., Wu W, Giannini C, Krauss JC, Buckner JC, et al. Phase II evaluation  
581 of gefitinib in patients with newly diagnosed grade 4 astrocytoma: Mayo/north central cancer

- 582 treatment group study n0074. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011 Jun 1;80(2):347–53.
- 583 21. Lansac G, Dong W, Dubois CM, BenLarbi N, Afonso C, Fournier I, et al. Lipopolysaccharide  
584 mediated regulation of neuroendocrine associated proprotein convertases and neuropeptide  
585 precursor processing in the rat spleen. *J Neuroimmunol*. 2006;171(1–2):57–71.
- 586 22. Refaie S, Gagnon S, Gagnon H, Desjardins R, D’Anjou F, D’Orléans-Juste P, et al. Disruption  
587 of proprotein convertase 1/3 (PC1/3) expression in mice causes innate immune defects and  
588 uncontrolled cytokine secretion. *J Biol Chem*. 2012;287(18):14703–17.
- 589 23. Gagnon H, Refaie S, Gagnon S, Desjardins R, Salzet M, Day R. Proprotein Convertase 1/3  
590 (PC1/3) in the Rat Alveolar Macrophage Cell Line NR8383: Localization, Trafficking and  
591 Effects on Cytokine Secretion. *PLoS One*. 2013;8(4):1–16.
- 592 24. Duhamel M, Rose M, Rodet F, Murgoci AN, Zografidou L, Régnier-Vigouroux A, et al.  
593 Paclitaxel Treatment and Proprotein Convertase 1/3 (PC1/3) Knockdown in Macrophages is a  
594 Promising Antiglioma Strategy as Revealed by Proteomics and Cytotoxicity Studies. *Mol Cell  
595 Proteomics*. 2018 Jun;17(6):1126–43.
- 596 25. Duhamel M, Rodet F, Delhem N, Vanden Abeele F, Kobeissy F, Nataf S, et al. Molecular  
597 Consequences of Proprotein Convertase 1/3 (PC1/3) Inhibition in Macrophages for Application  
598 to Cancer Immunotherapy: A Proteomic Study. *Mol Cell Proteomics* [Internet].  
599 2015;14(11):2857–77. Available from:  
600 <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M115.052480>
- 601 26. Duhamel M, Rodet F, Murgoci AN, Desjardins R, Gagnon H, Wisztorzski M, et al. The  
602 proprotein convertase PC1/3 regulates TLR9 trafficking and the associated signaling pathways.  
603 *Sci Rep*. 2016;6(September 2015):1–13.
- 604 27. Rodet F, Capuz A, Ozcan B-A, Le Beillan R, Raffo-Romero A, Kobeissy F, et al. PC1/3 KD  
605 Macrophages Exhibit Resistance to the Inhibitory Effect of IL-10 and a Higher TLR4  
606 Activation Rate, Leading to an Anti-Tumoral Phenotype. *Cells*. 2019;8(1490).

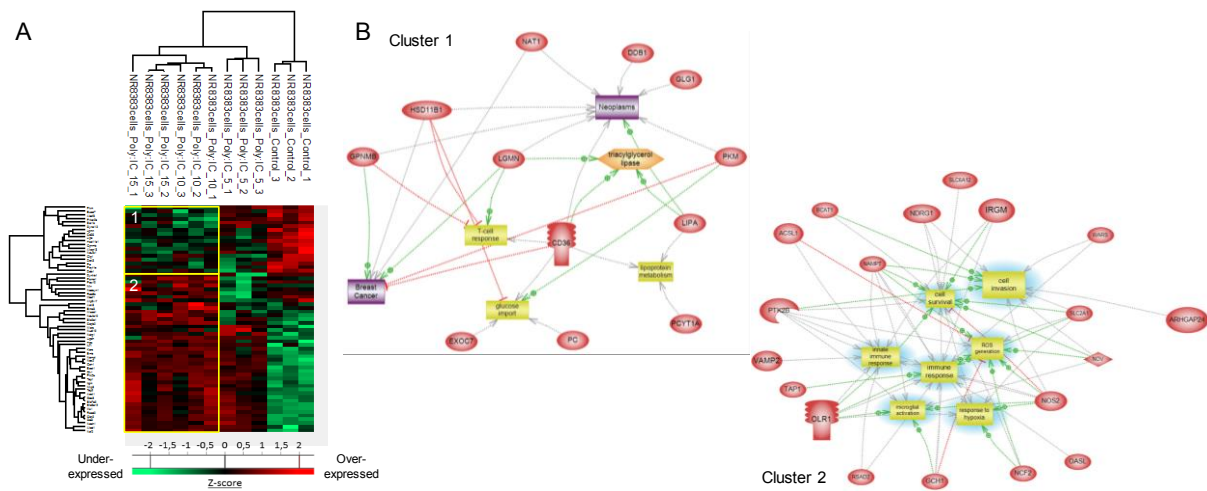
- 607 28. Pesu M, Watford WT, Wei L, Xu L, Fuss I, Strober W, et al. T-cell-expressed proprotein  
608 convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance. *Nature*.  
609 2008;455(7210):246–50.
- 610 29. Oksanen A, Aittomäki S, Jankovic D, Ortutay Z, Pulkkinen K, Hämäläinen S, et al. Proprotein  
611 Convertase FURIN Constrains Th2 Differentiation and Is Critical for Host Resistance against  
612 *Toxoplasma gondii* . *J Immunol* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2020 Jul 2];193(11):5470–9.  
613 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25355923/>
- 614 30. Rose M, Duhamel M, Aboulouard S, Kobeissy F, Le Rhun E, Desmons A, et al. The Role of a  
615 Proprotein Convertase Inhibitor in Reactivation of Tumor-Associated Macrophages and  
616 Inhibition of Glioma Growth. *Mol Ther - Oncolytics* [Internet]. 2020;17(June):31–46.  
617 Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.03.005>
- 618 31. Kees T, Lohr J, Noack J, Mora R, Gdynia G, Tödt G, et al. Microglia isolated from patients  
619 with glioma gain antitumor activities on poly (I:C) stimulation. *Neuro Oncol*. 2012;14(1):64–  
620 78.
- 621 32. Lyons C, Fernandes P, Fanning LJ, Houston A, Brint E. Engagement of Fas on Macrophages  
622 Modulates Poly I:C Induced Cytokine Production with Specific Enhancement of IP-10.  
623 Spencer J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Apr 7 [cited 2020 Jul 2];10(4):e0123635.  
624 Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0123635>
- 625 33. Cui WY, Zhao S, Polanowska-Grabowska R, Wang J, Wei J, Dash B, et al. Identification and  
626 characterization of Poly(I:C)-induced molecular responses attenuated by nicotine in mouse  
627 macrophages. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2020 Jul 2];83(1):61–72. Available  
628 from: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/early/2012/10/01/mol.112.081497>
- 629 34. Maeda A, Digifico E, Andon FT, Mantovani A, Allavena P. Poly(I:C) stimulation is superior  
630 than Imiquimod to induce the antitumoral functional profile of tumor-conditioned  
631 macrophages. *Eur J Immunol* [Internet]. 2019 May 28 [cited 2020 Jul 2];49(5):801–11.  
632 Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/eji.201847888>

- 633 35. Murgoci AN, Duhamel M, Raffo-Romero A, Mallah K, Aboulouard S, Lefebvre C, et al.  
634 Location of neonatal microglia drives small extracellular vesicles content and biological  
635 functions in vitro. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2020;9(1). Available from:  
636 <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1727637>
- 637 36. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for  
638 proteome analysis. *Nat Methods*. 2009 May;6(5):359–62.
- 639 37. Wiśniewski JR. Filter-Aided Sample Preparation. In: *Methods in Enzymology*. 2017. p. 15–27.
- 640 38. Wiśniewski JR. Quantitative Evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and  
641 Multienzyme Digestion FASP Protocols. *Anal Chem*. 2016 May;88(10):5438–43.
- 642 39. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-  
643 range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* [Internet].  
644 2008 Dec 30 [cited 2016 Aug 24];26(12):1367–72. Available from:  
645 <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt.1511>
- 646 40. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-  
647 based shotgun proteomics. *Nat Protoc*. 2016 Dec;11(12):2301–19.
- 648 41. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen J V, Mann M. Andromeda: a peptide  
649 search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res* [Internet]. 2011 Apr  
650 1 [cited 2016 Aug 24];10(4):1794–805. Available from:  
651 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21254760>
- 652 42. Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate Proteome-wide Label-free  
653 Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed  
654 MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Sep;13(9):2513–26.
- 655 43. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus  
656 computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*. 2016  
657 Sep;13(9):731–40.



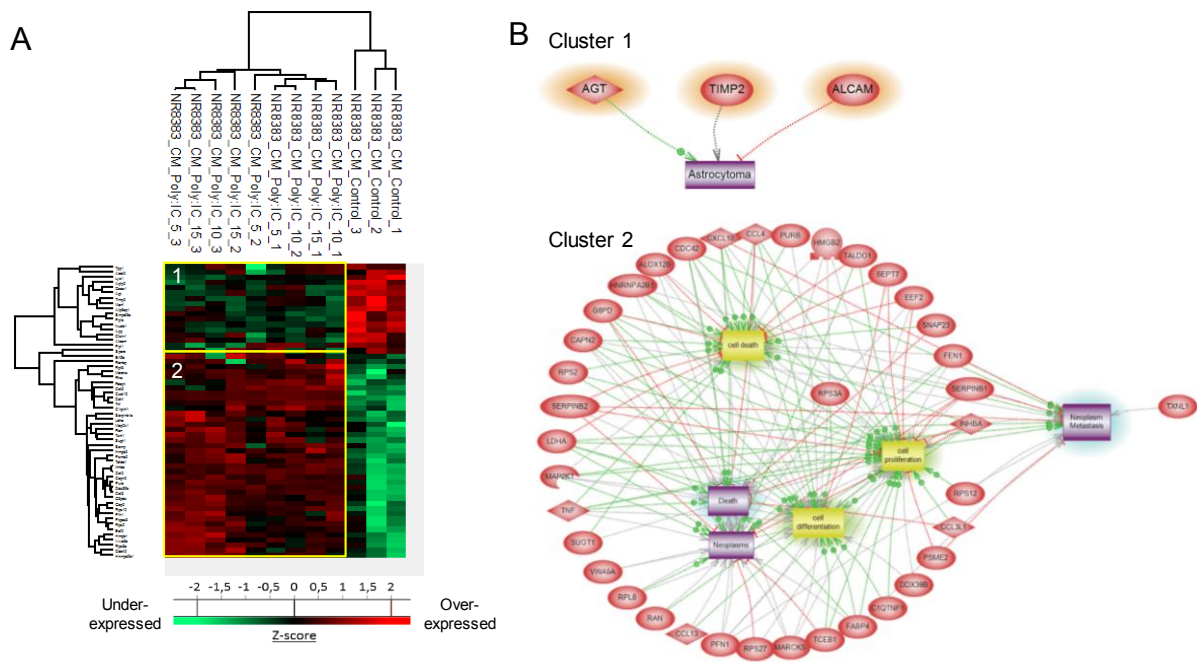
- 658 44. Yuryev A, Kotelnikova E, Daraselia N. Ariadne's ChemEffect and Pathway Studio knowledge  
659 base. *Expert Opin Drug Discov.* 2009 Dec;4(12):1307–18.
- 660 45. Cisneros Castillo LR, Oancea AD, Stüllein C, Régnier-Vigouroux A. A Novel Computer-  
661 Assisted Approach to evaluate Multicellular Tumor Spheroid Invasion Assay. *Sci Rep*  
662 [Internet]. 2016;6(October). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep35099>

663 **FIGURE LEGENDS**



664

665 **Fig 1: Poly (I:C) induces an immune response by macrophages.** A) NR8383 macrophages were  
666 stimulated or not with Poly (I:C) (5, 10 or 15 µg/ml). Cells were lysed before FASP and LC-MS/MS  
667 analysis. MaxQuant and Perseus software were used for the statistical analysis, and a heatmap was  
668 generated to show proteins that were significantly different between treated and untreated macrophages.  
669 Two clusters are highlighted. B) Global pathway analyses of clusters 1 and 2.

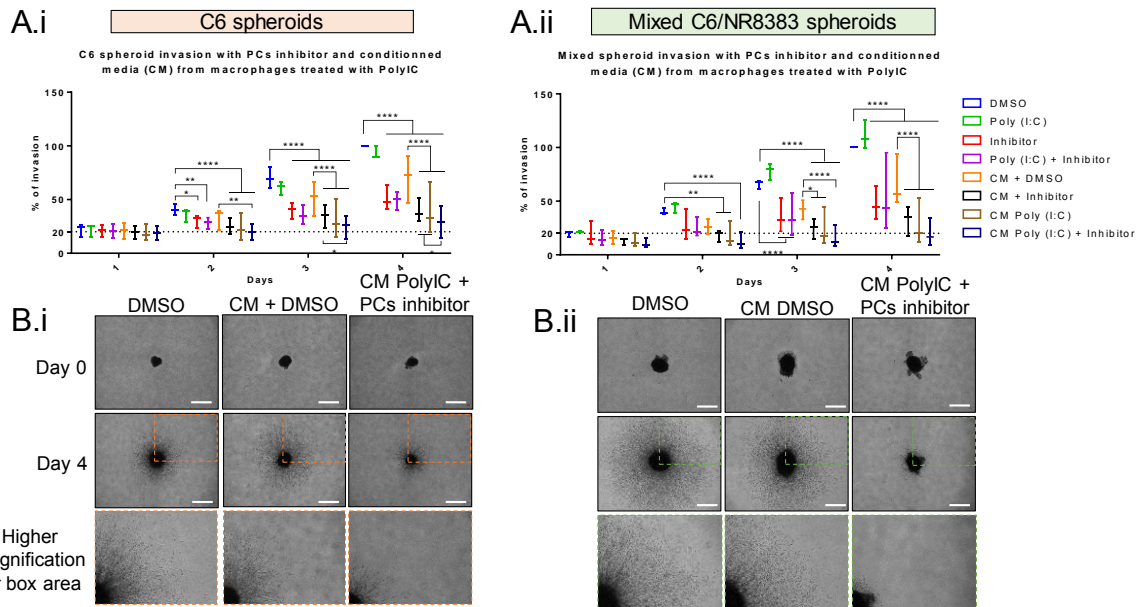


670

671 **Fig 2: Poly (I:C) induces secretion of pro-inflammatory cytokines by macrophages and immune-**  
 672 **related proteins over-expression.** A) NR8383 macrophages were stimulated or not with Poly (I:C) (5,  
 673 10 or 15 $\mu$ g/ml). Conditioned media were digested and analyzed with LC-MS/MS. MaxQuant and  
 674 Perseus software were used for the statistical analysis, and a heat map was generated to show proteins  
 675 that were significantly different between treated and untreated macrophages. Two clusters are  
 676 highlighted. B) Global pathway analyses of clusters 1 and 2.

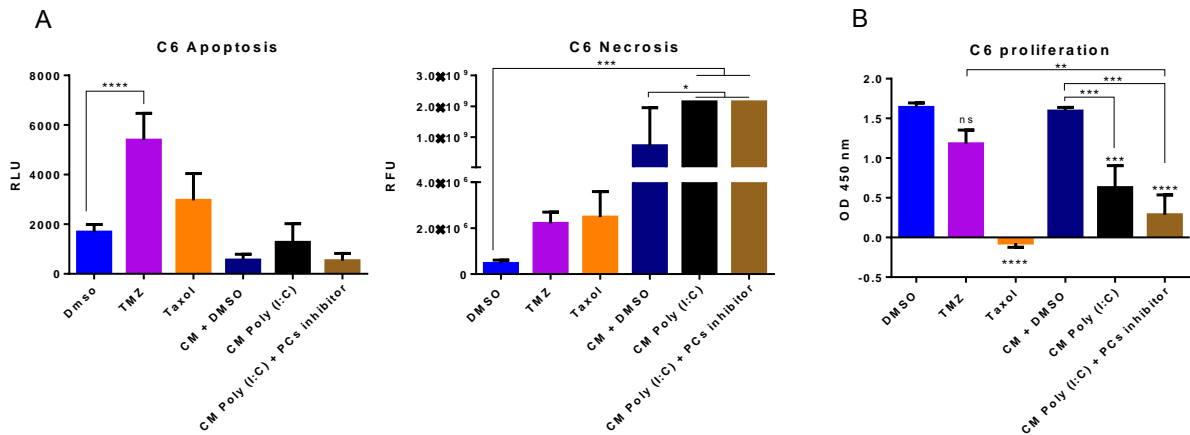
677

678



679

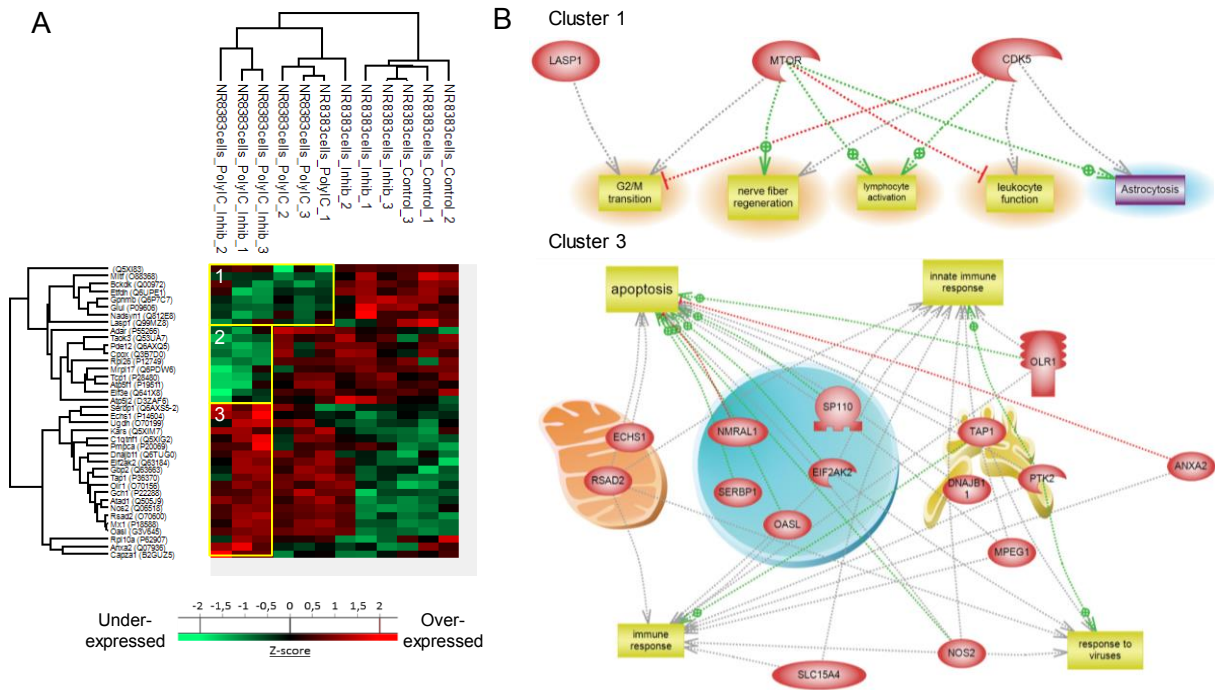
680 **Fig. 3: PCs inhibitor associated with the conditioned media of Poly (I:C) activated macrophages**  
681 **has an anti-tumoral effect.** C6 (i) and mixed C6/NR8383 (ii) spheroids were incubated with vehicle  
682 (DMSO), or with 10µg/ml of Poly (I:C), or with 100µM of PCs inhibitor or with both Poly (I:C) and  
683 PCs inhibitor. Spheroids were also incubated with conditioned media (CM) from untreated macrophages  
684 complemented with PCs inhibitor or vehicle (DMSO) or from macrophages treated with Poly (I:C) for  
685 24h (i.e CM Poly (I:C)) complemented with PCs inhibitor or vehicle (DMSO). Images of spheroids in  
686 the collagen matrix were taken every 24h for 4 days. A) Graphic representation showing the percentage  
687 of C6 (i) and mixed C6/NR8383 (ii) spheroids invasion. Significant differences were identified using  
688 Tukey's multiple comparisons test with \*\*\*\* p<0.0001 ; \*\*\* p<0.001 ; \*\* p<0,01. B) Representative  
689 images of the invasion of C6 (i) spheroids and mixed C6/NR8383 (ii) spheroids in the collagen matrix  
690 at day 0 and day 4. Spheroids were incubated with (DMSO), or with CM from untreated macrophages  
691 complemented with DMSO, or with CM from macrophages treated with Poly (I:C) for 24h  
692 complemented with PCs inhibitor. All images were acquired with an inverted light microscope at 5x  
693 magnification. Scale bar: 500 µm.



694

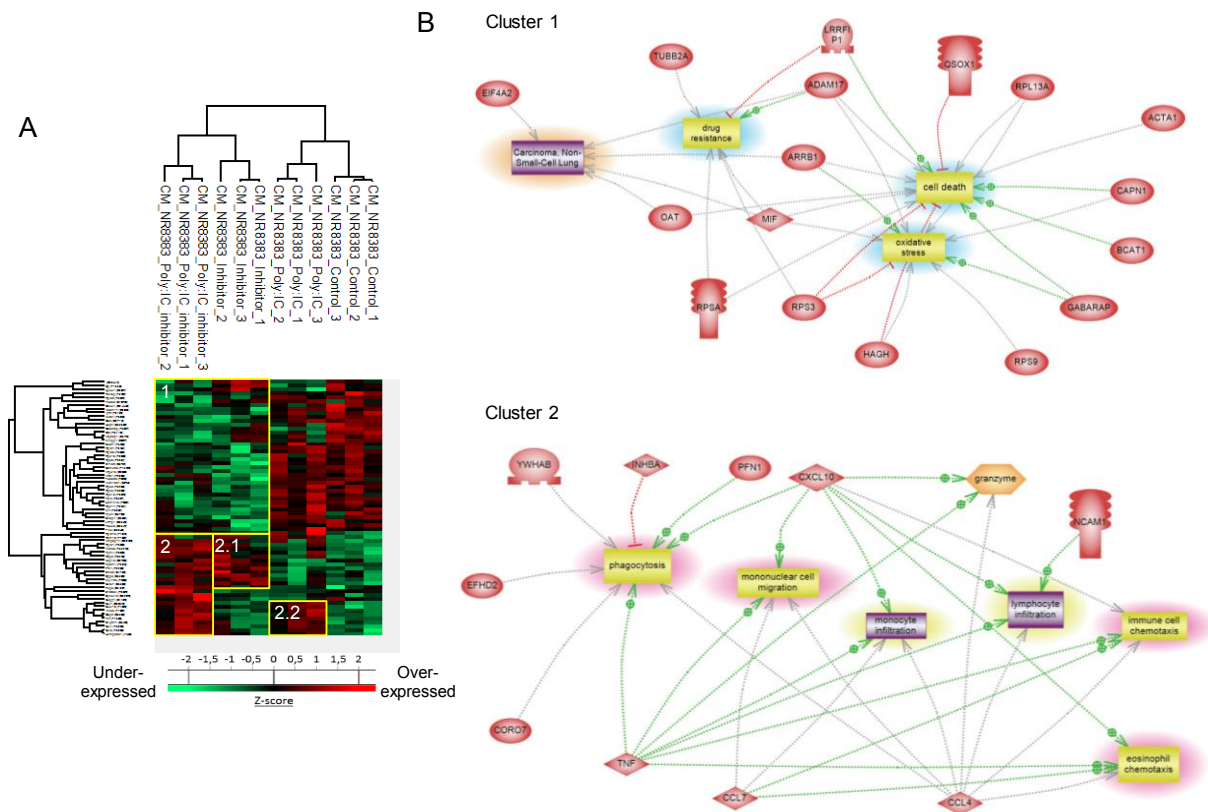
695 **Fig. 4: Conditioned media from Poly (I:C) treated-macrophages leads to the C6 glioma cells**  
 696 **necrosis.** C6 cell line was incubated with Poly (I:C) (10µg/ml), PCs inhibitor (100 or 300µM), TMZ  
 697 (600 µM), the conditioned media (CM) from untreated macrophages complemented with DMSO, the  
 698 CM from Poly (I:C) pretreated macrophages complemented with DMSO, PCs Inhibitor (100µM) or  
 699 with Taxol (30 µM). (A) Necrosis was monitored with RealTime-Glo™ Apoptosis and Necrosis Assay.  
 700 (B) The C6 proliferation was studied with BrDU incorporation. All the results were representative of  
 701 three independent experiments. Significant differences were identified using Tukey's multiple  
 702 comparisons test with \*\*\*\* p<0.0001 ; \*\*\* p<0.001 ; \*\* p<0,01 \*<0.05 ; ns = non significate.

703



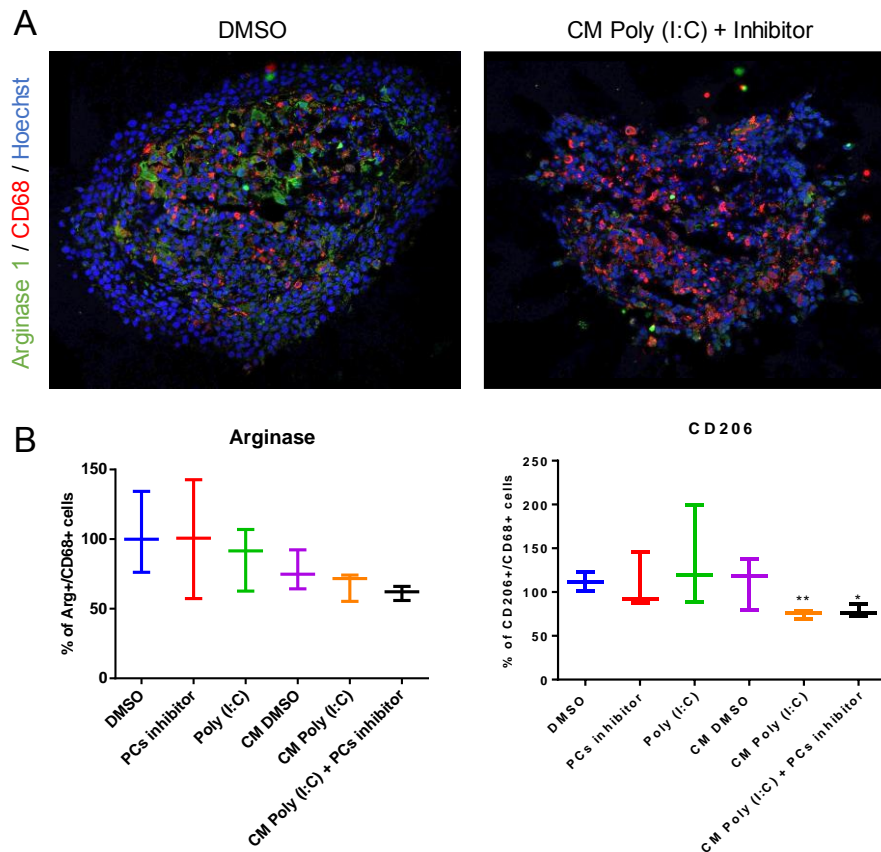
704

705 **Fig. 5: Poly (I:C) associated with PCs inhibitor induces immune-related proteins over-expression**  
 706 **and underexpression of pro-tumoral proteins.** A) NR8383 WT macrophages were stimulated with  
 707 10  $\mu\text{g/ml}$  of Poly (I:C) associated or not with 100  $\mu\text{M}$  of PCs inhibitor. Cells were lysed before FASP  
 708 and LC-MS/MS analysis. MaxQuant and Perseus software were used for the statistical analysis, and a  
 709 heat map was generated to show proteins that were significantly different between treated and untreated  
 710 macrophages. Three clusters are highlighted (1, 2 and 3). B) Global pathway analyses of clusters 1 and  
 711 3.



712

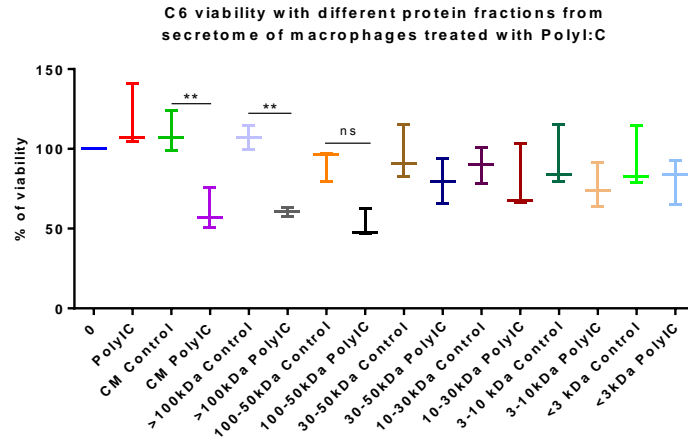
713 **Fig. 6: Poly (I:C) associated with PCs inhibitor induces secretion of pro-inflammatory cytokines**  
 714 **by macrophages.** NR8383 WT macrophages were stimulated with 10  $\mu\text{g/ml}$  of Poly (I:C) associated or  
 715 not with 100  $\mu\text{M}$  of PCs inhibitor. Conditioned media were digested and analyzed with LC-MS/MS. A)  
 716 MaxQuant and Perseus software were used for the statistical analysis, and a heatmap was generated to  
 717 show proteins that were significantly different between treated and untreated macrophages. Two clusters  
 718 are highlighted (1 and 2). B) Global pathway analyses of clusters 1 and 2.



719

720 **Fig 7: Conditioned media from Poly (I:C) treated macrophages combine with PCs inhibitor**  
 721 **decrease the Arginase expression into mixed spheroids.** Mixed C6/NR8383 spheroids were incubated  
 722 for 24h with vehicle (DMSO), or with 10µg/ml of Poly (I:C) or with 100µM of PCs inhibitor. Spheroids  
 723 were also incubated with conditioned media (CM) from untreated macrophages complemented with  
 724 vehicle (DMSO) or from macrophages treated with Poly (I:C) for 24h (i.e CM Poly (I:C)) complemented  
 725 with PCs inhibitor. A: Confocal images of mixed spheroids after cryosection and immunofluorescence  
 726 staining for Hoechst (blue), CD68 (red) and Arginase 1 (green) are shown. B: Percentage of  
 727 macrophages (CD68) expressing arginase 1 or CD206. Significant differences were identified using T  
 728 test with \*\*  $p < 0,01$  and \*  $< 0,05$ .





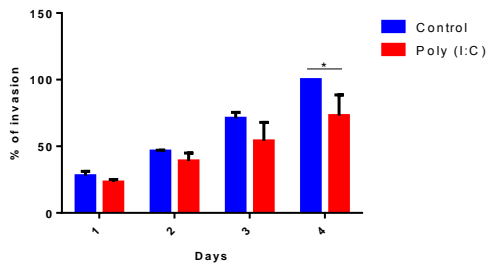
729

730 **Supp. Figure 1: Anti-tumoral factors secreted by Poly (I:C) pre-treated macrophages have a**  
 731 **molecular weight ranging between 50-100 kDa.** Conditioned media from Poly (I:C) pre-treated  
 732 macrophages and untreated macrophages were split in different fraction with molecular weight filter.  
 733 C6 rat glioma cells were incubated with complete conditioned media from Poly (I:C) pre-treated  
 734 macrophages or with different fractions of this conditioned media. The cell density of C6 cells was  
 735 determined by MTS assay. The assays were conducted for 3 days. All the results were representative of  
 736 three independent experiments. Significant differences were identified using Tukey's multiple  
 737 comparisons test with \*\*  $p < 0,01$ .

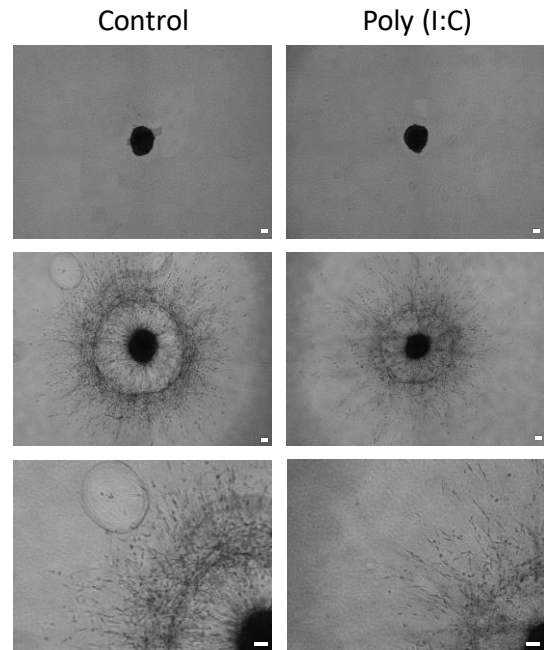
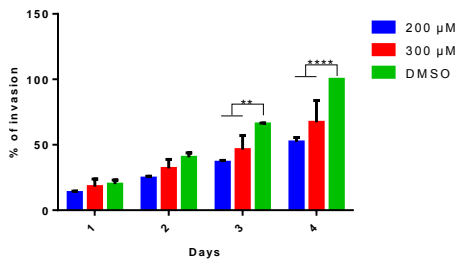
738



Invasion of NCH82 spheroids treated with Poly (I:C)



Invasion of NCH82 spheroids with different PCs inhibitor concentration



739

740 **Supp. Figure 2: PCs inhibitor and Poly (I:C) has an anti-tumoral effect on the human glioma cell**

741 **line NCH82.** NCH82 spheroids were incubated with vehicle (DMSO), or with 10μg/ml of Poly (I:C),

742 or with 200μM or 300μM of PCs inhibitor. Images of spheroids in the collagen matrix were taken every

743 24h for 4 days. A) Graphic representation showing the percentage of spheroids invasion after a treatment

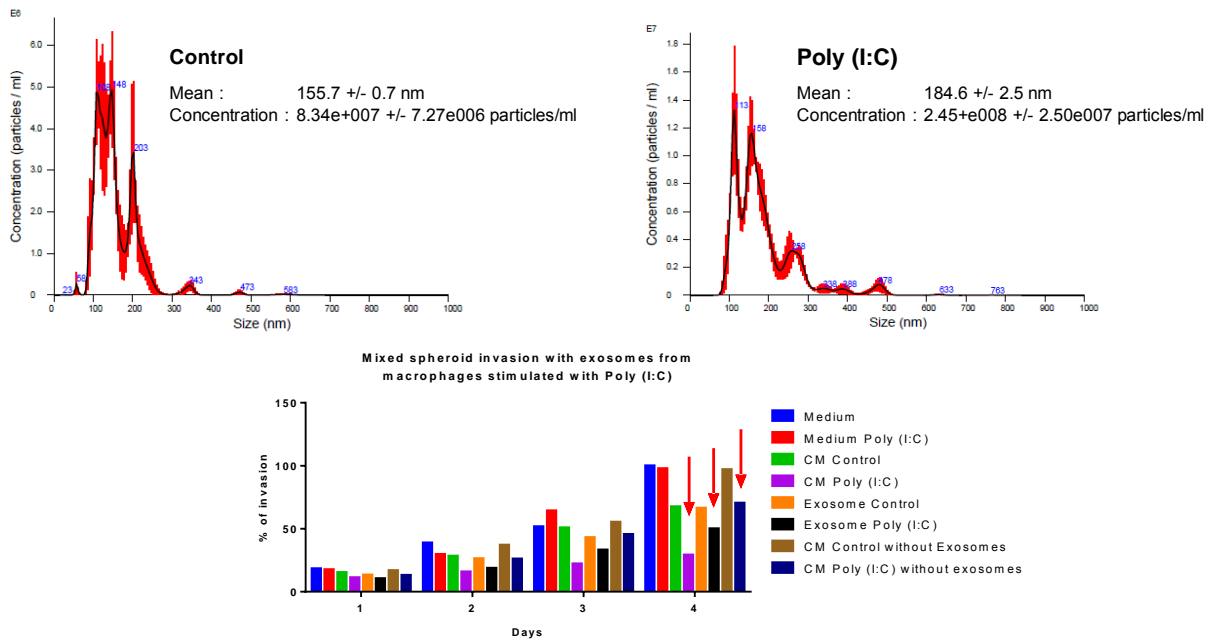
744 with Poly (I:C) (n=2) or PCs inhibitor (n=3). Significant differences were identified using Tukey's

745 multiple comparisons test with \*\*\*\* p<0.0001 ; \*\* p<0,01 and \* p<0.05. B) Representative images of

746 the invasion of untreated and Poly (I:C) treated NCH82 spheroids in the collagen matrix at day 0 and

747 day 4. All images were acquired with an inverted light microscope at 5x magnification. Scale bar: 100

748 μm.



749

750 **Supp. Figure 3: Impact of Poly (I:C) pre-treated NR8383 derived EVs on mixed macrophages and**  
 751 **glioma spheroids.** A: NanoSight nanoparticle tracking analysis for extracellular vesicles (EVs) of  
 752 NR8383 treated or not with 10 µg/ml of Poly (I:C). B: Quantification of invasion of mixed NR8383/C6  
 753 spheroids in presence of EVs isolated from the CM of NR8383 treated or not with Poly (I:C) compared  
 754 to control mixed spheroids without EVs and mixed spheroids with CM depleted of EVs. This experiment  
 755 was done once (n=1).

756 **Supp. Data 1:** List of identified protein from Cluster 1 & 2 of NR8383 cells treated with Poly (I:C).

757 **Supp. Data 2:** List of identified protein from Cluster 1 & 2 of conditioned media from NR8383 treated  
 758 with Poly (I:C).

759 **Supp. Data 3:** List of identified protein from Cluster 1, 2 & 3 of NR8383 cells treated with Poly (I:C)  
 760 associated or not with PCs inhibitor.

761 **Supp. Data 4:** List of identified protein from Cluster 1 & 2 of conditioned media from NR8383 treated  
 762 with Poly (I:C) associated or not with PCs inhibitor.

## Conclusions et perspectives

L'ensemble des résultats a permis de mettre en avant que le Poly (I:C) induit un phénotype qui réduit les capacités immunomodulatrices des macrophages en faveur de leurs fonctions immunitaires. Ainsi, la sécrétion accrue de facteurs pro-inflammatoires et de protéines impliquées dans les fonctions immunitaires des macrophages, telles que la phagocytose et le recrutement de cellules immunitaires laisse suggérer que, sous Poly (I:C), les macrophages NR8383 s'orientent vers un profil M1. Ces résultats supportent ceux décrits par Kees et ses collègues (Kees et al., 2012). Ces derniers ont démontré que la stimulation de macrophages et de cellules microgliales isolés de gliomes avec du Poly (I:C) induit une orientation pro-inflammatoire et anti-tumorale de ces derniers.

En combinant l'inhibition de PCs au Poly (I:C), nous voulions accentuer ce phénotype pro-inflammatoire et anti-tumoral et aussi conserver un effet thérapeutique au sein d'un modèle associant les cellules cancéreuses aux macrophages. L'analyse protéomique des macrophages a pu mettre en avant une complémentarité entre l'inhibition de PCs et la stimulation du TLR3 par le Poly (I:C). L'inhibiteur de PCs induit un phénotype pro-inflammatoire et réduit considérablement la sécrétion de facteurs pro-tumoraux par les macrophages. Le Poly (I:C), quant à lui, induit l'expression de protéines impliquées dans la réponse immunitaire et la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et anti-tumoraux actifs contre les cellules de gliomes. Comme mentionné précédemment, il serait intéressant de compléter l'analyse du phénotype des macrophages par des puces à cytokines ou encore en étudiant l'expression de différents marqueurs du phénotype pro- et anti-tumoral. La complémentarité des deux agents pourrait ainsi être mise en avant de manière plus prononcée. Il serait également intéressant, d'un point de vue fondamental, d'identifier les différentes voies de signalisation activées. Par exemple, en analysant la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B ou encore la phosphorylation d'IRF3 par Western Blot nous pourrions nous assurer de l'activation des deux voies.

De plus, l'inhibiteur agit directement sur les cellules cancéreuses en diminuant non seulement leur viabilité et leur invasion mais aussi leur capacité immunosuppressive. Ceci pourrait rendre la tumeur plus sensible aux différentes chimiothérapies et également diminuer son action immunosuppressive sur les macrophages. Face à ce constat, nous avons décidé de coupler les propriétés de chaque molécule. Nous avons donc utilisé le Poly (I:C) pour stimuler les macrophages et déclencher la sécrétion de facteurs anti-tumoraux et l'inhibiteur

pour stimuler les cellules de gliome et ainsi réduire le développement tumoral et leur capacité immunosuppressive. Cette combinaison vise à obtenir le meilleur effet thérapeutique.

Les tests d'invasion réalisés sur les sphéroïdes ne permettent pas de mettre en avant une complémentarité significative de l'inhibiteur de PCs et des facteurs anti-tumoraux sécrétés par les macrophages stimulés au Poly (I:C). Le pourcentage d'invasion des sphéroïdes est déjà très bas lorsqu'ils sont cultivés avec les facteurs anti-tumoraux des macrophages stimulés au Poly (I:C). C'est pourquoi il est très difficile d'observer un potentiel effet additif de l'inhibiteur de PCs dans ces conditions. Nous voulions donc confirmer cette complémentarité thérapeutique par d'autres expériences. Nous avons donc évalué l'impact de l'association du sécrétome de macrophages traités au Poly (I:C) et de l'inhibiteur de PCs non plus sur l'invasion mais sur la viabilité des cellules de gliome. Ainsi, la même tendance préalablement observée sur l'invasion des sphéroïdes est retrouvée sur la viabilité des C6 (Figure 24). Le sécrétome de macrophages stimulés au Poly (I:C) diminue la densité cellulaire de 60%. L'ajout de l'inhibiteur de PCs à ce sécrétome accentue cette diminution à 80%. En comparaison de l'activité anti-tumorale exercée par chacun des agents, l'ensemble des résultats semble confirmer que l'ajout de l'inhibiteur de PCs au sécrétome de macrophages traités au Poly (I:C) permet d'obtenir un effet additif.

Densité cellulaire des C6 cultivées avec l'inhibiteur de PCs associé au sécrétome de macrophages traités au Poly (I:C)

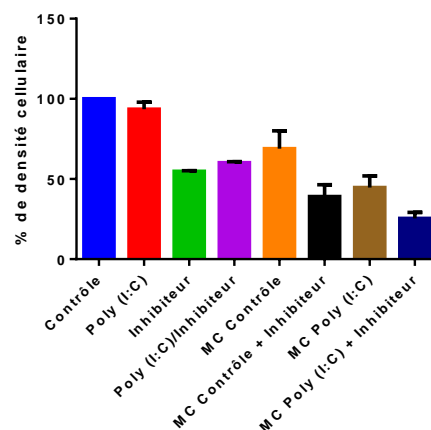


Figure 24 : Evaluation de l'effet additif de l'inhibiteur de PCs et du sécrétome de macrophages pré-stimulés au Poly (I:C) sur la viabilité des cellules de gliome C6.

La densité cellulaire des cellules de gliomes C6 a été déterminée grâce au kit MTS CellTiter. Les mesures ont été réalisées à 0 et 72h. Les résultats ont été transformés en pourcentage par rapport à la valeur de DO obtenue à 0h. Le test a été réalisé en duplicat biologique.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

Le cancer est une des causes majeures de mortalité dans le monde. De récentes avancées ont permis une meilleure appréhension de cette maladie insidieuse. Récemment, le microenvironnement tumoral est apparu comme étant un acteur clé dans la progression de la tumeur. Cette découverte a mené au développement d'agents anti-cancéreux ciblant les composants de ce microenvironnement, notamment la vascularisation ou encore le système immunitaire. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) présentent un grand intérêt en oncoimmunologie. En effet, la plasticité phénotypique des macrophages joue un rôle essentiel dans le développement tumoral (Palucka and Coussens, 2016). Pour classer les propriétés et fonctions des macrophages, le concept de polarisation M1 /M2 a été introduit (Mantovani and Sica, 2010). Il est considéré que les TAMs présentent un phénotype se rapprochant du phénotype anti-inflammatoire et pro-tumoral M2. De ce fait, ils sont étroitement associés à la progression tumorale, notamment la prolifération, l'angiogenèse ou encore le développement de métastases. De plus, leur quantité abondante au sein du microenvironnement tumoral peut être corrélée avec un mauvais pronostic. En effet, ils constituent bien souvent une barrière aux immunothérapies émergentes. Ceci est clairement observé dans le cas des glioblastomes (GBMs) qui sont des tumeurs cérébrales incurables (Chen et al., 2017).

Ce projet s'est placé dans la problématique que pose l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire. L'objectif était donc de développer une stratégie thérapeutique visant à réorienter les TAMs vers un phénotype anti-tumoral. Notre approche a consisté à combiner l'inhibition de proprotéines convertases (PCs) et l'activation de TLRs. Les PCs, notamment PC1/3 et la furine, jouent un rôle majeur dans la modulation des fonctions immunitaires des macrophages (Cordova et al., 2016; Duhamel et al., 2015, 2016a; Gagnon et al., 2013; Refaie et al., 2012). En effet, son inhibition conduit à la sécrétion spontanée de cytokines pro-inflammatoires, accentuée par la stimulation du TLR4 par le LPS (Duhamel et al., 2015) ou le Paclitaxel (Duhamel et al., 2018) (Chapitre I). L'inhibition de PC1/3 au sein des macrophages associée à la stimulation du TLR4 provoque également la sécrétion de facteurs anti-tumoraux efficaces contre les lignées cellulaires humaines de cancers du sein SKBR3 et de l'ovaire SKOV3 (Duhamel et al., 2015) ainsi que contre la lignée cellulaire de gliome de rat C6 (Duhamel et al., 2018). Il semblerait donc que l'inhibition de PC1/3 couplée à la stimulation du TLR4 soit une stratégie efficace *in vitro* pour orienter les macrophages vers un phénotype

M1 pro-inflammatoire et anti-tumoral. Ces résultats sont donc très encourageants, d'autant plus que cette stratégie est efficace dans un environnement immunosuppresseur mimé par une stimulation avec la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ou par une co-culture en trois dimensions des macrophages et des cellules cancéreuses sous forme de sphéroïdes (Duhamel et al., 2018). Pour améliorer cette stratégie thérapeutique, nous avons décidé d'utiliser un inhibiteur de plusieurs PCs dans le but d'agir à la fois sur les cellules cancéreuses et sur les macrophages. Ainsi, nous avons démontré une activité anti-tumorale de l'inhibiteur de PCs utilisé contre plusieurs lignées cellulaires de GBMs et aussi contre plusieurs types de cancers. De plus, ce dernier réduit les capacités immunosuppressives des cellules de gliome C6, réduisant ainsi leur influence sur le phénotype des macrophages. Par ailleurs, l'inhibiteur de PCs induit une orientation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire et réduit la quantité de facteurs pro-tumoraux qu'ils sécrètent (Rose et al., 2020). Toutes les conditions sont ainsi réunies pour une reprogrammation efficace des macrophages au sein de la tumeur. Cette stratégie thérapeutique est d'autant plus efficace lorsque l'inhibiteur de PCs est utilisé en association avec le Poly (I:C), ligand du TLR3. Ce dernier oriente les macrophages vers un profil pro-inflammatoire et anti-tumoral. Les facteurs sécrétés par les macrophages stimulés au Poly (I:C) sont très efficaces contre les cellules de gliome de rat C6 et ce, même lorsque les cellules cancéreuses sont associées aux macrophages. Nos travaux ont donc démontré *in vitro* l'efficacité de notre stratégie thérapeutique dans l'orientation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire et anti-tumoral. La complémentarité de l'inhibiteur de PCs et du Poly (I:C) a ainsi été mise en avant (Tableau 4).

*Tableau 4 : Complémentarité de l'inhibiteur de PCs et du Poly (I:C) dans une stratégie thérapeutique de reprogrammation des macrophages au sein de gliome.*

*– symbolise l'absence de résultats ; 0 représente l'absence d'activité de la part des agents (Poly (I:C) ou inhibiteur de PCs) ; X représente l'activité de l'agent et XX une activité accentuée.*

	<b>Activité anti-tumorale</b>	<b>Orientation M1 des Mφ</b>	<b>↓ de facteurs pro-tumoraux par les Mφ</b>	<b>↓ de facteurs pro-tumoraux par les C6</b>
<b>Inhibiteur de PCs</b>	X	X	X	X
<b>Poly (I:C)</b>	0	X	0	-
<b>MC Poly (I:C) + Inhibiteur de PCs</b>	X	XX	X	X

Pour poursuivre cette étude, nous allons tout d'abord valider le phénotype des macrophages par différentes techniques précédemment utilisées. Pour ce faire, nous allons utiliser des puces à cytokines pour identifier et quantifier les cytokines présentes dans le milieu conditionné des macrophages traités au Poly (I:C) en association ou non avec l'inhibiteur et dans le milieu conditionné des sphéroïdes mixtes. Cela nous permettra de déterminer l'état inflammatoire de l'environnement dans lequel évoluent les cellules cancéreuses associées aux macrophages. Les observations précédentes sur la réduction des capacités immunosuppressives des cellules cancéreuses et sur l'orientation pro-inflammatoire des macrophages seront ainsi validées. Les immunofluorescences précédemment réalisées tendent à démontrer une réduction de la proportion des macrophages de phénotype anti-inflammatoire M2. Nous compléterons et validerons ces observations en étudiant l'expression de marqueurs associés au phénotype pro-inflammatoire M1 tels que le CMH II, CD86 ou l'IL-1R (Mantovani et al., 2004). La capacité des macrophages à mener une réponse immunitaire ciblant les cellules cancéreuses devra également être étudiée. Ainsi, comme mentionné précédemment, leur activité phagocytaire sera analysée par l'étude de l'ingestion de particules fluorescentes. Le recrutement de cellules immunitaires sera quant à lui étudié grâce au test utilisant la chambre de Boyden. L'ensemble de ces résultats nous donnera des indications sur l'efficacité de la stratégie pour pouvoir évoluer vers un modèle complexe associant cellules cancéreuses, macrophages et autres cellules immunitaires comme les lymphocytes T cytotoxiques ou encore les cellules NK, impliquées dans l'élimination des cellules cancéreuses.

L'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit démontre que l'association entre l'inhibition de PCs et stimulation des macrophages au Poly (I:C) est une stratégie de reprogrammation des macrophages efficace au sein de gliome. Ces résultats encourageants d'un point de vue thérapeutique laissent envisager la possibilité d'une thérapie cellulaire utilisant les macrophages du patient qui seraient orientés vers un phénotype anti-tumoral *in vitro* puis réinjectés. En couplant notre stratégie de réactivation des macrophages à une stratégie telle que les CAR, mentionnée précédemment (Figure 5), nous pourrions développer une stratégie thérapeutique ciblée qui, associée aux chimiothérapies existantes, serait une avancée majeure dans le traitement des GBMs.

Les CAR-T sont des lymphocytes T modifiés avec des récepteurs à antigènes chimériques qui reconnaissent un antigène tumoral. Cela leur permet de cibler les cellules cancéreuses et d'initier une réponse immunitaire contre la tumeur. Cette stratégie a démontré une bonne efficacité clinique dans les cancers hématologiques tels que les lymphomes ou les leucémies (Mcgranahan et al., 2019) mais une efficacité plus modérée au sein de tumeurs solides telles que les GBMs. En effet, plusieurs obstacles à l'utilisation de cette thérapie contre les GBMs existent à ce jour. Parmi ceux-ci, l'environnement immunosuppresseur retrouvé au sein des tumeurs constitue un frein à l'activité immunitaire des CAR-T (Bagley et al., 2018). La création de macrophages CAR associée à la stratégie thérapeutique décrite dans les trois chapitres précédents permettrait de contrecarrer cette immunomodulation. En effet, l'inhibition de PCs au sein des cellules cancéreuses réduit leurs capacités pro-tumorales et immunosuppressives (Rose et al., 2020) (Chapitre II). De plus, nous avons démontré que le phénotype pro-inflammatoire et anti-tumoral des macrophages est résistant à un environnement immunosuppresseur, qu'il soit mimé par une stimulation avec la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ou par une co-culture entre les cellules cancéreuses et les macrophages sous forme de sphéroïdes (Chapitre I et III). Aussi, le choix des antigènes cibles est très important pour éviter une réactivité croisée avec les tissus sains et engendrer des effets secondaires. De plus, les GBMs sont des tumeurs très hétérogènes. Les antigènes exprimés par les cellules cancéreuses qui pourraient être ciblés par les macrophages CAR seraient donc différents d'un patient à un autre mais aussi au sein même de la tumeur. C'est le cas par exemple pour l'IL-13 R $\alpha$ 2 et l'EGFvIII, antigènes candidats pour le développement des CAR-T au sein des GBMs. Il est donc nécessaire d'étudier et de découvrir de nouveaux antigènes cibles afin de répondre à ces défis d'hétérogénéité et de spécificité.

L'ensemble de ces travaux et les perspectives envisagées indiquent que cette stratégie pourrait conduire à une avancée thérapeutique encourageante dans le cadre de la reprogrammation des macrophages au sein de GBMs et être utilisée dans le cadre de différents types de cancers.



## BIBLIOGRAPHIE

---

- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-Like Receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499–511.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., and Wood, M.J.A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* *29*, 341–345.
- Artenstein, A.W., and Opal, S.M. (2011). Proprotein Convertases in Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2507–2518.
- Bagley, S.J., Desai, A.S., Linette, G.P., June, C.H., and O'Rourke, D.M. (2018). CAR T-cell therapy for glioblastoma: Recent clinical advances and future challenges. *Neuro. Oncol.* *20*, 1429–1438.
- Baitsch, D., Bock, H., Engel, T., Telgmann, R., Tidow, C., Varga, G., Bot, M., Herz, J., Robenek, H., von Eckardstein, A., et al. (2011). APOLIPOPROTEIN E (APOE) INDUCES ANTI-INFLAMMATORY PHENOTYPE IN MACROPHAGES. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 1160–1168.
- Basak, S., Chrétien, M., Mbikay, M., and Basak, A. (2004). In vitro elucidation of substrate specificity and bioassay of proprotein convertase 4 using intramolecularly quenched fluorogenic peptides. *Biochem. J.* *380*, 505–514.
- Bassi, D.E., Mahloogi, H., and Klein-Szanto, A.J.P. (2000). The Proprotein Convertases Furin and PACE 4 Play a Significant Role in Tumor Progression. *Mol. Carcinog.* *28*, 63–69.
- Bassi, D.E., Mahloogi, H., Al-Saleem, L., De Cicco, R.L., Ridge, J.A., and Klein-Szanto, A.J.P. (2001). Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol. Carcinog.* *31*, 224–232.
- Bassi, D.E., Fu, J., De Cicco, R.L., and Klein-Szanto, A.J.P. (2005). Proprotein convertases: “Master switches” in the regulation of tumor growth and progression. *Mol. Carcinog.* *44*, 151–161.
- Bassi, D.E., Zhang, J., Cenna, J., Litwin, S., Cukierman, E., and Klein-Szanto, A.J.P. (2010).

Proprotein convertase inhibition results in decreased skin cell proliferation, tumorigenesis, and metastasis. *Neoplasia* 12, 516–526.

Becker, G.L., Lu, Y., Harges, K., Strehlow, B., Levesque, C., Lindberg, I., Sandvig, K., Bakowsky, U., Day, R., Garten, W., et al. (2012). Highly potent inhibitors of proprotein convertase furin as potential drugs for treatment of infectious diseases. *J. Biol. Chem.* 287, 21992–22003.

Brown, N.F., Carter, T.J., Ottaviani, D., and Mulholland, P. (2018). Harnessing the immune system in glioblastoma. *Br. J. Cancer* 119, 1171–1181.

Bunggulawa, E.J., Wang, W., Yin, T., Wang, N., Durkan, C., Wang, Y., and Wang, G. (2018). Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *J. Nanobiotechnology* 16, 1–13.

Butowski, N., Colman, H., De Groot, J.F., Omuro, A.M., Nayak, L., Wen, P.Y., Cloughesy, T.F., Marimuthu, A., Haidar, S., Perry, A., et al. (2016). Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: An Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. *Neuro. Oncol.* 18, 557–564.

Byrd-Leifer, C.A., Block, E.F., Takeda, K., Akira, S., and Ding, A. (2001). The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur. J. Immunol.* 31, 2448–2457.

Capper, D., Jones, D.T.W., Martin, S., Hovestadt, V., Deimling, A. Von, and Pfister, S.M. (2018). DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* 555, 469–474.

Chen, K., Huang, J., Gong, W., Iribarren, P., Dunlop, N.M., and Wang, J.M. (2007). Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int. Immunopharmacol.* 7, 1271–1285.

Chen, Z., Feng, X., Herting, C.J., Garcia, V.A., Nie, K., Pong, W.W., Rasmussen, R., Dwivedi, B., Seby, S., Wolf, S.A., et al. (2017). Cellular and molecular identity of tumor-associated macrophages in glioblastoma. *Cancer Res.* 77, 2266–2278.

Cordova, Z.M., Grönholm, A., Kytölä, V., Taverniti, V., Hämäläinen, S., Aittomäki, S., Niininen, W., Junttila, I., Ylipää, A., Nykter, M., et al. (2016). Myeloid cell expressed proprotein convertase FURIN attenuates inflammation. *Oncotarget* 7, 54392–54404.

Couture, F., D'Anjou, F., Desjardins, R., Boudreau, F., and Day, R. (2012). Role of Proprotein Convertases in Prostate Cancer Progression. *Neoplasia* *14*, 1032–1042.

Creemers, J.W.M., and Khatib, A.M. (2008). Knock-out mouse models of proprotein convertases: Unique functions or redundancy? *Front. Biosci.* *13*, 4960–4971.

D'Anjou, F., Routhier, S., Perreault, J.P., Latil, A., Bonnel, D., Fournier, I., Salzet, M., and Day, R. (2011). Molecular validation of pacc4 as a target in prostate cancer. *Transl. Oncol.* *4*, 157–172.

Davis, M.E. (2016). Glioblastoma: Overview of disease and treatment. *Clin. J. Oncol. Nurs.* *20*, 1–8.

Day, R., and Salzet, M. (2002). The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity, and the search for genetic switches: Redefining the diffuse neuroendocrine system. *Neuroendocrinol. Lett.* *23*, 447–451.

Duhamel, M., Rodet, F., Delhem, N., Vanden Abeele, F., Kobeissy, F., Nataf, S., Pays, L., Desjardins, R., Gagnon, H., Wisztorski, M., et al. (2015). Molecular Consequences of Proprotein Convertase 1/3 (PC1/3) Inhibition in Macrophages for Application to Cancer Immunotherapy: A Proteomic Study. *Mol. Cell. Proteomics* *14*, 2857–2877.

Duhamel, M., Rodet, F., Murgoci, A.N., Desjardins, R., Gagnon, H., Wisztorski, M., Fournier, I., and Salzet, M. (2016a). The proprotein convertase PC1/3 regulates TLR9 trafficking and the associated signaling pathways. *Sci. Rep.* *6*, 1–13.

Duhamel, M., Rodet, F., Murgoci, A., Wisztorski, M., Day, R., Fournier, I., and Salzet, M. (2016b). Proprotein convertase 1/3 inhibited macrophages: A novel therapeutic based on drone macrophages. *EuPA Open Proteomics* *11*, 20–22.

Duhamel, M., Rose, M., Rodet, F., Murgoci, A.N., Zografidou, L., Régnier-Vigouroux, A., Abeele, F., Vanden, Kobeissy, F., Nataf, S., Pays, L., et al. (2018). Paclitaxel Treatment and Proprotein Convertase 1/3 (PC1/3) Knockdown in Macrophages is a Promising Antiglioma Strategy as Revealed by Proteomics and Cytotoxicity Studies. *Mol. Cell. Proteomics* *17*, 1126–1143.

Essalmani, R., Zaid, A., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Pasquato, A., Seidah, N.G., and Prat,

A. (2008). In vivo functions of the proprotein convertase PC5/6 during mouse development: Gdf11 is a likely substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5750–5755.

Franklin, R.A., and Li, M.O. (2016). Ontogeny of Tumor-Associated Macrophages and Its Implication in Cancer Regulation. *Trends in Cancer* *2*, 20–34.

Fu, C., and Jiang, A. (2018). Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* *9*.

Furuta, M., Zhou, A., Webb, G., Carroll, R., Ravazzola, M., Orci, L., and Steiner, D.F. (2001). Severe Defect in Proglucagon Processing in Islet A-cells of Prohormone Convertase 2 Null Mice. *J. Biol. Chem.* *276*, 27197–27202.

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 162–174.

Gagnon, H., Refaie, S., Gagnon, S., Desjardins, R., Salzet, M., and Day, R. (2013). Proprotein Convertase 1/3 (PC1/3) in the Rat Alveolar Macrophage Cell Line NR8383: Localization, Trafficking and Effects on Cytokine Secretion. *PLoS One* *8*, 1–16.

Geiger, R., Rieckmann, J.C., Wolf, T., Basso, C., Feng, Y., Fuhrer, T., Kogadeeva, M., Picotti, P., Meissner, F., Mann, M., et al. (2016). L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. *Cell* *167*, 829–842.

Giering, A., Pszczolkowska, D., Walentynowicz, K.A., Rajan, W.D., and Kaminska, B. (2017). Immune microenvironment of gliomas. *Lab. Investig.* *97*, 498–518.

GLOBOCAN (2018). Estimated number of incident cases worldwide, both sexes, all ages.

Gravina, G.L., Mancini, A., Colapietro, A., Monache, S.D., Sferra, R., Vitale, F., Cristiano, L., Martellucci, S., Marampon, F., Mattei, V., et al. (2019). The small molecule ephrin receptor inhibitor, GLPG1790, reduces renewal capabilities of cancer stem cells, showing anti-tumour efficacy on preclinical glioblastoma models. *Cancers (Basel)*. *11*.

Griffero, F., Daga, A., Marubbi, D., Capra, M.C., Melotti, A., Pattarozzi, A., Gatti, M., Bajetto, A., Porcile, C., Barbieri, F., et al. (2009). Different response of human glioma tumor-initiating

cells to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* *284*, 7138–7148.

Guillemot, J., Canuel, M., Essalmani, R., Prat, A., and Seidah, N.G. (2013). Implication of the proprotein convertases in iron homeostasis: Proprotein convertase 7 sheds human transferrin receptor 1 and furin activates hepcidin. *Hepatology* *57*, 2514–2524.

Gyamera-Acheampong, C., and Mbikay, M. (2009). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4 in mammalian fertility: A review. *Hum. Reprod. Update* *15*, 237–247.

Heiland, D.H., Haaker, G., Delev, D., Mercas, B., Masalha, W., Heynckes, S., Gäbelein, A., Pfeifer, D., Carro, M.S., Weyerbrock, A., et al. (2017). Comprehensive analysis of PD-L1 expression in glioblastoma multiforme. *Oncotarget* *8*, 42214–42225.

Henrik Heiland, D., Ravi, V.M., Behringer, S.P., Frenking, J.H., Wurm, J., Joseph, K., Garrelfs, N.W.C., Strähle, J., Heynckes, S., Grauvogel, J., et al. (2019). Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nat. Commun.* *10*.

Hipp, M.M., Shepherd, D., Gileadi, U., Aichinger, M.C., Kessler, B.M., Edelmann, M.J., Essalmani, R., Seidah, N.G., Reisesousa, C., and Cerundolo, V. (2013). Processing of human toll-like receptor 7 by furin-like proprotein convertases is required for its accumulation and activity in endosomes. *Immunity* *39*, 711–721.

Horton, J.D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2009). PCSK9: A convertase that coordinates LDL catabolism. *J. Lipid Res.* *S172–S177*.

Jaaks, P., and Bernasconi, M. (2017). The proprotein convertase furin in tumour progression. *Int. J. Cancer* *141*, 654–663.

Javeed, A., Ashraf, M., Riaz, A., Ghafoor, A., Afzal, S., and Mukhtar, M.M. (2009). Paclitaxel and immune system. *Eur. J. Pharm. Sci.* *38*, 283–290.

Kees, T., Lohr, J., Noack, J., Mora, R., Gdynia, G., Tödt, G., Ernst, A., Radlwimmer, B., Falk, C.S., Herold-Mende, C., et al. (2012). Microglia isolated from patients with glioma gain antitumor activities on poly (I:C) stimulation. *Neuro. Oncol.* *14*, 64–78.

Kerkar, S.P., and Restifo, N.P. (2012). Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer Res.* *72*, 3125–3130.

Khatib, A.-M., Siegfried, G., Chrétien, M., Metrakos, P., and Seidah, N.G. (2002). Proprotein Convertases in Tumor Progression and Malignancy. *Am. J. Pathol.* *160*, 1921–1935.

Kierdorf, K., Masuda, T., Jordão, M.J.C., and Prinz, M. (2019). Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *20*, 547–562.

Kitano, H., Mamiya, A., Tomomi, I., Shinichiro, K., and Chiaki, H. (2015). Coagulation factor IX regulates cell migration and adhesion in vitro. *Cell Biol. Int.* *39*, 1162–1172.

Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J., and Takeya, M. (2008). Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J. Pathol.* *216*, 15–24.

Krell, D., Assoku, M., Galloway, M., Mulholland, P., Tomlinson, I., and Bardella, C. (2011). Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH and I2HGDH mutations in glioblastoma. *PLoS One* *6*, 3–6.

Lansac, G., Dong, W., Dubois, C.M., BenLarbi, N., Afonso, C., Fournier, I., Salzet, M., and Day, R. (2006). Lipopolysaccharide mediated regulation of neuroendocrine associated proprotein convertases and neuropeptide precursor processing in the rat spleen. *J. Neuroimmunol.* *171*, 57–71.

Lapointe, S., Perry, A., and Butowski, N.A. (2018). Primary brain tumours in adults. *Lancet* *392*, 432–446.

Lee, E.Q., Duda, D.G., Muzikansky, A., Gerstner, E.R., Kuhn, J.G., Reardon, D.A., Nayak, L., Norden, A.D., Doherty, L., LaFrankie, D., et al. (2018). Phase I and biomarker study of plerixafor and bevacizumab in recurrent high-grade glioma. *Clin. Cancer Res.* *24*, 4643–4649.

Levesque, C., Couture, F., Kwiatkowska, A., Desjardins, R., Guérin, B., Neugebauer, W.A., and Day, R. (2015). PACE4 inhibitors and their peptidomimetic analogs block prostate cancer tumor progression through quiescence induction, increased apoptosis and impaired neovascularisation. *Oncotarget* *6*, 3680–3693.

LI, M., MBIKAY, M., NAKAYAMA, K., MIYATA, A., and ARIMURA, A. (2006). Prohormone Convertase PC4 Processes the Precursor of PACAP in the Testis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *921*, 333–339.

Liau, L.M., Ashkan, K., Tran, D.D., Campian, J.L., Trusheim, J.E., Cobbs, C.S., Heth, J.A., Salacz, M., Taylor, S., D'Andre, S.D., et al. (2018). First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *J. Transl. Med.* *16*.

Liu, B., Wang, X., Chen, T.Z., Li, G.L., Tan, C.C., Chen, Y., and Duan, S.Q. (2016). Polarization of M1 tumor associated macrophage promoted by the activation of TLR3 signal pathway. *Asian Pac. J. Trop. Med.* *9*, 484–488.

Lloyd, D.J., Bohan, S., and Gekakis, N. (2006). Obesity, hyperphagia and increased metabolic efficiency in Pc1 mutant mice. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 1884–1893.

Longuespée, R., Couture, F., Levesque, C., Kwiatkowska, A., Desjardins, R., Gagnon, S., Vergara, D., Maffia, M., Fournier, I., Salzet, M., et al. (2014). Implications of proprotein convertases in ovarian cancer cell proliferation and tumor progression: Insights for pace4 as a therapeutic target. *Transl. Oncol.* *7*, 410–419.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* *114*, 97–109.

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., Deimling, A. Von, Figarella, D., Webster, B., Hiroko, K.C., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System : a summary. *Acta Neuropathol.*

Ludwig, K., and Kornblum, H.I. (2017). Molecular markers in glioma. *J. Neurooncol.* *134*, 505–512.

Luo, Y., Warren, L., Xia, D., Jensen, H., Sand, T., Petras, S., Qin, W., Miller, K.S., and Hawkins, J. (2009). Function and distribution of circulating human PCSK9 expressed extrahepatically in transgenic mice. *J. Lipid Res.* *50*, 1581–1588.

Mangani, D., Weller, M., and Roth, P. (2017). The network of immunosuppressive pathways in glioblastoma. *Biochem. Pharmacol.* *130*, 1–9.

Mantovani, A., and Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 231–237.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* *25*, 677–686.

Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., and Allavena, P. (2017). Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *14*, 399–416.

Matyash, V., and Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res. Rev.* *63*.

Mbikay, M., Tadros, H., Ishida, N., Lerner, C.P., De Lamirande, E., Chen, A., El-Alfy, M., Clermont, Y., Seidah, N.G., Chrétien, M., et al. (1997). Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 6842–6846.

Mcgranahan, T., Therkelsen, K.E., Ahmad, S., and Nagpal, S. (2019). Current State of Immunotherapy for Treatment of Glioblastoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* *20*.

Minciacchi, V.R., Freeman, M.R., and Vizio, D. Di (2015). Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* *40*, 41–51.

Mittelbronn, M., Platten, M., Zeiner, P., Dombrowski, Y., Frank, B., and Zachskorn, C. (2011). Macrophage migration inhibitory factor ( MIF ) expression in human malignant gliomas contributes to immune escape and tumour progression. *Acta Neuropathol.* *122*, 353–365.

Molinaro, A.M., Taylor, J.W., Wiencke, J.K., and Wrensch, M.R. (2019). Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nat. Rev. Neurol.* *15*, 405–417.

Mooney, K.L., Choy, W., Sidhu, S., Pelargos, P., Bui, T.T., Voth, B., Barnette, N., and Yang, I. (2016). The role of CD44 in glioblastoma multiforme. *J. Clin. Neurosci.* *34*, 1–5.



Murgoci, A.N., Duhamel, M., Raffo-Romero, A., Mallah, K., Aboulouard, S., Lefebvre, C., Kobeissy, F., Fournier, I., Zilkova, M., Maderova, D., et al. (2020). Location of neonatal microglia drives small extracellular vesicles content and biological functions in vitro. *J. Extracell. Vesicles* 9.

Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41, 14–20.

Nassoury, N., Blasiolo, D.A., Tebon Oler, A., Benjannet, S., Hamelin, J., Poupon, V., McPherson, P.S., Attie, A.D., Prat, A., and Seidah, N.G. (2007). The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic* 8, 718–732.

Neyns, B., Sadones, J., Joosens, E., Bouttens, F., Verbeke, L., Baurain, J.F., D’Hondt, L., Strauven, T., Chaskis, C., In’t Veld, P., et al. (2009). Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. *Ann. Oncol.* 20, 1596–1603.

O’Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 453–460.

Offenhäuser, C., Al-Ejeh, F., Puttick, S., Ensbey, K.S., Bruce, Z.C., Jamieson, P.R., Smith, F.M., Stringer, B.W., Carrington, B., Fuchs, A. V., et al. (2018). EphA3 pay-loaded antibody therapeutics for the treatment of glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 10, 1–15.

Ostrom, Q.T., Cioffi, G., Gittleman, H., Patil, N., Waite, K., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2019). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro. Oncol.* 21, v1–v100.

Ostuni, R., Kratochvill, F., Murray, P.J., and Natoli, G. (2015). Macrophages and cancer: From mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol.* 36, 229–239.

Palucka, A.K., and Coussens, L.M. (2016). The Basis of Oncoimmunology. *Cell* 164, 1233–1247.

Pardoll, D.. (2016). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 252–264.

Pesu, M., Watford, W.T., Wei, L., Xu, L., Fuss, I., Strober, W., Andersson, J., Shevach, E.M., Quezado, M., Bouladoux, N., et al. (2008). T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance. *Nature* 455, 246–250.

Prinz, M., Erny, D., and Hagemeyer, N. (2017). Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat. Immunol.* 18, 385–392.

Puente, X.S., Sánchez, L.M., Overall, C.M., and López-otín, C. (2003). Human and mouse proteases : a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* 4.

Qiu, Q., Basak, A., Mbikay, M., Tsang, B.K., and Gruslin, A. (2005). Role of pro-IGF-II processing by proprotein convertase 4 in human placental development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11047–11052.

Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 19, 1423–1437.

Raizer, J.J., Abrey, L.E., Lassman, A.B., Chang, S.M., Lamborn, K.R., Kuhn, J.G., Yung, W.K.A., Gilbert, M.R., Aldape, K.A., Wen, P.Y., et al. (2010). A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy. *Neuro. Oncol.* 12, 95–103.

Ransohoff, R.M., Brown, M.A., Ransohoff, R.M., and Brown, M.A. (2012). Innate immunity in the central nervous system Find the latest version : Review series Innate immunity in the central nervous system. *J. Clin. Invest.* 122, 1164–1171.

Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E.I., and Munder, M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.* 5.

Razavi, S.M., Lee, K.E., Jin, B.E., Aujla, P.S., Gholamin, S., and Li, G. (2016). Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Front. Surg.* 3.

Refaie, S., Gagnon, S., Gagnon, H., Desjardins, R., D’Anjou, F., D’Orléans-Juste, P., Zhu, X., Steiner, D.F., Seidah, N.G., Lazure, C., et al. (2012). Disruption of proprotein convertase 1/3 (PC1/3) expression in mice causes innate immune defects and uncontrolled cytokine secretion. *J. Biol. Chem.* 287, 14703–14717.

Reifenberger, G., Wirsching, H.G., Knobbe-Thomsen, C.B., and Weller, M. (2017). Advances in the molecular genetics of gliomas-implications for classification and therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *14*, 434–452.

Rodet, F., Capuz, A., Ozcan, B.-A., Le Beillan, R., Raffo-Romero, A., Kobeissy, F., Duhamel, M., and Salzet, M. (2019). PC1/3 KD Macrophages Exhibit Resistance to the Inhibitory Effect of IL-10 and a Higher TLR4 Activation Rate, Leading to an Anti-Tumoral Phenotype. *Cells* *8*.

Roebroek, A.J.M., Umans, L., Pauli, I.G.L., Robertson, E.J., Van Leuven, F., Van De Ven, W.J.M., and Constam, D.B. (1998). Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* *125*, 4863–4876.

Roesch, S., Rapp, C., Dettling, S., and Herold-Mende, C. (2018). When immune cells turn bad—tumor-associated microglia/macrophages in glioma. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.

Rose, M., Duhamel, M., Aboulouard, S., Kobeissy, F., Le Rhun, E., Desmons, A., Tierny, D., Fournier, I., Rodet, F., and Salzet, M. (2020). The Role of a Proprotein Convertase Inhibitor in Reactivation of Tumor-Associated Macrophages and Inhibition of Glioma Growth. *Mol. Ther. - Oncolytics* *17*, 31–46.

Roubtsova, A., Munkonda, M.N., Awan, Z., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Lazure, C., Cianflone, K., Seidah, N.G., and Prat, A. (2011). Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 785–791.

Rousselet, E., Benjannet, S., Hamelin, J., Canuel, M., and Seidah, N.G. (2011). The proprotein convertase PC7: Unique zymogen activation and trafficking pathways. *J. Biol. Chem.* *286*, 2728–2738.

Ruan, D., Li, X., Li, A., Liu, B., and Xu, F. (2017). Paclitaxel inhibits growth and proliferation of glioblastoma through MMP-9-mediated p38/JNK signaling pathway. *Biomed. Res.* *28*, 7348–7353.

Scamuffa, N., Siegfried, G., Bontemps, Y., Ma, L., Basak, A., Cherel, G., Calvo, F., Seidah, N.G., and Khatib, A.M. (2008). Selective inhibition of proprotein convertases represses the

metastatic potential of human colorectal tumor cells. *J. Clin. Invest.* *118*, 352–363.

Schaller, T.H., and Sampson, J.H. (2016). Advances and challenges: dendritic cell vaccination strategies for glioblastoma. *Physiol. Behav.* *176*, 139–148.

Schmid, M.C., and Varner, J.A. (2010). Myeloid Cells in the Tumor Microenvironment: Modulation of Tumor Angiogenesis and Tumor Inflammation. *J. Oncol.* *2010*, 1–10.

Seidah, N.G., and Prat, A. (2012). The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat. Rev. Drug Discov.* *11*, 367–383.

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease.

Shichita, T., Hasegawa, E., Kimura, A., Morita, R., Sakaguchi, R., Takada, I., Sekiya, T., Ooboshi, H., Kitazono, T., Yanagawa, T., et al. (2012). Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat. Med.* *18*, 911–917.

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Plasticity and Polarization. *J. Clin. Invest.* *122*, 787–795.

Siegfried, G., Descarpentrie, J., Evrad, S., and Khatib, A.-M. (2020). Proprotein convertases: Key players in inflammation-related malignancies and metastasis. *Cancer Lett.* *473*, 50–61.

Silver, D.J., and Lathia, J.D. (2018). Revealing the glioma cancer stem cell interactome, one niche at a time. *J. Pathol.* *244*, 260–264.

Takumi, I., Steiner, D.F., Sanno, N., Teramoto, A., and Osamura, R.Y. (1998). Localization of prohormone convertases 1/3 and 2 in the human pituitary gland and pituitary adenomas: analysis by immunohistochemistry, immunoelectron microscopy, and laser scanning microscopy. *Mod. Pathol.* *11*, 232–238.

Taylor, O.G., Brzozowski, J.S., and Skelding, K.A. (2019). Glioblastoma multiforme: An overview of emerging therapeutic targets. *Front. Oncol.* *9*.

Van Tellingen, O., Yetkin-Arik, B., De Gooijer, M.C., Wesseling, P., Wurdinger, T., and De Vries, H.E. (2015). Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment.

Drug Resist. Updat. 19.

Tomaszewski, W., Sanchez-Perez, L., Gajewski, T.F., and Sampson, J.H. (2019). Brain tumor microenvironment and host state: Implications for immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 25, 4202–4210.

Topchiy, E., Cirstea, M., Kong, H.J.J., Boyd, J.H., Wang, Y., Russell, J.A., and Walley, K.R. (2016). Lipopolysaccharide is cleared from the circulation by hepatocytes via the low density lipoprotein receptor. *PLoS One* 11, 1–15.

Uhm, J.H., Ballman, K. V., Wu, W., Giannini, C., Krauss, J.C., Buckner, J.C., James, C.D., Scheithauer, B.W., Behrens, R.J., Flynn, P.J., et al. (2011). Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed grade 4 astrocytoma: Mayo/north central cancer treatment group study n0074. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 80, 347–353.

Varol, C., Mildner, A., and Jung, S. (2015). Macrophages: Development and Tissue Specialization.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.

Vienne-Jumeau, A., Tafani, C., and Ricard, D. (2019). Environmental risk factors of primary brain tumors: A review. *Rev. Neurol. (Paris)*. 175, 664–678.

Voron, T., Colussi, O., Marcheteau, E., Pernot, S., Nizard, M., Pointet, A.L., Latreche, S., Bergaya, S., Benhamouda, N., Tanchot, C., et al. (2015). VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8<sup>++</sup> T cells in tumors. *J. Exp. Med.* 212, 139–148.

Walley, K.R., Thain, K.R., Russell, J.A., Reilly, M.P., Meyer, N.J., Ferguson, J.F., Christie, J.D., Nakada, T.A., Fjell, C.D., Thair, S.A., et al. (2014). PCSK9 is a critical regulator of the innate immune response and septic shock outcome. *Sci. Transl. Med.* 6.

Wanderley, C.W., Colón, D.F., Luiz, J.P.M., Oliveira, F.F., Viacava, P.R., Leite, C.A., Pereira, J.A., Silva, C.M., Silva, C.R., Silva, R.L., et al. (2018). Paclitaxel reduces tumor growth by

reprogramming tumor-associated macrophages to an M1 profile in a TLR4-dependent manner. *Cancer Res.* **78**, 5891–5900.

Wang, P., Wang, H., Huang, Q., Peng, C., Yao, L., Chen, H., Qiu, Z., Wu, Y., Wang, L., and Chen, W. (2019). Exosomes from M1-polarized macrophages enhance paclitaxel antitumor activity by activating macrophages-mediated inflammation. *Theranostics* **9**, 1714–1727.

Weller, M., and Le Rhun, E. (2019). Immunotherapy for glioblastoma: quo vadis? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 405–406.

Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S.M., Nishikawa, R., Rosenthal, M., Wen, P.Y., Stupp, R., et al. (2015). Glioma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**.

Weller, M., Butowski, N., Tran, D.D., Recht, L.D., Lim, M., Hirte, H., Ashby, L., Mechtler, L., Goldlust, S.A., Iwamoto, F., et al. (2017). Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **18**, 1373–1385.

Wick, W., Wild-Bode, C., Frank, B., and Weller, M. (2004). BCL-2-induced glioma cell invasiveness depends on furin-like proteases. *J. Neurochem.* **91**, 1275–1283.

Williams, T.K., Costantino, C.L., Bildzukewicz, N.A., Richards, N.G., Rittenhouse, D.W., Einstein, L., Cozzitorto, J.A., Keen, J.C., Dasgupta, A., Gorospe, M., et al. (2010). pp32 (ANP32A) expression inhibits pancreatic cancer cell growth and induces gemcitabine resistance by disrupting HuR binding to mRNAs. *PLoS One* **5**, 1–11.

Wirsching, H.G., Galanis, E., and Weller, M. (2016). Glioblastoma. *Handb. Clin. Neurol.* **134**, 381–397.

Woroniecka, K.I., Rhodin, K.E., Chongsathidkiet, P., Keith, K.A., and Fecci, P.E. (2018). T-Cell dysfunction in glioblastoma: Applying a new framework. *Clin. Cancer Res.* **24**, 3792–3802.

Wynn, T. a., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature* **496**, 445–455.

Xue, J., Zhao, Z., Zhang, L., Xue, L., Shen, S., Wen, Y., Wei, Z., Wang, L., Kong, L., Sun, H., et al.

(2017). Neutrophil-mediated anticancer drug delivery for suppression of postoperative malignant glioma recurrence. *Nat. Nanotechnol.* 12, 692–700.

Yang, S.B., Gao, K. Di, Jiang, T., Cheng, S.J., and Li, W. Bin (2017). Bevacizumab combined with chemotherapy for glioblastoma: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncotarget* 8, 57337–57344.

Zhang, J., F.G. Stevens, M., and D. Bradshaw, T. (2011). Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* 5, 102–114.

Zhu, X., Zhou, A., Dey, A., Norrbom, C., Carroll, R., Zhang, C., Laurent, V., Lindberg, I., Ugleholdt, R., Holst, J.J., et al. (2002). Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10293–10298.





## Résumé

Au sein des tumeurs cérébrales telles que les gliomes, les macrophages infiltrants sont abondants et associés à un mauvais pronostic. Leur plasticité fonctionnelle joue un rôle essentiel dans le développement tumoral. En effet, ils présentent un phénotype pro-tumoral et anti-inflammatoire favorisant la croissance tumorale et l'inhibition de la réponse immunitaire. Par ailleurs, ils contribuent au développement d'une résistance face aux chimiothérapies. Le but de ce projet a donc consisté au développement d'une stratégie thérapeutique permettant de réorienter les macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire et anti-tumoral. Pour cela, nous avons ciblé la proprotéine convertase 1/3 qui a récemment été démontrée comme étant un acteur clé de la reprogrammation des macrophages. Ainsi, nous avons démontré que l'inhibition de cette enzyme au sein des macrophages entraîne une sécrétion spontanée de facteurs pro-inflammatoires. De plus, la combinaison de l'inhibition de la proprotéine convertase 1/3 à la stimulation du récepteur de type Toll 4 (TLR4) avec du Paclitaxel induit la sécrétion de facteurs anti-tumoraux efficaces contre une lignée cellulaire de gliome. Nous avons également démontré que l'inhibition de plusieurs proprotéines convertases grâce à un inhibiteur commercial réduisait considérablement la viabilité et l'invasion de cellules de gliome cultivées en présence de macrophages. Outre son activité anti-tumorale directe, cet inhibiteur diminue la capacité immunosuppressive des cellules cancéreuses ainsi que les fonctions pro-tumorales des macrophages. Enfin, nous avons démontré qu'un traitement avec le Poly (I:C), ligand du TLR3, complète l'action de l'inhibiteur de proprotéines convertases. Cette stratégie est donc encourageante pour la reprogrammation des macrophages dans le cadre d'une nouvelle thérapie contre les gliomes.

Mots clés : Reprogrammation, Proprotéine convertase, TLR, Gliome, Immunothérapie

## Abstract

In brain tumors such as gliomas, infiltrating macrophages are abundant and associated with a poor prognosis. Their functional plasticity is essential for tumor development. They exhibit anti-inflammatory and pro-tumoral phenotype promoting tumor growth and immunosuppression. Moreover, they impact the efficacy of chemotherapy and may lead to drug resistance. Therefore, this project aims at reorienting macrophages towards a pro-inflammatory and anti-tumoral phenotype. For this purpose, the proprotein convertase 1/3 (PC1/3) has been targeted since it plays a key role to skew their phenotype. Indeed, we showed that macrophages released spontaneously pro-inflammatory factors after PC1/3 inhibition. Besides, PC1/3 inhibition combined with TLR4 activation with Paclitaxel induced the secretion of anti-tumoral factors effective against a glioma cell line. To go further, we also inhibited various proprotein convertases with a commercial inhibitor. We found that such treatment reduced the viability and the invasion of glioma cells in co-culture with macrophages. In addition to its direct anti-tumoral activity, it decreased the immunosuppressive capacity of cancer cells as well as the pro-tumoral functions of macrophages. Finally, we also demonstrated that stimulation of TLR3 with Poly (I:C) sustained the activity of the proprotein convertases inhibitor. Therefore, proprotein convertases inhibition associated with TLR activation is a promising strategy to reactivate tumor-associated macrophages and develop a potent anti-glioma therapy.

Keyword: Reprogrammation, Proprotein Convertase, TLR, Glioma, Immunotherapy